

Aus dem

Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Genetik
und angewandte Genomik

**Validierung longitudinaler Blut-basierter Biomarker
in der Spinocerebellären Ataxie Typ 3**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Frank, Constanze Judith

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Kahle

Tag der Disputation: 27.03.2024

Meiner Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| <i>1</i> | <i>Einleitung</i> | <i>1</i> |
| 1.1 | Ursprung und Erstbeschreibung der Machado-Joseph-Krankheit..... | 1 |
| 1.2 | Definition der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 und Einordnung in die autosomal-dominant vererbaren Ataxien (ADCA) | 1 |
| 1.3 | Polyglutamin- und neurodegenerative Erkrankungen | 2 |
| 1.4 | Epidemiologie der Spinozerebellären Ataxie | 4 |
| 1.5 | Das <i>Ataxin-3</i> Gen | 5 |
| 1.6 | Das ATXN3 Protein | 5 |
| 1.7 | Pathologischer Mechanismus der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 | 6 |
| 1.8 | Hitzeschockproteine | 10 |
| 1.9 | Klinische Symptomatik der SCA3 | 13 |
| 1.10 | Diagnostik und Therapie der Machado-Joseph-Krankheit..... | 14 |
| 1.11 | Biomarker in der SCA3 Forschung | 16 |
| 1.12 | ESMI-Projekt – European Spinocerebellar Ataxia Type 3 / Machado-Joseph-Disease Initiative..... | 20 |
| 1.13 | Ziel der Dissertation | 21 |
| <i>2</i> | <i>Material und Methoden</i> | <i>23</i> |
| 2.1 | Material..... | 23 |
| 2.1.1 | Herkunft der Blutproben und PatientInnenauswahl in ESMI..... | 23 |
| 2.1.2 | Geräte | 23 |
| 2.1.3 | Verbrauchsmaterialien | 26 |
| 2.1.4 | Chemikalien/Reagenzien | 28 |
| 2.1.5 | Lösungen und Puffer..... | 30 |
| 2.1.6 | Kits..... | 32 |
| 2.1.7 | Gehirnproben | 33 |
| 2.1.8 | Proteinproben..... | 33 |
| 2.1.9 | Gehirnschnitte | 35 |
| 2.1.10 | Primer..... | 35 |
| 2.1.11 | Antikörper | 40 |
| 2.1.12 | Softwares..... | 43 |
| 2.1.13 | Datensätze in <i>Ingenuity Pathway Analysis (IPA)</i> | 44 |
| 2.2 | Methoden..... | 45 |
| 2.2.1 | <i>Ingenuity Pathway Analysis (IPA)</i> | 45 |
| 2.2.2 | RNA..... | 46 |
| 2.2.2.1 | RNA-Isolierung von humanem Cerebellum | 46 |
| 2.2.2.2 | Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung | 47 |
| 2.2.2.3 | cDNA-Synthese..... | 48 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|-----|
| 2.2.2.4 | Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) mit <i>Two-Step</i> Verfahren | 50 |
| 2.2.2.5 | Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) mit <i>One-Step</i> Verfahren | 52 |
| 2.2.2.6 | Gradienten-PCR zur Optimierung..... | 54 |
| 2.2.2.7 | Agarose-Gelelektrophorese | 56 |
| 2.2.3 | Protein | 56 |
| 2.2.3.1 | Herstellung von Gewebe-Homogenaten | 56 |
| 2.2.3.2 | Herstellung von Gewebe-Lysaten | 57 |
| 2.2.3.3 | Bradford | 57 |
| 2.2.3.4 | Western Blot..... | 58 |
| 2.2.3.5 | Filter Trap..... | 64 |
| 2.2.3.6 | Immunhistochemie | 65 |
| 2.2.4 | Statistik | 68 |
| 3 | <i>Ergebnisse</i> | 69 |
| 3.1 | Übersicht des Forschungsprojektes | 69 |
| 3.2 | Teil A: IPA-Analyse | 72 |
| 3.2.1 | Hochreguliertes ACY3 in Verbindung mit Creb | 73 |
| 3.2.2 | Runterreguliertes CA9 in Verbindung mit runterreguliertem ATXN3 bei zweimonatigen SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen | 76 |
| 3.2.3 | Keine signifikanten Expressionen der Mitglieder der DNAJ-Familie (DNAJC13 und HDJ2) in der bioinformatischen Auswertung | 78 |
| 3.2.4 | HSP105 und HSPA2 in gemeinsamen <i>Pathway</i> und HSPA2 in <i>Pathways</i> der Huntington-Krankheit exprimiert | 79 |
| 3.2.5 | HSP27 signifikant exprimiert in IPA..... | 84 |
| 3.2.6 | Runterreguliertes LTBP4 in IPA-Datensätzen..... | 86 |
| 3.2.7 | OTOF in vielen Netzwerken von IPA signifikant exprimiert..... | 87 |
| 3.2.8 | SAFB2 und SFT2D2 in Netzwerken mit Zell-Bezug hochreguliert und SFSWAP ohne signifikante Expressionen in <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> | 90 |
| 3.2.9 | SUSD1 signifikant exprimiert in Sequenzierungsdatensätzen von ESMI-ProbandInnen .. | 93 |
| 3.3 | Teil B: qPCR mit RNA von SCA3 PatientInnen und Kontrollpersonen..... | 95 |
| 3.3.1 | <i>Two-Step</i> Verfahren | 97 |
| 3.3.1.1 | Etablierung der Standardreihe..... | 97 |
| 3.3.1.2 | Etablierung der Annealing-Temperatur | 100 |
| 3.3.1.3 | Etablierung der Konzentration der Proben..... | 101 |
| 3.3.1.4 | Etablierung der Primer | 102 |
| 3.3.2 | <i>One-Step</i> Verfahren | 104 |
| 3.3.2.1 | Etablierung der Standardreihe, Annealing-Temperatur und Konzentration der Proben 105 | |
| 3.3.2.2 | Etablierung der Primer SFT2D2 und SUSD1 | 105 |
| 3.3.2.3 | Keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen präataktischen MutationsträgerInnen und SCA3 PatientInnen mit schwerer Erkrankungsform in der qPCR mit SUSD1 | 107 |
| 3.4 | Teil C: Protein-Methoden in SCA3 Knock-In Mäusen | 111 |
| 3.4.1 | Expressionsunterschiede innerhalb der Genotypen in den Western Blot Analysen | 113 |
| 3.4.1.1 | Western Blot von Atxn3 mit den erwarteten Banden des nicht-expandierten Proteins, expandierten Proteins und der Aggregatbildung | 113 |
| 3.4.1.2 | Geringere Expression von ACY3 bei dreimonatigen homozygoten Mäusen | 115 |
| 3.4.1.3 | Unerwartete Bande bei 25 kDa in allen Western Blots von CA9 | 118 |
| 3.4.1.4 | Expressionserhöhung der homozygoten SCA3 Mäuse im Western Blot von DNAJC13 | 121 |
| 3.4.1.5 | Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den 12-monatigen Genotypen im Western Blot von HDJ2..... | 123 |
| 3.4.1.6 | Keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen in der Proteinexpression von HSP105 | 126 |
| 3.4.1.7 | Ansteigende Expressionserhöhung in 18-monatigen Mäusen im Western Blot von HSP27 | 127 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.4.1.8 | Keine Expressionsunterschiede zwischen den drei Genotypen im Western Blot von HSPA2 | 130 |
| 3.4.2 | Aggregationsunterschiede innerhalb der 18-monatigen Genotypen mit dem Filter Trap Verfahren | 133 |
| 3.4.2.1 | Erhöhte ATXN3-Aggregationsrate zwischen Wildtyp und homozygoten SCA3 KI Mäusen und ubiquinierte ATXN3-positive Aggregate | 133 |
| 3.4.2.2 | Signifikante Aggregationsbildung von ACY3 bei den homozygoten SCA3 Mäusen | 135 |
| 3.4.2.3 | Erhöhte Unterschiede in der Antikörperfärbung zwischen den einzelnen Genotypen beim Filter Trap mit CA9 | 136 |
| 3.4.2.4 | Keine signifikanten Veränderungen zwischen den Genotypen im Filter Trap von DNAJC13 | 137 |
| 3.4.2.5 | Leichte Erhöhung der Aggregationsmenge von wildtypischen zu homozygoten Mäusen im Filter Trap von HDJ2 | 138 |
| 3.4.2.6 | Signifikante Aggregationsbildung von homozygoten 304Q Tieren in Bezug zu Kontrolltieren im Filter Trap von HSP105 | 139 |
| 3.4.2.7 | Keine signifikanten Veränderungen zwischen den drei Genotypen im Filter Trap von HSP27 | 141 |
| 3.4.2.8 | Hohe signifikante Aggregationsbildung in homozygoten 304Q Tieren in Bezug zu den anderen Genotypen im Filter Trap von HSPA2 | 142 |
| 3.4.3 | Immunhistochemische Färbungen als Beweis der Aggregation im Gehirn | 143 |
| 3.4.3.1 | Aggregate im Gehirn von homozygoter Maus bei Atxn3 Färbung | 143 |
| 3.4.3.2 | Aggregatbildung in Pons und Gyrus Dentatus der homozygoten 18-monatigen SCA3 KI Maus bei DNAJC13 Färbung | 146 |
| 3.4.3.3 | Aggregate in Nuclei cerebelli und Gyrus Dentatus bei homozygoten 304Q Mäusen bei HDJ2 Färbung | 148 |
| 3.4.3.4 | Intensivere HSP105 Färbung bei den Sagittalschnitten der homozygoten 304Q Tiere im Vergleich zu denen der Wildtypen | 150 |
| 3.4.3.5 | Veränderungen im Gewebe von homozygoten 304Q Tieren in Bezug zu Kontrollmäusen bei HSPA2 Färbung | 151 |
| 4 | <i>Diskussion</i> | 154 |
| 5 | <i>Zusammenfassung</i> | 178 |
| 6 | <i>Literaturverzeichnis</i> | 180 |
| 7 | <i>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation</i> | 197 |
| 8 | <i>Danksagung</i> | 198 |
| 9 | <i>Anlagen im Anhang</i> | 200 |
| 9.1 | Tabellen | 200 |
| 9.2 | Abbildungen | 201 |
| 9.2.1 | Abbildungen zur bioinformatischen Analyse | 201 |
| 9.2.2 | Abbildungen zur Gradienten-PCR | 218 |

Abkürzungsverzeichnis

| <i>Abkürzung</i> | <i>Ausgeschriebene Bezeichnung</i> |
|------------------|--|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| ACY3 | Aminoacylase 3 |
| AK | Antikörper |
| aMCI | Amnestische leichte kognitive Beeinträchtigungen |
| Atxn3 | Ataxin 3 Protein |
| bp | Basenpaar |
| C | Cytosin |
| CA9 | Carbonsäureanhydrase |
| Cb | Cerebellum |
| cDNA | Komplementäre DNA (zur einzelsträngigen RNA) |
| Cp | <i>Crossing Point</i> |
| DNA | Desoxy-Ribonukleinsäure |
| DNAJC13 | <i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13</i> |
| DDAGE | Denaturierende Detergens-vermittelte Agarose-Gelelektrophorese |
| DUB | Deubiquitinisierendes Enzym |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| G | Guanin |
| GD | Gyrus Dentatus |
| Hc | Hippocampus |
| HDJ2 bzw. | <i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1)</i> |
| DNAJA1 | |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| HSP105 bzw. | <i>Heat shock protein family H (Hsp110) member 1</i> |
| HSPH1 | |
| HSP27 bzw. | <i>Heat shock protein family B (small) member 1</i> |
| HSPB1 | |
| HSPA2 | <i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 2,</i> |
| HT | Heterozygot |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| HO | Homozygot |
| IPA | <i>Ingenuity Pathway Analyse</i> |
| KI | <i>Knock In</i> |
| kDA | Kilodalton |
| LDS | Lithiumdodecylsulfat |
| LTBP4 | <i>Latent transforming growth factor beta binding protein 4)</i> |
| MJD | Machado-Joseph-Krankheit |
| mRNA | Messenger RNA |
| N. | Nervus |
| NC | Tiefe Kleinhirnkerne |
| N/Gro | Nijmegen/Groningen |
| Nr. | Nummer |
| OTOF | Otoferlin |
| PAGE | Polyacrylamid |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PNS | Peripheres Nervensystem |
| PolyQ | PolyGlutamin |
| PQC | Proteinqualitätskontrolle |
| PZ | Purkinje-Zellen |
| Q | Glutamin |
| qPCR | Quantitative Echtzeit-PCR |
| RIN-Wert | RNA-Qualität |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Reverse Transkription |
| SAFB2 | <i>Scaffold attachment factor B2</i> |
| SCA3 | Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 |
| SFSWAP | <i>Splicing factor SWAP</i> |
| SFT2D2 | <i>SFT2 domain containing 2</i> |
| SUSD1 | <i>Sushi domain containing 1</i> |
| T | Thymin |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|---|
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure |
| TBS | Tris-buffered-saline-Puffer |
| TBST | Tris-buffered-saline-Puffer mit Tween20 |
| TPM | Transcripts per million |
| Ub | Ubiquitin |
| WB | Western Blot |
| WT | Wildtyp |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 2.1: Legende für Ingenuity Pathway Analyse (erstellt in Microsoft PowerPoint) | 46 |
| Abbildung 2.2: Zusammenbau des Gitters mit den aus der PAGE-resultierenden Proteinbanden auf eine Membran (erstellt in BioRender.com) | 61 |
| Abbildung 3.1: Übersicht des Workflows der Verfahren (erstellt in BioRender.com) | 71 |
| Abbildung 3.2: Hochreguliertes ACY3 in Verbindung mit Creb..... | 75 |
| Abbildung 3.3: Runterreguliertes CA9 im indirekten Bezug zum runterregulierten ATXN3 im Netzwerk „Zellmorphologie, Zellaufbau und -organisation, Gewebemorphologie“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 2M (Cerebellum) | 77 |
| Abbildung 3.4: In perinukleären Einschlüssen runterreguliertes HSPA2 mit Huntingtin im Pathway „Signalisierung der Huntington-Krankheit“ | 81 |
| Abbildung 3.5: Runterreguliertes HSPA2 in Verbindung stehend mit den neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und SCA 3 im Pathway „BAG2-Signalweg“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum..... | 83 |
| Abbildung 3.6: Runterreguliertes HSPB1 im Netzwerk „Zellfunktion und -erhaltung, Entwicklung und Funktion hämatologischer Systeme, Proteinsynthese“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum)..... | 85 |
| Abbildung 3.7: LTBP4 im Netzwerk „Krebs, Magen-Darm-Erkrankungen, Organismenverletzungen und Anomalien“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum..... | 87 |
| Abbildung 3.8: Hochreguliertes OTOF in Netzwerken von IPA | 90 |
| Abbildung 3.9: Hochregulierte Gene SAFB2 und SFT2D2 in Netzwerken von IPA.. | 92 |
| Abbildung 3.10: Runter- und hochreguliertes SUSP1 in Netzwerken von IPA..... | 95 |
| Abbildung 3.11: Flussdiagramm zum Ablauf der Etablierung des Two-Step und One-Step Verfahrens (erstellt in Microsoft PowerPoint) | 97 |
| Abbildung 3.12: Standardreihe und Effizienz der Standardkurve im Two-Step Verfahren | 99 |
| Abbildung 3.13: Gradienten-PCR von SUSP1 V933-V934 zur Etablierung der Annealing-Temperatur..... | 101 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 3.14: Signale der Proben zwischen den Kurven der Standardreihe im Two-Step Verfahren | 102 |
| Abbildung 3.15: Signale der Proben zwischen den Kurven der Standardreihe im One-Step Verfahren | 106 |
| Abbildung 3.16: Demographische Verteilung der RNA-Proben des ESMI-Projektes in Form eines Kreisdiagrammes | 110 |
| Abbildung 3.17: Vergleichende qPCR zwischen präataktischen MutationsträgerInnen und schwer betroffenen SCA3 PatientInnen mit den Primern SUSD1 | 111 |
| Abbildung 3.18: Western Blot von Atxn3 mit den erwarteten Banden für die Erkrankung SCA3 | 115 |
| Abbildung 3.19: Western Blot von ACY3 mit signifikanten Expressionsunterschieden in den dreimonatigen Tieren | 117 |
| Abbildung 3.20: Western Blot von CA9 mit weiterer, unerwarteter Bande mit 25 kDa | 120 |
| Abbildung 3.21: Western Blot von DNAJC13 mit signifikantem Expressionsunterschied in den dreimonatigen SCA3 Mäusen | 123 |
| Abbildung 3.22: Western Blot von HDJ2 mit signifikanten Expressionsunterschieden in den 12-monatigen Mäusen | 125 |
| Abbildung 3.23: Western Blot von HSP105 mit 18 M Mäusen mit WT, HT, HO | 127 |
| Abbildung 3.24: Western Blot von HSP27 mit signifikanten Expressionsunterschieden in den 18-monatigen Mäusen | 129 |
| Abbildung 3.25: Western Blot von HSPA2 ohne signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen..... | 132 |
| Abbildung 3.26: Beim Atxn3 Filter Trap Signifikanz zwischen Wildtyp und homozygoten SCA3 KI Mäusen | 134 |
| Abbildung 3.27: Keine Signifikanz im Filter Trap von Ubiquitin aufgrund der starken Streuung | 135 |
| Abbildung 3.28: Erhöhte Aggregationsbildung bei homozygoten Tieren im Vergleich zu heterozygoten Mäusen im Filter Trap von ACY3..... | 136 |
| Abbildung 3.29: Hohe Aggregation bei homozygoten SCA3 KI Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen..... | 137 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 3.30: Filter Trap von DNAJC13 ohne signifikante Veränderungen zwischen den einzelnen Genotypen..... | 138 |
| Abbildung 3.31: Filter Trap von HDJ2 ohne signifikante Veränderungen zwischen den einzelnen Genotypen..... | 139 |
| Abbildung 3.32: Filter Trap von HSP105 mit signifikanter Veränderung zwischen wildtypischen Mäusen und homozygoten 304Q Tieren | 140 |
| Abbildung 3.33: Filter Trap von HSP27 ohne signifikante Veränderungen zwischen den drei Genotypen..... | 141 |
| Abbildung 3.34: Filter Trap von HSPA2 mit hoher signifikante Aggregationsbildung in homozygoten 304Q Mäusen in Bezug zu den anderen Genotypen..... | 142 |
| Abbildung 3.35: Aggregatbildung bei den homozygoten SCA3 KI Mäusen in der immunhistochemischen Färbung mit Atxn3..... | 145 |
| Abbildung 3.36: Aggregatbildung bei den homozygoten SCA3 KI Mäusen im Alter von 18 Monaten im Pons und Gyrus Dentatus in der immunhistochemischen Färbung mit DNAJC13 | 148 |
| Abbildung 3.37: Aggregatbildung bei den homozygoten SCA3 KI Mäusen im Alter von 12 und 18 Monaten im Gyrus Dentatus in der immunhistochemischen Färbung mit HDJ2 | 149 |
| Abbildung 3.38: Intensivere Färbung der Gehirnschnitte der homozygoten SCA3 KI Mäuse in Bezug zu den Wildtypen in der immunhistochemischen Färbung mit HSP105..... | 151 |
| Abbildung 3.39: Veränderungen in homozygoten 304Q KI Gehirnschnitten im Vergleich zu denen der Wildtypen in der immunhistochemischen Färbung mit HSPA2 | 153 |
| Abbildung 9.1: Hochreguliertes CA9 im Netzwerk „Krebs, Störungen des endokrinen Systems, Verletzungen und Anomalien von Organismen“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum)..... | 201 |
| Abbildung 9.2: Runterreguliertes CA9 im Netzwerk „Entwicklungsstörung, Augenkrankheit, Organismenverletzung und Anomalien“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum..... | 202 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 9.3: Runterreguliertes HSPA2 im Netzwerk „Organmorphologie, Entwicklung und Funktion des Skelett- und Muskelsystems, Gewebemorphologie“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum..... | 203 |
| Abbildung 9.4: Übersichtsbild vom runterregulierten HSPA2 im Pathway „Signalisierung der Huntington-Krankheit“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum..... | 205 |
| Abbildung 9.5: HSPA2 und HSP105 im Pathway „Aldosteron-Signalisierung in Epithelzellen“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum)..... | 206 |
| Abbildung 9.6: HSPA2 im Pathway „Signalisierung der Huntington-Krankheit“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum)..... | 208 |
| Abbildung 9.7: HSPA2 im Pathway „HIF1 α Signalisierung“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum)..... | 209 |
| Abbildung 9.8: HSPA2 im Pathway „BAG2-Signalweg“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum..... | 210 |
| Abbildung 9.9: Runterreguliertes HSPB1 im Netzwerk „Zell-Kompromittierung, Zellentwicklung, Zellwachstum und -proliferation“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild; logFold Change von -0,289; p-Wert von $1,14 e - 2$ | 211 |
| Abbildung 9.10: Runterreguliertes HSPB1 im Netzwerk „Zellvermittelte Immunantwort, Zellentwicklung, Zellfunktion und -erhaltung“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch; logFold Change von -0,346; p-Wert von $2,81 e - 2$ | 212 |
| Abbildung 9.11: Runterreguliertes LTBP4 im Netzwerk Störungen des endokrinen Systems, Magen-Darm-Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen“ aus dem Datensatz SCA3 Maus Transgen 80Q präfrontaler Cortex Wildtyp 2M vs. Transgen 2M..... | 213 |
| Abbildung 9.12: Hochreguliertes OTOF im Netzwerk „Zellmorphologie, Infektionskrankheiten, Organismenschäden und Anomalien“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild..... | 213 |
| Abbildung 9.13: Hochreguliertes OTOF im Netzwerk „Hörkrankheit, immunologische Krankheit, Organismenverletzung und Anomalien“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild Männer..... | 214 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 9.14: Hochreguliertes OTOF im Netzwerk „Entzündliche Erkrankung, Entzündungsreaktion, Organismenverletzung und Anomalien“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline Kontrolle vs. Mutationsträger | 215 |
| Abbildung 9.15: Runterreguliertes OTOF im Netzwerk „Störungen des endokrinen Systems, Verletzungen und Anomalien von Organismen, Erkrankungen des Fortpflanzungssystems“ aus dem Datensatz SCA3 Maus Transgen 80Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M | 216 |
| Abbildung 9.16: OTOF im Netzwerk „Zellmorphologie, Embryonalentwicklung, Haar- und Hautentwicklung und -funktion“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline alle | 217 |
| Abbildung 9.17: Runterreguliertes SUSD1 im Netzwerk „Hämatologische Erkrankungen, Infektionskrankheiten, Organismenschäden und Anomalien“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline präataktisch vs. Kontrolle | 217 |
| Abbildung 9.18: Hochreguliertes SUSD1 im Netzwerk „Kohlenhydratstoffwechsel, molekularer Transport, posttranslationale Modifikation“ aus dem Datensatz SCA3 Maus Transgen 80Q Cerebellum Wildtyp 2M und Transgen 2M | 218 |
| Abbildung 9.19: Gradienten-PCR von SUSD1 V935-V936 zur Etablierung der Annealing-Temperatur | 218 |
| Abbildung 9.20: Gradienten-PCR von SUSD1 V763-V764 zur Etablierung der Annealing-Temperatur | 219 |
| Abbildung 9.21: Gradienten-PCR von SFT2D2 V761-V762 zur Etablierung der Annealing-Temperatur | 220 |
| Abbildung 9.22: Gradienten-PCR von OTOF V757-V758 zur Etablierung der Annealing-Temperatur | 221 |
| Abbildung 9.23: Gradienten-PCR von OTOF V759-V760 zur Etablierung der Annealing-Temperatur | 222 |
| Abbildung 9.24: Gradienten-PCR von OTOF V937-V938 zur Etablierung der Annealing-Temperatur | 223 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 2.1: Verzeichnis der verwendeten Geräte..... | 23 |
| Tabelle 2.2: Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien..... | 26 |
| Tabelle 2.3: Verzeichnis aller verwendeten Chemikalien/Reagenzien..... | 28 |
| Tabelle 2.4: Verzeichnis der verwendeten Lösungen und Puffer..... | 30 |
| Tabelle 2.5: Verzeichnis der verwendeten Kits..... | 32 |
| Tabelle 2.6: Verzeichnis der verwendeten post-mortem Kleinhirnproben von Kontroll- und SCA-Patienten unbekanntem Typs..... | 33 |
| Tabelle 2.7: Verzeichnis der verwendeten Proteinproben der 304Q KI Mäuse..... | 33 |
| Tabelle 2.8: Verzeichnis der verwendeten Sagittalschnitte der 304Q KI Mäuse und Wildtypen für die Immunhistochemie (Haas et al., 2022)..... | 35 |
| Tabelle 2.9: Verzeichnis der verwendeten Primer von der Firma Matbion International AG..... | 35 |
| Tabelle 2.10: Verzeichnis der verwendeten Primer von der Firma Biomol GmbH..... | 39 |
| Tabelle 2.11: Verzeichnis der verwendeten Primär-Antikörper für Western Blot und Filter Trap..... | 40 |
| Tabelle 2.12: Verzeichnis der verwendeten Sekundär-Antikörper für Western Blot und Filter Trap..... | 42 |
| Tabelle 2.13: Verzeichnis der verwendeten Primär-Antikörper für Immunhistochemie..... | 42 |
| Tabelle 2.14: Verzeichnis der verwendeten Sekundär-Antikörper für Immunhistochemie | 43 |
| Tabelle 2.15: Verzeichnis der verwendeten Softwares..... | 43 |
| Tabelle 2.16: Verzeichnis der verwendeten IPA-Datensätze..... | 44 |
| Tabelle 2.17: genomische DNA-Eliminierungsreaktion..... | 48 |
| Tabelle 2.18: Master Mix für die Reverse Transkription..... | 49 |
| Tabelle 2.19: Programmeinstellungen für cDNA-Synthese..... | 49 |
| Tabelle 2.20: Mastermix für qPCR mit Two-Step Verfahren..... | 50 |
| Tabelle 2.21: Einstellungen des Programmes SYBR Green I / HRM Dye..... | 51 |
| Tabelle 2.22: Mastermix für qPCR mit One-Step Verfahren..... | 53 |
| Tabelle 2.23: Einstellungen des Programmes für das Luna Universal RT-qPCR Kit inklusive Melting..... | 53 |
| Tabelle 2.24: Mastermix für Gradienten-PCR..... | 55 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 2.25: Programm des Thermocyclers für Gradienten-PCR | 55 |
| Tabelle 2.26: Bradford-Standardreihe | 58 |
| Tabelle 2.27: Mastermix zur Probenvorbereitung | 59 |
| Tabelle 2.28: 8%iges Trenngel und 6%iges Sammelgel für ein Gel..... | 59 |
| Tabelle 2.29: Mastermix für Filter Trap | 64 |
| Tabelle 2.30: Deparaffinierung der Maushirnschnitte..... | 65 |
| Tabelle 2.31: Dehydrierung der Maushirnschnitte | 67 |
| Tabelle 3.1: Ausgewählte Proteine für die Dissertation | 72 |
| Tabelle 3.2: Alle signifikanten Expressionen von ACY3 in der bioinformatischen Auswertung | 73 |
| Tabelle 3.3: Alle signifikanten Expressionen von CA9 in der bioinformatischen Auswertung | 76 |
| Tabelle 3.4: Alle signifikanten Expressionen von HSP105 und HSPA2 in der bioinformatischen Auswertung..... | 80 |
| Tabelle 3.5: Alle signifikanten Expressionen von HSP27 in der bioinformatischen Auswertung | 84 |
| Tabelle 3.6: alle signifikanten Expressionen von LTBP4 in der bioinformatischen Auswertung | 86 |
| Tabelle 3.7: Alle signifikanten Expressionen von LTBP4 in der bioinformatischen Auswertung | 88 |
| Tabelle 3.8: Alle signifikanten Expressionen von SAFB2 und SFT2D2 in der bioinformatischen Auswertung | 91 |
| Tabelle 3.9: Alle signifikanten Expressionen von SUSP1 in der bioinformatischen Auswertung | 93 |
| Tabelle 3.10: Optimale Bedingungen für die qPCR mittels Two-Step Verfahren..... | 104 |
| Tabelle 3.11: Demographische Informationen und statistische Auswertung zu den in der qPCR verwendeten Proben von präataktischen MutationsträgerInnen und schwer betroffenen SCA3 PatientInnen..... | 109 |
| Tabelle 3.12: Weitere Informationen für die Entscheidung der Auswahl der Proben und der Ergebnisse der qPCR | 110 |
| Tabelle 9.1: Überblick der IPA-Analyse | 200 |

1 Einleitung

1.1 Ursprung und Erstbeschreibung der Machado-Joseph-Krankheit

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3), auch Machado-Joseph-Krankheit (MJD) genannt, wurde bei von den Azoren stammenden Familien zum ersten Mal zwischen 1972 und 1977 beschrieben. Die Namen der Familien lauteten unter anderem Machado und Joseph, woraus sich später die Bezeichnung Machado-Joseph-Krankheit entwickelte (Nakano et al., 1972; Rosenberg et al., 1976; Woods & Schaumburg, 1972). Die SCA3 kommt auf den Azoren gehäuft auf den Inseln São Miguel und Flores vor. Die Ergebnisse von Gaspar et al., 2001 deuteten darauf hin, dass die Mutation in der portugiesischen Bevölkerung entstand und diese später durch Seereisen des späten 15. und 16. Jahrhunderts in Länder wie Indien, Japan und andere gebracht wurde (Gaspar et al., 2001). Früher wurde zwischen MJD und SCA3 unterschieden, bevor bewiesen wurde, dass es sich um dieselbe Erkrankung handelt (Haberhausen et al., 1995). Der Name SCA3 ist nach der Sequenz der Genentdeckung gekennzeichnet (Meira et al., 2020).

1.2 Definition der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 und Einordnung in die autosomal-dominant vererbbaeren Ataxien (ADCA)

Ataxia bzw. *αταξία* (griechisch) wird mit Unordnung, Unregelmäßigkeit übersetzt und steht für das Syndrom „Fehlen der Ordnung“ der Erkrankung Spinozerebellären Ataxien (Klockgether et al., 2019).

Die Spinozerebellären Ataxien (SCA) werden zur Gruppe der autosomal-dominanten ataktischen Erkrankungen mit Degeneration des Cerebellums und dessen afferenten und efferenten Verbindungen gezählt (Schöls et al., 2004). SCA3 gehört zu den bisher 48 identifizierten unterschiedlichen heterogenen Subtypen von Spinozerebellären Ataxien. Die Zahlen der Untergruppen (hier SCA3) wurden chronologisch nach Identifikation des Krankheitsherds oder verursachenden Subtyp-Gens vergeben (Klockgether et al., 2019; Shen et al., 2023). SCA3 gilt als häufigster SCA-Subtyp in den meisten Populationen und weist einen der variabelsten Phänotypen unter den Spinozerebellären Ataxien auf (Schöls et al., 2004). Diese einzelne Erkrankung zeichnet sich durch einen hohen Grad an

klinischer Variabilität aus (Costa & Paulson, 2012) und die ersten Krankheitssymptome beginnen zwischen der dritten und fünften Lebensdekade (Klockgether et al., 2019). Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 wird durch CAG-Trinukleotid-Wiederholungsexpansionen, welche Polyglutamin-Wiederholungen kodieren, im *Ataxin-3-(ATXN3)* Gen verursacht. Darüber hinaus können keine Tests aussagen, wann die SCA3-Mutationsträger ataktisch werden (Schöls et al., 2004). Bei der Spinocerebellären Ataxie Typ 3, welche im Vergleich zu anderen SCA-Typen spät einsetzt, können bei der Autopsie eine Atrophie des Cerebellums sowie degenerative Veränderungen im Rückenmark, in den Basalganglien und in dem Cortex cerebri ermittelt werden (Harding, 1983).

Harding schuf 1982 für die autosomal-dominant vererbaren Ataxien (ADCA) eine klinisch orientierte Einteilung von vier Subtypen. Bei ADCA Typ I liegt eine zerebelläre Ataxie mit neurologischen Störungen wie Demenz, periphere Neuropathie, Ophthalmoplegie, Spastik als pyramidale Symptomatik sowie Tremor, Parkinsonismus und Dystonie als extrapyramidale Symptome vor. Zu diesem Typ gehört beispielsweise SCA1-3. Der ADCA Typ II weist eine zerebelläre Ataxie mit retinaler Degeneration auf, wie es bei SCA7 der Fall ist. Das klinische Merkmal von ADCA Typ III ist eine „rein“ zerebelläre Ataxie mit einem späten Erkrankungsalter und einer unverminderten Lebenserwartung, hier kann beispielsweise SCA5 genannt werden. Beim ADCA Typ IV handelt es sich um eine zerebelläre Ataxie mit Myoklonien und Taubheit. Hierzu gehört DRPLA (Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie), welche gehäuft in Japan vorkommt (Harding, 1982; Schöls et al., 2004). Mit 20-50% gehört SCA3 zum häufigsten vertreten Subtyp der autosomal-dominant vererbaren Ataxien (Hersheson et al., 2012). Wie sich zeigt, ist die Klinik der 4 Subtypen überlappend, deshalb kann die Frage gestellt werden, inwiefern diese Klassifikation noch aktuell ist.

1.3 Polyglutamin- und neurodegenerative Erkrankungen

SCA3 gehört nicht nur zur Gruppe der ADCA, sondern wird auf molekularbiologischer Ebene den Polyglutamin-Ataxien, welche durch CAG-Wiederholungserweiterungen verursacht werden und eine Wiederholung der Aminosäure Glutamin im entsprechenden

Einleitung

Protein (hier ATXN3 Protein) kodieren, zugeordnet (Bettencourt & Lima, 2011). Als Polyglutamin- (PolyQ) Erkrankungen gelten die Huntington-Krankheit, die Dentatorubral-pallidolusyische Atrophie (DRPLA), die spinale bulbäre Muskelatrophie (SBMA) und die Spinozerebellären-Ataxien Typ 1-3, Typ 6-7 und Typ 17 (Klockgether et al., 2019). Die PolyQ-Erkrankungen weisen mehrere Schlüsselmerkmale wie die autosomal-dominante Vererbung (mit Ausnahme von SBMA), hauptsächlich Befall des Zentralen Nervensystems (ZNS) und variabler Befall des Peripheren Nervensystem (PNS) und der Muskeln, als auch Manifestation im Erwachsenenalter mit einem langsamen Verlauf über Jahrzehnte auf (H. L. Paulson et al., 2017). Merkmale der Polyglutamin-Erkrankungen sind, dass diese normalerweise aus vorhandenen polymorphen Wiederholungen / *Repeats* entstehen, deren Erweiterungen dynamisch sind und diese sich häufig in Größe bei Übertragung auf die nächste Generation verändern. Vor allem ist bei der aufeinanderfolgenden Generation eine klinische Antizipation zu erkennen. Zudem können längere Wiederholungen zu früher einsetzenden und schwer verlaufenden Erkrankungen führen und es kann sich um variable Phänotypen handeln. Im Folgenden werden mehrere Faktoren, die zu den pathogenen Mechanismen der PolyQ-Erkrankungen beitragen, beispielhaft genannt: Sequenz und Größe der *Repeats*, Lokalisation der Wiederholung innerhalb des Gens, Funktion des sich wiederholenden Gens, Kodierung von RNA oder Protein und Ausmaß der meiotischen und somatischen Instabilität (H. Paulson, 2018). In der SCA3 ist die CAG-Wiederholungserweiterung in Exon 10 des *ATXN3*-Gens zu finden (Haberhausen et al., 1995).

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 gilt nicht nur als Polyglutamin-Erkrankung, sondern wird auch zu den neurodegenerativen Erkrankungen, welche Kennzeichen der unaufhörlich fortschreitenden Funktionsstörung von Gliazellen (und deren Netzwerken), Neuronen und Synapsen aufweisen, gezählt (Höglund & Salter, 2013; Pathak et al., 2022). Die Proteine, welche mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, verändern die Proteinkonformation aufgrund der Erweiterung des Polyglutamin-Traktes und somit kommt es zur Proteinaggregation (Shao & Diamond, 2007). Die neurodegenerativen Erkrankungen, welche heterogene klinische und pathologische Merkmale besitzen, werden aktuell in die drei Kategorien anatomische Verteilung der Neurodegeneration, primäre klinische Merkmale und grundlegende molekulare Anomalien eingeteilt (Emard et al., 1995; Pathak et al., 2022). Die beste Diagnostik und

somit die neuropathologische Beurteilung der neurodegenerativen Erkrankungen, zu denen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Morbus Huntington und SCA3 zählen, ist momentan die Autopsie (Dickson, 2018; Dugger & Dickson, 2017; Lane et al., 2018; H. L. Paulson et al., 2017; Stevanin & Brice, 2008). Es ist festzuhalten, dass es für Neurodegenerative Erkrankungen aktuell nur symptomatische Behandlungen gibt, aber mehr Menschen von diesen Erkrankungen als von Krebs-Erkrankungen betroffen sind. Bis 2050 wird die Zahl der neurodegenerativ Erkrankten wahrscheinlich um das Dreifache steigen (Balusu et al., 2023).

1.4 Epidemiologie der Spinozerebellären Ataxie

In der Studie von Ruano et al., 2014 wurde die Prävalenz der hereditären Kleinhirntaxien, welche im Durchschnitt bei 2,7 Fällen pro 100.000 Personen lag, ermittelt (Ruano et al., 2014). Die Europäischen Union legte fest, dass Erkrankungen mit einer Prävalenz von nicht mehr als 5 von 10.000 Menschen als Seltene Erkrankungen (SE), zu denen mehr als 6.000 verschiedene Erkrankungen gezählt werden, zusammengefasst werden. In der EU sind 30 Millionen Personen von SE betroffen, in Deutschland gibt es ca. vier Millionen SE-Erkrankte. Die Seltenen Erkrankungen definieren sich mit meist chronischem Verlauf, unterschiedlichen und komplexen Krankheitsbildern und eingeschränkter Lebenserwartung (Bundesministerium für Gesundheit, 2023). Die Prävalenz der ADCA liegt weltweit bei 2,7 pro 100.000 Personen. Der häufigste Subtyp der Spinozerebellären Ataxie ist die SCA3, gefolgt von SCA2 und SCA6 (Ruano et al., 2014). Auf der azorischen Insel Flores liegt der Prävalenzwert von SCA3 bei 1:103 und gilt als höchste gemessene Prävalenz weltweit (Lima et al., 1998). SCA3 ist in weiteren Ländern wie Brasilien mit 69-92%, China mit 48-49%, den Niederlanden mit 42% und Japan mit 26-63% aller SCA-Familien vertreten. In anderen Ländern wie Italien mit 1% und Südafrika mit 4% hingegen gilt SCA3 als seltenerer Subtyp der SCAs (Bettencourt & Lima, 2011). In Deutschland macht die SCA3-Mutation 42% der Spinozerebellären Ataxien aus (Schöls et al., 1997).

1.5 Das *Ataxin-3* Gen

Das *Ataxin-3* Gen, welches für die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 verantwortlich ist, konnte auf dem Chromosom 14q32.1 lokalisiert werden (Schöls et al., 1995; Takiyama et al., 1993). Das *Ataxin-3* Gen (*ATXN3*-Gen, *MJD1*-Gen) umfasst 48.240 Basenpaare (bp), besteht aus elf Exonen, von denen im Exon zehn die CAG-Wiederholungen (*CAG-Repeats*) zu finden sind. Im humanen Gehirn und non-nervalen Gewebe sind 54 verschiedene alternative Spleißvarianten bekannt (Bettencourt et al., 2010). Die Studie von Ichikawa et al., 2001 konnte durch Northern-Blots beweisen, dass das *ATXN3*-Gen ubiquitär exprimiert wird, da in allen untersuchten humanen Geweben nachweisbare Mengen von *ATXN3*-mRNA vorhanden waren (Ichikawa et al., 2001). Die Mutationen des *ATXN3*-Gens bestehen fast nur aus *CAG-Repeats* und werden nur durch ein Lysin-Codon nahe des Starts der Wiederholung interpelliert (Kawaguchi et al., 1994). Mehrere den *Repeats* angrenzende spezifische Einzelnukleotid-Polymorphismen haben auf die CAG-Wiederholungen sowohl in cis als auch in trans Effekte. Dadurch wurde neben den kurzen Tandem-Wiederholungen und dem CAG-Trakt mehr Verständnis für die *Repeat*-Instabilität und den Ursprung der *ATXN3*-Mutation gewonnen (Maciel et al., 1999; Martins et al., 2006). Martins et al., 2006 gehen davon aus, dass die Entwicklung des *CAG-Repeats* im *ATXN3*-Gen durch einen mehrstufigen Mutationsmechanismus entstanden sei (Martins et al., 2008).

1.6 Das *ATXN3* Protein

Das Proteinprodukt des *Ataxin-3* Gens heißt *ATXN3* Protein. Das nicht-expandierte, also gesunde, humane *ATXN3* hat ein Molekulargewicht von ca. 42 kDa; die exakte Größe ist abhängig von den PolyQ-Wiederholungen im C-Terminus (Costa & Paulson, 2012; Kawaguchi et al., 1994). Übereinstimmend liegen neben den Transkripten des *ATXN3* Gens verschiedene Isoformen vom Proteinprodukt vor (G. Wang et al., 1997). *ATXN3* besteht aus einem strukturierten kompakten von 198 Aminosäuren bestehenden N-Terminus – der katalytischen Josephin-Domäne – und einem flexibleren C-Terminus, der

der Protease zugänglich ist und den PolyQ-Trakt umfasst (Albrecht et al., 2002; Masino et al., 2003).

Das nicht-expandierte ATXN3 gilt als Deubiquitinierendes Enzym (DUB), welches durch Ubiquitinierung reguliert wird und Ub- und PolyUb-Ketten bindet (Burnett et al., 2003; Chung & Baek, 1999; Wilkinson, 1997). Nicht-pathologisches ATXN3 bindet und deubiquitiert teils PolyUb-Ketten, welche von Ub-Ligasen zu Zielproteinen ergänzt wurden (Scaglione et al., 2011). Zudem reguliert ATXN3 im neuronalen als auch peripheren Gewebe unterschiedlicher Zelltypen die Aktivität und Stabilität einiger Proteine. Intrazellulär ist ATXN3 im Zytoplasma, im Kern und in den Mitochondrien lokalisiert (Costa & Paulson, 2012; H. L. Paulson, Das, et al., 1997). Abhängig von den Wechselwirkungen zwischen spezifischen zellulären Bedingungen, Protein-Protein-Interaktionen, posttranslationalen Modifikationen und internen Lokalisierungssignalen wird die subzelluläre Lokalisation von ATXN3 unterschiedlich stark exprimiert (Antony et al., 2009; Macedo-Ribeiro et al., 2009; Reina et al., 2010; Trottier et al., 1998). Durch die Expansion des ATXN3 Proteins scheint dieses auf vielen Ebenen wie der Bildung von unlöslichen Aggregaten, der Anfälligkeit für zelluläre Proteolyse, dem nukleären Transport, den molekularen Wechselwirkungen mit Proteinen und der subzellulären Lokalisation dysfunktional zu sein (Costa & Paulson, 2012).

1.7 Pathologischer Mechanismus der Spinozerebellären Ataxie Typ 3

Es ist zuerst festzuhalten, dass die Pathogenese von SCA3 bisher nicht vollständig verstanden ist und noch zukünftig erforscht werden muss (McLoughlin et al., 2020). Bei SCA3-Erkrankten liegen die CAG-Wiederholungen zwischen ca. 60-87 *Repeats* und gelten als instabiler als normale, nicht-pathologische Wiederholungslängen, welche bei 12 bis ca. 44 *Repeats* auf dem *ATXN3*-Gen liegen (Maciel et al., 1995; H. Paulson, 2018; Schöls et al., 2004). Die Spanne von ca. 45 bis 60 *Repeats* ist groß und gilt als „Schwachstelle“, denn es handelt sich um eine unvollständige Penetranz der Erkrankung ohne oder mit unterschiedlichen Symptomen – vor allem aber dem Restless-Leg-Syndrom (Maciel, 2001; Padiath et al., 2005; H. Paulson, 2018). Dieses Phänomen zeigt sich auch bei der Polyglutamin-Erkrankung Chorea-Huntington (Rubinsztein et al.,

1996). Je mehr CAG-Wiederholungen vorliegen, desto früher bricht aller Wahrscheinlichkeit die Erkrankung aus und desto größer ist die Schwere dieser Krankheit (H. Paulson, 2018; Schöls et al., 2004). Die *Repeats* neigen dazu, sich bei der Übertragung auf die nächste Generation zu verlängern, somit ist mit dem Phänomen der klinischen Antizipation, also der Verschlimmerung des Krankheitsverlaufs in einer Familie von Generation zu Generation, zu rechnen. Die Antizipation tritt häufig bei Polyglutamin-Erkrankungen auf (Klockgether et al., 2019; H. Paulson, 2018). In einer Familie mit SCA3-Erkrankten kann es zur Homozygotie kommen, das bedeutet, dass auf beiden Allelen das *ATXN3*-Gen mutiert ist. Diese Form der Erkrankung ist extrem selten. Die erkrankten, homozygoten SCA 3-PatientInnen leiden an einem früheren Beginn und einer schwereren Form der Krankheitssymptome (D. R. Carvalho et al., 2008). Zur Antizipation führt zudem die Instabilität der Mitose und Meiose, welche expandierte CAG-Wiederholungen beeinflussen. Bei der väterlichen Meiose ist die Instabilität charakteristisch. Dies führt dazu, dass in der mRNA des Spermiums, der motilen männlichen Keimzelle, die *CAG-Repeats* verlängert werden (Ikeuchi et al., 1996; Takiyama et al., 1995). Das kann bedeuten, dass Familienmitglieder männlichen Geschlechts mit intermediärer Länge von *CAG-Repeats* aufgrund der meiotischen Instabilität an die nächste Generation pathologische Expansionen der CAG-Wiederholungen vererben können, wodurch es zum erstmaligen Auftreten der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 kommen kann (Schöls et al., 2004). Der Ausbruch der Krankheitssymptome ist aber nur mit 45-62% der Länge der CAG-Wiederholungen gemein. Zwischen Familienmitgliedern ist die von der Länge der CAG-Repeats unabhängige Varianz des gemeldeten Krankheitsbeginns (Age at Onset, AAO) deutlich geringer als zwischen Erkrankten unterschiedlicher Familien. Es muss in Betracht gezogen werden, dass sowohl andere genetische Faktoren oder geografische Herkunft eine Rolle spielen (Schmitz-Hübsch et al., 2008; van de Warrenburg et al., 2005).

Da in dieser Dissertation die Methode der Immunhistochemie verwendet wurde und aufgrund dessen Sagittalschnitte von SCA3 Knock In (KI) Mäusen mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) mit denen von wildtypischen, gleichaltrigen Mäusen verglichen wurde, wird im Folgenden die Pathogenese von SCA3 auf histologischer Ebene beleuchtet. Zuerst sollte festgehalten werden, dass pathologische Studien belegen, dass das Gehirnvolumen von SCA3-PatientInnen deutlich reduziert ist und somit weniger wiegt

Einleitung

als das von gesunden ProbandInnen (Rüb et al., 2008; Yamada et al., 2008). Generell wurde in verschiedenen Gehirnarealen und im Rückenmark ein Neuronenverlust sowie die Schädigung dieser Zellen ausgemacht. Makroskopisch betrachtet sind eine Depigmentierung der Substantia nigra und eine atrophische Veränderung des Cerebellums, der Pons, der Medulla oblongata, des Pedunculus cerebellaris medius (medialer Kleinhirnstiel) und der Hirnnerven Nervus oculomotorius (N. III) und Nervus hypoglossus (N. XII) zu erkennen (Rüb et al., 2002, 2013). Ein neuronaler Verlust liegt bei der Somatomotorik wie bei der Basalganglienschleife und beim Tractus cerebellothalamicus, der größten Efferenz des Cerebellums, und dem Truncus encephali (Hirnstamm) vor. Darüber hinaus sind die sensorischen Systeme, zu denen die visuellen, auditiven und somatosensorischen Bereiche gehören, als auch die oculomotorischen und vestibulären Systeme betroffen. Ferner sind verschiedene Neurotransmittersystem von der Erkrankung betroffen und leiden unter einem neuronalen Verlust. Zu diesen zählen die GABAergen, cholinergen, adrenergen und dopaminergen Systeme (Hoche et al., 2008; Kumada et al., 2000; Robitaille et al., 1997; Rüb et al., 2002, 2013; Scherzed et al., 2012). Sowohl in den degenerierten als auch gesunden Hirnregionen kann es zur Astrogliose kommen. Dies wird als vermehrtes Auftreten hypertropher Astrozyten wegen des Untergangs benachbarter Neurone bezeichnet (Hoche et al., 2008; Rüb et al., 2002). In degenerierten Kernen können die Mikrogliazellen hochreguliert werden (Hoche et al., 2008; H. L. Paulson, Das, et al., 1997; Rüb et al., 2002). Ein weiteres histopathologisches Charakteristika von SCA3 sind Proteinaggregate in neuronalen Zellkernen; diese werden neuronale intranukleäre Einschlusskörperchen genannt. In den 1990ern wurden diese ausschließlich in degenerierten Hirnarealen nachgewiesen (H. L. Paulson, Perez, et al., 1997; Schmidt et al., 1998), seit den 2000ern ist bekannt, dass intranukleäre Einschlusskörperchen auch in Hirnregionen zu finden sind, die normalerweise bei SCA 3 nicht betroffen sind (Schöls et al., 2004; Yamada et al., 2001). Paulson et al., 1997 beschrieben in ihrer Studie, dass die Aggregation durch verschiedene Mechanismen gefördert werden könnte. Zu diesen gehören eine erhöhte Gesamtexpression von ATXN3, eine angestiegene Produktion des proteolytischen Glutaminfragments, ein verstärktes Transportieren von ATXN3 zum Zellkern und eine gesteigerte Fehlfaltung des entstehenden Polypeptids oder Entfaltung des reifen Proteins (H. L. Paulson, Perez, et al., 1997). Die C-terminalen Fragmente von ATXN3 sind besonders im Gehirn an der

Einleitung

Bildung intranuklearer Aggregate beteiligt (Hsu et al., 2017; Simoes et al., 2012) und es scheint, dass die proteolytische Spaltung Voraussetzung für die Aggregatbildung sei; dies würde die Hypothese des toxischen Fragments stützen. Diese geht davon aus, dass die proteolytische Produktion von PolyGlutamin-haltigen Fragmenten aus dem expandierten ATXN3-Protein den von nukleären Einschlusskörperchen bildenden und zellulärer Dysfunktion verbundenen Aggregationsprozess einleitet (Haacke et al., 2006). Die Hypothese des toxischen Fragments wurde zuerst bei der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Huntington mit seinem pathologischen Protein Huntingtin aufgestellt (Rubinsztein, 2002; Wellington et al., 1997). Zudem bewies eine Studie unter Verwendung des SCA3 Mausmodells, bei dem die Mäuse nur das N-terminale nicht Polyglutamin-haltige Ataxin-3-Fragment enthalten, dass der N-Terminus von Ataxin-3, welcher die JD enthält, zu den Krankheitssymptomen von SCA3 beitragen kann (Hübener et al., 2011). Abschließend sollte festgehalten werden, dass international für die Pathogenese von SCA3 anerkannt wurde, dass eine Sequestrierung von kritischen Proteinqualitätskontrollmechanismen in Proteinaggregaten neuronalen Stress hervorrufen kann; dies betrifft voraussichtlich auch andere Polyglutamin-Erkrankungen. Trotzdem ist aktuell die genaue Rolle der ATXN3-Aggregation im pathologischen Mechanismus der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 noch unklar (McLoughlin et al., 2020; H. L. Paulson et al., 2017). Die Aggregation führt zu einer Belastung der neuronalen Zellen. Wahrscheinlich kommt es während des Aggregationsprozesses zu einer Akkumulation der Faltungszwischenprodukte und der fehlgefalteten Formen der Proteine. Durch intermolekulare Kontakte zwischen nicht-nativen Formen werden verschiedene Aggregatarten, wie zum Beispiel amorphe Aggregate oder Amyloidfibrillen, gebildet. Die am besten erforschten Proteinaggregate sind die neuronalen Kerneinschlüsse, welche weitere Proteine – beispielsweise Hitzeschockproteine – binden (H. L. Paulson, 1999; Seidel et al., 2012). Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle (PQC) verbessern *On-Pathway*-Reaktionen, welche das Fortschreiten fehlgefalteter Zwischenprodukte in Richtung des nativen Zustands fördern, und blockieren *Off-Pathway*-Reaktionen, welche Aggregation und Fehlfaltung bewirken (Da Silva et al., 2019; Jahn & Radford, 2005). Die Kenntnis von ATXN3 bezüglich Aggregation und Faltung stammt vor allem aus *in-vitro* Studien (A. L. Carvalho et al., 2018). Die ATXN3-Selbstorganisation, welche beim nicht-pathologischen als auch

PolyQ-expandierten ATXN3 dieselbe ist, findet auf der N-terminalen Josephin-Domäne statt. Jedoch findet dieser Schritt beim mutierten ATXN3 schneller statt. Protofibrillen und Oligomere sind gegenüber SDS (Natrium-Dodecylsulfat) empfindlich. Zudem können diese durch den Anti-Oligomer-spezifische Antikörper A11 erfasst werden. Bei einem weiteren Schritt der *ATXN3*-Aggregation, der nur beim PolyQ-expandierten *ATXN3* erfolgt, werden reife und SDS-resistente *ATXN3*-Fibrillen gebildet (Ellisdon et al., 2006). Es scheint, dass die *ATXN3*-Aggregation direkt oder indirekt auf ein metastabiles Subproteom abzielt, wodurch die multifaktorielle Toxizität vermehrt anfällt und viele wesentliche Zellfunktionen zusammenbrechen (Da Silva et al., 2019).

1.8 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (HSP) sind Schlüsselregulatoren der ordnungsgemäßen Faltung, dem rechtzeitigen Abbau von Proteinen in allen Zellkompartimenten als auch der Proteinaggregation (Kampinga & Bergink, 2016; Sajjad et al., 2010). Als Teil der Hitzeschockreaktion werden die HSPs produziert und sie gehören zu den am höchsten exprimierten Klassen zellulärer Proteine (Garrido et al., 2001). Darüber hinaus gehören Hitzeschockproteine zu den Chaperonen (Becker & Craig, 1994). Der Faltungsprozess der Proteine ist von Natur aus fehleranfällig, was mit der großen Anzahl von möglichen Konformationen einer Proteinkette zusammenhängt. Zudem sind viele Wechselwirkungen und Aminosäurekontakte an der Faltung beteiligt. Während des Faltungsprozesses müssen die Moleküle kinetische Energiebarrieren überwinden und aufgrund dessen Faltungszwischenprodukte besiedeln (Brockwell & Radford, 2007). Vor allem bei größeren Proteinen kommen kinetisch abgefangene Zwischenprodukte häufiger vor, wodurch die Gefahr der Fehlfaltung wegen der Bildung nichtnativer Wechselwirkungen erhöht ist (Dinner et al., 2000). Langsame Schritte bei der Faltung können zur Akkumulation von Faltungszwischenprodukten führen, weshalb diese Schritte die Prolylisomerisierung und Bildung von Disulfidbindungen enthalten und durch die Prolylisomerasen und die Proteindisulfidisomerasen beschleunigt werden können (Braakman & Hebert, 2013; Schmidpeter & Schmid, 2015). Zu den molekularen Chaperonen, welche bei der *de novo* Faltung funktionell viel umsetzen, gehören unter

Einleitung

anderem die Hitzeschockproteine (wie zum Beispiel HSP70, HSP90), welche hydrophobe Aminosäurereste erkennen, die von nichtnativen Proteinen freigelegt werden. Die Hitzeschockproteine fördern die Faltung durch Adenosin-5'-triphosphat regulierte Zyklen der Proteinbindung und -freisetzung. Anhand dieses Mechanismus wird durch die Freisetzung von hydrophoben Elementen der Fortgang der Faltung ermöglicht; durch die erneute Bindung nichtnativer Proteine entsteht eine Blockade der Aggregation sowie eine Umkehrung fehlgefalteter Zustände. Proteine werden *in vivo* im Zusammenhang mit der vektorialen Translation der Polypeptidkette auf dem Ribosom von N- zum C-Terminus gefaltet (Balchin et al., 2016). Beweise deuten darauf hin, dass Hitzeschockproteine die promiskuitive Fähigkeit der Peptidbindung besitzen. Diese Promiskuität steht im Einklang mit der grundlegenden Rolle von Hitzeschockproteinen bei der Faltung und dem Zusammenbau von Proteinen (Srivastava, 2002). In vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Huntington, Morbus Alzheimer und verschiedenen Subtypen der Spinozerebellären Ataxie (z.B. SCA1-3) sind in *post-mortem* Gehirnproben Proteinaggregate zu finden (Soto, 2003). Deshalb haben Hitzeschockproteine das Interesse der Forschenden der neurodegenerativen Erkrankungen geweckt, denn ein erfolgreicher Einsatz von Hitzeschockprotein-assoziierten Medikamenten könnte eine große Rolle bei der Behandlung von PatientInnen spielen (Sajjad et al., 2010). Zudem scheint eine Steigerung der Aktivität oder Expression bestimmter Hitzeschockproteine entscheidend bei der Verzögerung des Ausbruchs von neurodegenerativen Erkrankungen zu sein. Die Nomenklatur der HSP setzt sich aus den Molekulargewichten ihrer zuerst entdeckten, hitzeinduzierbaren Mitglieder zusammen, wie zum Beispiel HSP27, welches ein 27 kDa großes Hitzeschockprotein ist. Es ist jedoch bekannt, dass die einzelnen Proteine mit häufig unterschiedlichen Molekulargewichten und Lokalisationen in verschiedenen Zellkompartimenten in Proteinfamilien mit ähnlichen Domänstrukturen und -funktionen zugeordnet werden können (Kampinga & Bergink, 2016). Deswegen wurde eine neue Nomenklatur eingeführt. Es gibt nun eine Gruppe für die kleinen Hitzeschockproteine, also die mit einem geringeren Molekulargewicht; diese werden als HSPB – *heat shock protein family B (small)* – bezeichnet und zu dieser Familie gehört auch das oben genannten HSP27, nun HSPB1. Die Familie der kleinen Hitzeschockproteine zeichnen sich durch eine charakteristische konservierte kristalline Domäne aus, welche von variablen N- und C-Termini flankiert

Einleitung

wird, und sind häufig in oligomeren Komplexen zu finden, an welchen ein oder mehrere Familienmitglieder beteiligt sind (Kampinga et al., 2009). Die HSP70 Mitglieder gehören nun zur Gruppe der HSPA – *heat shock protein family A* – und zudem kodiert das menschliche Genom für die Mitglieder der HSPA-Familie mit Ausnahme der vielen Pseudogene (Brocchieri et al., 2008; Kampinga et al., 2009). Die HSP40 Familie wird aufgrund der neuen Nomenklatur als DNAJ Gruppe – *DnaJ heat shock protein family* – bezeichnet und ist wahrscheinlich die größte HSP-Familie beim Menschen. Die DNAJ Gruppe enthält eine konservierte J-Domäne, welche für die HSPA-Rekrutierung und Stimulierung der HSPA-ATPase-Aktivität verantwortlich ist (Kampinga et al., 2009). Die HSP90 Familie wird nun als HSPC – *heat shock protein family C* – bezeichnet und für die Mitglieder von HSP110 gibt es die neue Bezeichnung HSPH – *heat shock protein family H*, welche durch das menschliche Genom kodiert werden. HSPH-Gene kodieren eine Familie von Hitzeschockproteinen mit hoher Homologie zu HSPA-Mitgliedern; jedoch zeigen diese eine Ausnahme durch die Existenz einer längeren Linkerdomäne zwischen der N-terminalen ATPase-Domäne und der C-terminalen Peptidbindungsdomäne (Kampinga et al., 2009). HSPH-Mitglieder scheinen Nukleotidaustauschfaktoren für die HSPA-Familie zu sein (Dragovic et al., 2006; Raviol et al., 2006). Beispielhaft werden nun zwei Hitzeschockproteine mit ihrer Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben. HSPA2 scheint eine große Rolle an vielen Zellprozessen wie der synaptischen Übertragung, Autophagie und Zelltodsignalisierung zu spielen (Stetler et al., 2010). Es konnte festgestellt werden, dass die Erhöhung von HSPA2 die Pathogenese von Morbus Alzheimer, einer neurodegenerativen Erkrankung, begünstigt (Petyuk et al., 2018). Bei der Pathogenese von SCA3 scheint HSP27 eine Rolle zu spielen und spiegelt wahrscheinlich eine veränderte Fähigkeit der Zellen, welche durch das expandierte *ATXN3* exprimiert werden, wider (Hsieh et al., 2005). In einer Studie von Di Domenico et al., 2010 wurden die Hitzeschockspiegel in Morbus Alzheimer PatientInnen im Hippocampus, im unteren parietalen Lobulus und im Cerebellum *post-mortem* gemessen, um zu überprüfen, ob bei dieser neurodegenerativen Erkrankung Stress im Gehirn vorliegt. Hierfür wurden ProbandInnen ausgewählt, die schon amnestisch leichte kognitive Beeinträchtigungen (aMCI), also den Übergang zwischen physiologischem Alterungsprozess und pathologischem Prozess in Form von Morbus Alzheimer, aufwiesen und in Bezug zu

gesunden Kontrollpersonen gesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Induktion der Hitzeschockproteine vorliegt und somit die Chaperon-Proteinsysteme die Pathogenese von Morbus Alzheimer verändern und in Gang setzen kann. Vor allem wurde in dieser Studie eine erhöhte Veränderung von HSPA2 und HSP27 im Gewebe der PatientInnen mit aMCI gefunden (Di Domenico et al., 2010). Dies ist nur ein Beispiel von vielen und verstärkt die Begründung, wieso Hitzeschockproteine im Rahmen der SCA3 genauer analysiert werden müssen.

1.9 Klinische Symptomatik der SCA3

Der Ausbruch der Erkrankung, die sich durch einen moderaten Krankheitsprogress darstellt, beginnt meist in der dritten bis fünften Lebensdekade. Das gemeldete Krankheitsalter (Age At Onset) weist eine Spannweite von 4 bis 70 Jahren auf und ist unter anderem von der Länge der CAG-Wiederholungen von *ATXN3* abhängig (D. R. Carvalho et al., 2008; Klockgether et al., 2019; Klockgether & Evert, 1998). Das Markenzeichen von SCA3 stellt die variable Symptomatik dar (Costa & Paulson, 2012). Meist manifestiert sich als erstes die zerebelläre Ataxie, die als Leitsymptom der SCA3 gilt, aber es können auch zuerst nicht-ataktische Symptome auftreten (Globas et al., 2008; van Gaalen et al., 2011). Das Leitsymptom kann Dysarthrie, Dysmetrie und ataktischen Gang beinhalten. Weitere Merkmale sind die pathologische Okulomotorik mit Ophthalmoplegie, Pyramidenbahnzeichen, Dystonie, Steifigkeit, Restless-Leg-Syndrom, Muskelatrophie und sensorische Störungen (Costa & Paulson, 2012; Riess et al., 2008). Zu den nicht-ataktischen Symptomen werden bei der SCA3 vor allem okulomotorische Störungen, Harnfunktionsstörung, sensorische Symptome, Faszikulationen, Muskelatrophie, Spastik, Areflexie und Hyperreflexie gezählt. Desweiteren gehören die Bewegungsstörungen, welche teils Hinweise auf den Subtyp der Spinozerebellären Ataxie geben, zu den nicht-zerebellären Merkmalen der SCA. SCA3-Erkrankte können eine oder mehrere Symptome manifestieren. Die häufigsten Bewegungsstörungen von SCA3 sind Parkinsonismus, Dystonie, Myoclonus und Chorea (van Gaalen et al., 2011). Mobilität und Kommunikationsfähigkeiten der SCA3-Erkrankten sind stark eingeschränkt, wodurch die Lebensqualität stark abnimmt (Schöls et al., 2004). Zudem ist die Lebenserwartung von PatientInnen mit der Spinozerebellären

Ataxie Typ 3 deutlich reduziert. Die häufigste Todesursache sind die Lungenerkrankungen wie Lungenentzündung oder Lungeninsuffizienz, die aufgrund der Krankheitssymptome erschwert auftreten (Diallo et al., 2018). Für die Bewertung der klinischen Symptomatik der ataktischen und nicht-ataktischen Störungen wurden zwei Bewertungsskalen eingeführt. Diese sind für die Diagnose und derzeitigen Therapien hilfreich. Für die Ausprägung der nicht-ataktischen Symptome dient das *Inventory of Non-Ataxia Signs* (INAS-Score) (Jacobi et al., 2013), währenddessen für die Ausprägung der ataktischen Symptomatik der *Scale for the assessment and rating of ataxia* (SARA-Score) verwendet wird (Schmitz-Hübsch et al., 2006).

1.10 Diagnostik und Therapie der Machado-Joseph-Krankheit

Um den Nachweis der SCA3-Mutation bei klinischem Verdacht zu bestätigen, können molekulare Tests durchgeführt werden. Dies ist sehr nützlich, da die Erkrankung eine variable Symptomatik, welche auch auf andere Krankheiten oder SCA-Typen deuten könnte, aufweist und nur durch einen genetischen Test die Diagnose ausgesprochen werden kann (Lopes-Cendes et al., 1996; Maciel, 2001). Den Angehörigen und PatientInnen stehen genetische Beratungsstellen zur Verfügung, um die Vererbung und damit potenzielle Erkrankung zu besprechen; dies dient als Prävention. Mittels Pränataldiagnostik kann bestimmt werden, ob der Fötus SCA3 im Erbgut trägt. Dies wird durch die Amniozentese durchgeführt, bei welcher durch Punktion der Fruchtblase Fruchtwasser entnommen wird, und daraufhin wird der Chromosomensatz des im Bauch der Mutter heranwachsenden Kindes untersucht. Allerdings kann weder der Krankheitsbeginn noch der Schweregrad vorhergesagt werden (Sequeiros et al., 1998). In § 15 Abs. 2 des deutschen Gendiagnostikgesetzes (GenDG) ist festgehalten, dass eine Pränataldiagnostik nicht durchgeführt werden darf, wenn nach dem allgemein anerkannten Stand der medizinischen Wissenschaft und Technik die Erkrankung nach der Vollendung des 18. Lebensjahres ausbricht. Dies erklärt, warum in Deutschland kein Fötus mit Verdacht auf SCA3 genetisch untersucht werden darf, da durchschnittlich die Symptome der Erkrankung in der dritten bis fünften Lebensdekade auftreten (Klockgether et al., 2019). Der Gesetzgeber hat dieses Verbot unter anderem damit

Einleitung

begründet, dass ein Wissen der Eltern über die mögliche Erkrankung des Kindes zu schwer lösenden familiären Problemen führen könne (Beschlussempfehlung des Gesundheitsausschusses des Deutschen Bundestages vom 22.04.2009, Drs. 16/12713, dort Seite 31), zumal dadurch auch das Recht auf freie Entfaltung der Persönlichkeit aus Art. 2 Abs. 1 des Grundgesetzes betroffen sein dürfte.

Die Erkrankung Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 ist seit den 1970er Jahren bekannt, dennoch gibt es für diese immer noch keine kurative Therapie (Braga Neto et al., 2016; McLoughlin et al., 2020). Eine Schwierigkeit zum Erreichen einer wirksamen Therapie ist die Heterogenität, denn für jeden Genotyp müssen spezifische Therapieansätze gefunden werden (Klockgether et al., 2019). Dennoch können mehrere symptomatische Ansätze die Krankheit mindern (Braga Neto et al., 2016). Durch Physiotherapie, Ergotherapie und Logopädie werden die PatientInnen unterstützt (Klockgether et al., 2019). Wobei die Physiotherapie das Mittel der Wahl ist, denn durch diese können Muskelkraft, Körperhaltung, Koordination, Gleichgewicht und Gang verbessert werden. In einer Studie von Ilg et al., 2010 erhielten PatientInnen ein vier-wöchiges Physiotherapieprogramm und es wurde ein individueller Trainingsplan für ein Jahr erstellt, den die PatientInnen jeden Tag eine Stunde absolvieren sollten. Am Ende des Jahres wurde der SARA-Score gemessen und dieser sank signifikant ($p = 0,001$) mit -4,4 Punkten im Durchschnitt im Vergleich vor der Intervention. Es wurden sowohl die motorischen als auch Gleichgewichtsfähigkeiten verbessert. Eine Physiotherapie kann also die Lebensqualität von Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung erhöhen (Ilg et al., 2010). Außerdem wurden schon einige Ergebnisse mit bestehenden Arzneimitteln wie Lithiumcarbonat, Vareniclin, Valproinsäure und Riluzol erzielt (Lei et al., 2016; Romano et al., 2015; Saute et al., 2014; Zesiewicz et al., 2012). Zum Beispiel konnte mit der Einnahme von Riluzol, welches zur Behandlung der amyotrophen Lateralsklerose angewendet wird, ein SARA-Score mit 1,02 Punkten weniger als vor der Riluzol-Einnahme erreicht werden. Währenddessen wurde bei der Placebo-Kohorte ein durchschnittlicher Anstieg von 1,66 Punkten gemessen. Zum derzeitigen Stand wird Riluzol nicht eingesetzt, da es weitere Forschungen im größeren Rahmen benötigt. (Romano et al., 2015). Da aktuell noch an der kausalen Therapie geforscht wird und kein kuratives Medikament auf dem Markt ist, wird die symptomatische Therapie bei PatientInnen mit SCA3 angewendet. Beispielhaft wird die symptomatische Behandlung

des Restless-Leg-Syndroms – eine sehr häufige schlafbedingte Bewegungsstörung – dargestellt. Dopaminerge Medikamente sind Mittel der Wahl für die Behandlung des Restless-Leg-Syndroms, da durch diese eine schnelle und drastische Verbesserung des Syndroms erzielt werden kann. Eine Hypofunktion der Dopamin-A11-Zellgruppe im subparafaszikulären Thalamus könnte ein Grund für die Pathogenese des Restless-Leg-Syndroms sein. Levodopa verbessert zwar die Symptome, jedoch gibt es Anzeichen, dass durch dieses die Augmentation der Beschwerden und das Rebound-Effekt – das verstärkte Wiederauftreten von Symptomen einer medikamentös behandelten Erkrankung nach Absetzen des Medikaments – auftreten kann. Dopaminergen Agonisten rufen weniger Nebenwirkungen hervor als Levodopa, weshalb diese aktuell als Erstlinienbehandlung vom Restless-Leg-Syndrom gelten. Außerdem haben dopaminerge Agonisten eine längere Halbwertszeit, wodurch das Syndrom die ganze Nacht über mit einer Dosierung am Abend vermindert bzw. auf null reduziert werden kann. Morbus Parkinson wird ebenfalls mit dopaminergen Agonisten behandelt, wobei die Dosierung bei Parkinson deutlich höher als beim Restless-Leg-Syndrom von SCA3 ist (Ferini-Strambi, 2009).

Abschließend ist zu nennen, dass Personen mit Spinocerebellärer Ataxie Typ 3 eine engmaschige ärztliche Betreuung benötigen und vor allem regelmäßig neurologische Untersuchungen durchgeführt werden sollten, um den Krankheitsverlauf zu beurteilen. Dadurch können Krankheitssymptome erfasst und mit möglichen Pharmazeutika gemildert werden. Zudem ist es wichtig, mit den Betroffenen als auch Angehörigen Prognose, Palliativversorgung und zukünftige Pflegeplanung zu besprechen (Klockgether et al., 2019).

1.11 Biomarker in der SCA3 Forschung

Biomarker wurden von der *Biomarkers Definitions Working Group*, 2001 definiert als ein objektiv gemessener Indikator für physiologische biologische als auch pathogene Prozesse oder für pharmakologische Reaktionen auf eine therapeutische Intervention. Vor allem in frühen Studien (beispielsweise *in-vivo*-Studien in Tiermodellen oder klinischen Studien in der Frühphase) kann anhand von Biomarkern ein *Proof-of-Concept* etabliert werden. Des Weiteren werden Biomarker als diagnostisches Instrument zur

Einleitung

Diagnostik einer Krankheit oder eines pathologischen Zustands, wie zum Beispiel ein erhöhter Blutzuckerspiegel bei Diabetes mellitus, oder als Indikator für die Krankheitsprognose, beispielsweise eine Messung der Tumorschrumpfung eines Karzinoms, verwendet. Ferner können Biomarker zur Vorhersage und zum Überwachen des klinischen Ansprechens auf einer Intervention genutzt werden, beispielhaft ist hier die Cholesterinkonzentration im Blut zur Bestimmung des Risikos einer Herzerkrankung, oder für die Klassifizierung des Ausmaßes der Krankheit, wie zum Beispiel bei einem Karzinom die im Blut vorliegende prostataspezifische Antigenkonzentration (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Ziel der SCA-Forschung ist eine Validierung der Biomarker, sodass wirksame Möglichkeiten zur Überwachung des Ausbruchs, des Fortschreitens oder einer kurativen Behandlung gefunden werden können. Gleichzeitig soll es weniger Variabilität und mehr Objektivität in den klinischen Bewertungsskalen geben (Brooker et al., 2021).

Zum derzeitigen Standpunkt der Forschung können bildgebende Biomarker in der Forschung verwendet werden, welche aus der Neuroimaging-Bildgebung bei Patienten in der Klinik entstanden. Die jeweilige Degeneration kann mit einer Analyse, die auf der *Region of Interest* (ROI) beruht, quantifiziert werden (Brooker et al., 2021). Anomalien, die durch bildgebende Verfahren erkannt werden können, haben eine Korrelation zum klinischen Erkrankungsbild, welches durch verschiedene Bewertungsskalen gemessen werden kann. Somit können bildgebende Methoden eine Unterstützung für die Vorhersage der phänotypischen Umwandlung sein (Coarelli et al., 2018; Meira et al., 2019). In der Magnetresonanztomographie lassen sich strukturelle Veränderungen des Gehirnvolumens finden. Dazu gehören weiße und graue Substanz im Cerebellum und Truncus encephali, als auch Basalganglien, Rückenmark und Vermis cerebelli (D'Abreu et al., 2012; Fahl et al., 2015; Kang et al., 2014). Zudem wurden Veränderungen chemischer Art in der Magnetresonanztomographie (MRS) und des Stoffwechsels in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) festgestellt. Auch in der Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT), eine Variante der Emissionstomographie und Darstellung der Verteilung eines Radiopharmakons im Körper, wurden funktionelle und metabolische Veränderungen gefunden (Brooker et al., 2021). Neben den bildgebenden Biomarkern gibt es auch fluide Biomarker, welche auf verschiedene neurodegenerative Erkrankungen anzuwenden sind. Die vielversprechendsten Biomarker sind hier die

Einleitung

Neurofilamente – Intermediärfilamente der Nervenzellen. Bei Morbus Huntington wurden die Neurofilament-Leichtketten (NF-L) im Blut als potenzieller Biomarker gefunden (Brooker et al., 2021). Ein Vergleich mit Chorea-Huntington ist obligat, da es wie SCA3 zu den Polyglutamin-Erkrankungen gehört. Der Serumspiegel von NF-L wurde bei SCA3-erkrankten PatientInnen signifikant erhöht in Bezug zu KontrollprobandInnen gemessen. Außerdem korreliert der Wert von NF-L mit dem SARA-Score, also dem klinischen Schweregrad der SCA3-Erkrankten (Wilke et al., 2020). Das Erkrankungsprotein von SCA3 wurde durch TR-FRET basierte Immunassays in peripheren mononukleären Blutzellen, Fibroblasten, induzierten pluripotenten Stammzellen und *post-mortem* Cerebellum-Gewebe gemessen (Gonsior et al., 2021). In der Studie von Breuer et al., 2022 wurde ein quantitativer Assay entwickelt. Dieser basiert auf einem mit einem Fluorophor markierten, hochspezifischen Antikörper gegen ATXN3 und rekombinatem humanem ATXN3, welcher bis zur Homogenität gereinigt wurde, und wird als Standard zur Bestimmung der absoluten Mengen an ATXN3 eingesetzt. Zudem konnten signifikante Abweichungen von nicht-pathologischem und expandiertem ATXN3 in mononukleären Zellen des menschlichen peripheren Blutes beobachtet werden (Breuer et al., 2022). Außerdem konnte durch die Studie von Hübener-Schmid et al., 2021 belegt werden, dass das expandierte Ataxin-3 im Plasma und Liquor cerebrospinalis durch ein neuartiges SMC-Immunassay quantifiziert werden kann. Der Spiegel von Ataxin-3 scheint im Plasma mit dem Schweregrad der Erkrankung zu korrelieren, zudem konnte aufgrund der Ergebnisse im Plasma zwischen präataktischen MutationsträgerInnen und ataktischen SCA3 PatientInnen unterschieden werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in longitudinalen Analysen von über einem Jahr expandiertes ATXN3 eine hohe Stabilität aufweist. Deshalb hat der Immunassay Potenzial die Forschung zu therapeutischen Medikamenten in SCA3 zu unterstützen. PolyQ-erweitertes Ataxin3 gilt somit auch als Ziel-Biomarker in menschlichen Biofluiden (Hübener-Schmid et al., 2021). In 60 Vollblut-Proben von ESMI-ProbandInnen (siehe 1.12 ESMI-Projekt) wurde eine *cross-sectional* RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hier wurden verschiedene exprimierte Chaperone wie SAFB2, SFSWAP, LTBP4 gefunden, welche eventuell als Biomarker für präataktische und ataktische Krankheitsstadien genutzt werden könnten. Jedoch bedarf es einer longitudinalen Analyse mit größerer Kohortenzahl um diese zu validieren (Raposo et al.,

Einleitung

2023). Für diese Dissertation wurden die drei genannten Proteine aus der Studie von Raposo et al., 2023 bioinformatisch ausgewertet. In der Masterarbeit von Nicole Vasilenko (Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik, Tübingen) wurden mit longitudinalen Blutproben RNA-Sequenzierungen und bioinformatischen Analysen vorgenommen, hier wurden OTOF, SUSD1 und SFT2D2 exprimiert gefunden. SFT2D2 (*SFT2 domain containing 2*) ist ein Vesikeltransporter von Multipassmembranen. Zudem ist SFT2D2 in humanen Gehirnregionen von PatientInnen mit Schizophrenie mit erhöhter Expression im Vergleich zu KontrollprobandInnen zu finden und wird vor allem in immunbezogenen Zellen, wie den Mikroglia im Zentralen Nervensystem (ZNS) und dendritischen Zellen im Peripheren Nervensystem (PNS) exprimiert (Liu et al., 2022). In einer Studie von Yao et al., 2022 wurde SFT2D2 in *post-mortem* Gehirnen von Morbus Parkinson PatientInnen in Bezug zu gesunden ProbandInnen signifikant reguliert gefunden. Zudem wurde eine quantitative Echtzeit-PCR mit peripheren Vollblut-Proben von Parkinson-Erkrankten und Kontrollpersonen durchgeführt, um die Genexpression zu messen. Dabei wurde SFT2D2 mit runterregulierter Expression analysiert. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass SFT2D2 zukünftig ein Biomarker für Morbus Parkinson sein könnte (Yao et al., 2022). Deshalb wurde in dieser Dissertation SFT2D2 zusammen mit OTOF und SUSD1, welche alle in den RNA-Sequenzierungen der longitudinalen Blutproben (Nicole Vasilenko, Masterarbeit) exprimiert waren, mittels quantitativer Echtzeit-PCR und bioinformatischer Auswertung als Biomarker für SCA3 in dieser Arbeit analysiert. Zudem gibt es weitere Literatur, die mögliche Biomarker für die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 verspricht. In einer Studie von Ramani et al., 2017 wurde ACY3 (Aminoacylase 3) mittels quantitativer Echtzeit-PCR in 40 Wochen alten homozygoten YAC84Q Mäusen hochreguliert gefunden. ACY3, welches Acetylcystein und N-acetylierte aromatische Aminosäuren kodiert und in verschiedenen Geweben wie dem Gehirn gehäuft vorkommt (Pushkin et al., 2004), gehört zu den konsistentesten und robustesten hochregulierten getesteten Transkripten (Ramani et al., 2017). Auch auf Proteinebene wurde ACY3 mit Gehirnstammproben von SCA3 PatientInnen in Bezug zu Parkinson PatientInnen untersucht. Hier wurde eine signifikante Erhöhung von ACY3 in den SCA3 Proben entdeckt (Ramani et al., 2017). Dies war ein Grund, um ACY3 in dieser

Dissertation weiter in den oder mittels Proteinmethoden und bioinformatischen Analysen zu erforschen.

Auch CA9 wurde in einer Studie zur Alzheimer Erkrankung exprimiert gefunden, weshalb auch dieses Chaperon in dieser Doktorarbeit auf Proteinebene und mittels bioinformatischer Analyse näher betrachtet wurde (B. Wang et al., 2022). Abschließend ist festzuhalten, dass zwar schon potenzielle Biomarker für Forschung der Spinocerebellären Ataxie Typ 3 analysiert wurden, dennoch bedarf es weiterer Forschung um das Ziel der kausalen Therapie dieser Erkrankung zu erreichen. Darüber hinaus sollte sich vor Augen gehalten werden, dass möglicherweise unterschiedliche Biomarker je nach Anwendung, also Therapie oder Progression, gebraucht werden und eventuell eine Kombination von verschiedenen Biomarkern nötig ist, um valide Aussagen über das Therapieansprechen oder die Progression zu ermöglichen.

1.12 ESMI-Projekt – European Spinocerebellar Ataxia Type 3 / Machado-Joseph-Disease Initiative

Das ESMI-Projekt – European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative – ist ein multizentrisches Projekt, das durch das EU-Programm für Neurodegenerative Erkrankungen (EU Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research (JPND)) von der Europäischen Kommission (Jpco-fuND) gefördert wurde (2016-2019). Das Bundesministerium für Bildung und Forschung förderte das Projekt auf nationaler Ebene. Zu den Zentren des ESMI-Projekts gehören die Standorte Bonn, Tübingen, Nijmegen / Groningen, London, Coimbra und die Azoren. Zudem gibt es weitere Kooperationen mit den USA, Brasilien und Frankreich. Um ein Verständnis für die Erkrankung SCA3, den Krankheitsverlauf und die präataktische Phase als auch über die krankheitsmodifizierenden Faktoren gewinnen zu können, werden Daten von SCA3-Erkrankten, Risikogruppen und Kontrollprobanden gesammelt. Zudem ist der Hauptfokus der Studie, SCA3- assoziierte Biomarker zu finden, welche für zukünftige Therapien bedeutend sein könnten. Zur Datensammlung gehören standardisierte klinisch-neurologische Untersuchungen, MRT-Bildgebungen und Blutentnahmen (optional auch Liquorentnahme). Zusätzlich werden Faktoren zum Lebensstil und zur Lebensqualität

erfasst (<https://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi/>, zuletzt abgerufen am 19.08.23; 19.02 Uhr). Grundlage dieser Dissertation waren hochstandardisierte Blut-Proben. Das Blut wurde nach der Abnahme weiterverarbeitet, um PBMCs, Plasma und Serum zu gewinnen. Die Bioproben wurden entweder direkt in Sammelröhrchen oder in Kryovialen gelagert, um diese zur Isolierung von RNA, DNA, Protein und extrazellulären Vesikeln zu verwenden. Für die Blutabnahme, -weiterverarbeitung und -lagerung wurden strikte Protokolle in allen teilnehmenden Zentren befolgt. Nach der Blutentnahme musste das Blut der ProbandInnen innerhalb von zwei Stunden verarbeitet werden. In dieser Arbeit wurden die Proben des PAXgene RNA-Röhrchens verwendet. Dieses wurde aufrecht für zwei bis sechs Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 24 bis 72 Stunden bei -20 °C eingefroren. Danach wurde das Röhrchen bei -80 °C gelagert. Den PatientInnen, MutationsträgerInnen und Kontrollpersonen wurde bei jeder Sitzung – Baseline, 1. nachfolgende Sitzung, 2. nachfolgender Sitzung etc. – Blut abgenommen, um longitudinale Proben zu gewinnen (Santana et al., 2023).

1.13 Ziel der Dissertation

Das Ziel der Dissertation ist es, Vordaten aus einer longitudinalen Blut-basierten RNA-Sequenzierungsstudie auf RNA- und Protein-Ebene unter Verwendung von humanen und murinen Gewebe zu validieren und dadurch eventuell neue Biomarker für die Krankheitsprogression und / oder als therapeutisches Target zu überprüfen. Es wurde RNA aus der europäischen SCA3 (Spinocerebelläre Ataxie Typ 3) Kohorte verwendet, die sogenannte ESMI-Kohorte. Zudem wurde auf Gewebeproben von humanen *post-mortem* Proben und auf Gewebe- und Proteinproben von SCA3 Knock In Mäusen mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) zurückgegriffen. Außerdem wurden vorausgewertete Daten der longitudinalen RNA-Sequenzierung zur Verfügung gestellt. Zuerst wurden Chaperone aufgrund der vorhandenen Literatur, der RNA-Sequenzierungsdaten und bioinformatischen Auswertung longitudinaler Blutproben (Nicole Vaslienکو, Masterarbeit) und der Studie von Raposo et al., 2023 aus dem Blut von 60 ESMI-Probanden aus der Baseline – erste Untersuchungssitzung – in den Zusammenhang der

Einleitung

neurodegenerativen Erkrankung gestellt und ausgewählt. Hierbei handelt es sich um folgende Proteine: ACY3, CA9, DNAJC13, HDJ2, HSP105, HSP27, HSPA2, LTBP4, OTOF, SAFB2, SFSWAP, SFT2D2, SUSP1. Nachdem die Chaperone ausgewählt wurden, folgte eine bioinformatische Auswertung aller interessierten Proteine mittels *Ingenuity Pathway Analysis* der Firma Qiagen. Sequenzierungs-Daten von SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022), von YAC84Q hemizygoten Mäusen (Cemal et al., 2002) und von SCA3 PatientInnen des ESMI-Projekts wurden für die bioinformatische Analyse verwendet, um die exprimierten Proteine im Gesamtzusammenhang zu bewerten. Daraufhin wurden die Chaperone mittels quantitativer Echtzeit-PCR oder der Proteinmethoden Filter Trap, Western Blot und Immunhistochemie untersucht. Zusammen mit Frau Dr. Jeannette Hübener-Schmid, meiner Betreuerin, wurden Primer für die Quantitative Echtzeit-PCR als auch Antikörper für diese ausgewählt. Dabei wurden die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse in Zusammenhang mit denen der RNA- oder Proteinmethoden gestellt. Es wurden aufgrund der Ergebnisse meiner Dissertation longitudinale Biomarker analysiert, um neue oder bestehende Ansätze für Therapie oder Progression der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 zu finden bzw. zu erweitern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Herkunft der Blutproben und PatientInnenauswahl in ESMI

In dieser Arbeit wurden Blutproben von PatientInnen mit diagnostizierter Spinozerebellärer Ataxie Typ 3, präsymptomatischen Mutationsträgern oder Kontrollprobanden verwendet. Die Proben stammen aus den jeweiligen Zentren (Azoren, Bonn, Coimbra, Nijmegen/Groningen, Tübingen) des ESMI-Projektes, das in der Einleitung beschrieben wurde. Bei den Proben handelt es sich um Paxgene Röhrchen, die für RNA-Sequenzierung bzw. quantitative Echtzeit PCR (qPCR) verwendet werden können. Es liegen Proben von der ersten Visite (Baseline), sowie den jährlich nachfolgenden Blutentnahmen (1. Follow Up, 2. Follow Up etc.) vor. In dieser Dissertation wurde sich vor allem mit den Baseline-Blutproben auseinandergesetzt. Alle Proben wurden standardisiert in den jeweiligen Zentren verarbeitet (Santana et al., 2023). Das Aktenzeichen des Ethikvotums für diese Studie ist die Nummer 598/2011B01.

2.1.2 Geräte

Tabelle 2.1: Verzeichnis der verwendeten Geräte

| Gerät | Hersteller, Hauptsitz und Herkunftsland |
|---------------------------------|--|
| Accu-jet® S Pipettensteuerung | BRAND, Wertheim, Deutschland |
| Axioplan2 Fluoreszenz Mikroskop | Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland |
| BioPhotometer 6131 | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| <i>Centrifuge 5417C</i> | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| <i>Centrifuge 5418</i> | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| <i>Centrifuge 5424</i> | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| <i>Centrigue 5430 R</i> | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|--|--|
| <i>Centrifuge 5804</i> | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| <i>CEQ™8000 Genetic Analysis System</i> | Beckman Coulter, Brea, USA |
| <i>Concentrator plus</i> | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| CORIO CD-200F Kühl-/Heizumwälzpumpe | Julabo, Seelbach, Deutschland |
| Eismaschine | Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland |
| Elektrophorese Spannungsgerät E835, 300 V – 500 mA | Consort bvba, Turnhout, Belgien |
| Eppendorf Research® plus Pipette 0,1-2,5 µL | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Eppendorf Research® plus Pipette 1-10 µL | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Eppendorf Research® plus Pipette 10-200 µL | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Eppendorf Research® plus Pipette 100-1000 µL | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Feinwaage | PESCALE Wägetechnik, Bisingen, GER |
| G-Storm Thermo Cycler | AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland |
| Hoefer™ TE22 Mini Tank Blotting-Einheit | Hoefer Incorporation, Richmond, USA |
| Ikamag Rec-G magnetic stirrer | IKA-Werke, Staufen, Deutschland |
| Leica ST5010 Autostainer XL | Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland |
| <i>Light Cycler® 480 II Real Time PCR System</i> | Roche, Basel, Schweiz |
| Mikrowelle | LG Electronics, Seoul, Südkorea |
| Mini-Zentrifuge | neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland |
| Mini-PROTEAN® Gießständerdichtungen | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |
| Mini-PROTEAN® Kamm, 10-Well | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |
| Mini-PROTEAN® Kamm, 15-Well | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |

Material und Methoden

| | |
|--|---|
| Mini-PROTEAN® 3 System Abstandsplatten mit 1,5 mm integrierten Abstandshaltern | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |
| Mini-PROTEAN® 3 System Kurze Platten | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |
| Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Stand und Klemmen | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |
| Mini-PROTEAN® Tetra Vertikale Elektrophoresezelle | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |
| Odyssey® Fc Imaging System | Licor, Lincoln, USA |
| Orbitalschüttler | GFL, Burgwedel, Deutschland |
| <i>PerfectBlue™ gel system, Mini S</i> | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| <i>PerfectBlue™ gel system, Mini L</i> | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| pipetus® Pipettierhilfe | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland |
| Polymax 1040 (5° Neigungswinkel) Schüttel- und Mischgerät | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland |
| Precisa Waage Serie 290 SCS | Precisa Instruments AG, Dietikon, Schweiz |
| <i>SevenExcellence™ S400 pH/mV- Tischmessgerät</i> | Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz |
| Sunlab Mini-Zentrifuge SU1550 | Labdiscount, Mannheim, Deutschland |
| Synergy HT Microplate-Reader | BioTek Instruments, Winooski, USA |
| ThermoMixer F1.5 | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| TubeRoller RM5-40 | Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, Deutschland |
| Ultrasonic Homogenisator SONOPULS | Bandelin electronic, Berlin, Deutschland |
| UVP Gelstudio PLUS | Analytik Jena, Jena, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|---------------------|---|
| UV-Transilluminator | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Vortexmixer 7-2020 | neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| μCuvette® G1.0 | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Hersteller, Hauptsitz und Herkunftsland |
|---|--|
| CELLSTAR® Reagenzgläser, 15 mL, ohne Stützrahmen | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| CELLSTAR® Reagenzgläser, 50 mL, mit Stützrahmen | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| CELLSTAR® Reagenzgläser, 50 mL, ohne Stützrahmen | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Gel-Ladepipettenspitzen, 200 μL | Nerbe plus, Winsen, Deutschland |
| KIMTECH SCIENCE® Präzisionstücher | Kimberly-Clark Professional, Roswell, USA |
| <i>Light Cycler® 480 Multiwell</i> Platte, 384, weiß | Roche, Basel, Schweiz |
| <i>Light Cycler® 480 Sealing Foil</i> , Abdeckungsfolie für 384, durchsichtig | Roche, Basel, Schweiz |
| Mikroplatte, 96-well | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Mikroskop-Deckgläser 20 x 60 mm | R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland |
| Nitrocellulose Blotting Membran 0,2 μm | Cytiva, Marlborough, USA |
| Nitrocellulose Blotting Membran, 0.45 μm | Cytiva, Marlborough, USA |

Material und Methoden

| | |
|--|---|
| PCR tube, 8-stripe, 0,2 mL | STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Reaktionsröhrchen 1,5 mL | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Reaktionsröhrchen 2,0 mL | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| RNaseZAP™ | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| <i>Safe-Lock</i> Reaktionsgefäße 1,5 mL, braun (UV-Licht-geschützt) | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Serologische Pipette, 5 mL | Corning Incorporated-Life Sciences, Durham, USA |
| Serologische Pipette, 10 mL | Corning Incorporated-Life Sciences, Durham, USA |
| Serologische Pipette, 25 mL | Corning Incorporated-Life Sciences, Durham, USA |
| Serologische Pipette, 50 mL | Corning Incorporated-Life Sciences, Durham, USA |
| Standard-Wägeboote | Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA |
| 8-Streifen PCR-Gefäße 0,2 mL | STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland |
| TipOne® Filter-Pipettenspitzen 10 µL | STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland |
| TipOne® Filter-Pipettenspitzen 200 µL | STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland |
| TipOne® Filter-Pipettenspitzen 1000 µL | STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland |
| TipOne® Pipettenspitzen 10 µL | STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland |
| TipOne® Pipettenspitzen 200 µL | STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland |
| TipOne® Pipettenspitzen 1000 µL | STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|----------------------------|---|
| Whatman-Papier, 46 x 57 cm | GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA |
|----------------------------|---|

2.1.4 Chemikalien/Reagenzien

Tabelle 2.3: Verzeichnis aller verwendeten Chemikalien/Reagenzien

| Chemikalie | Hersteller, Hauptsitz, Herkunftsland |
|---|---|
| Acrylamid 4K - Lösung (30 %) - Mix 29:1 | Applichem, Darmstadt, Deutschland |
| Bicin | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Bis-Tris | AppliChem, Darmstadt, Deutschland |
| Borsäure | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Roche Diagnostics, Mannheim, GER |
| Bradford Reagenz; Protein Assay Dye Reagent | Bio-Rad, Hercules, USA |
| CV Ultra Mounting Medium | Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland |
| 1x Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS) | ThermoFisher Scientific, Waltham, USA |
| Essigsäure 100% | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol absolut, Qualität für Molekularbiologie, 99,8% (CAS: 64-17-5) | Applichem, Darmstadt, Deutschland |
| Ethidumbromid 1% (10 mg/ mL) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| FlexiGene hydration buffer (FGR3 Puffer) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| <i>GeneRuler DNA Ladder Mix</i> | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Glycerin, 86% | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| H ₂ O Ampuwa | Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland |
| Isopropanol, 99,9% (CAS: 67-63-0) | Honeywell International Inc., Morristown, USA |
| <i>Light Cycler® 480 High Resolution Master</i> | Roche, Basel, Schweiz |

Material und Methoden

| | |
|---|--|
| Lithiumdodecylsulfat (LDS) | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Magermilchpulver | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Methanol | VWR International, Radnor, USA |
| Natriumchlorid (NaCl) | VWR International, Radnor, USA |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) | Applichem, Darmstadt, Deutschland |
| Orange G | Omikron, Neckarwestheim, Deutschland |
| Ponceau S | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Precision Plus Protein Dual Color Standards | Bio-Rad, Hercules, USA |
| <i>QIAzol[®] Lysis Reagent</i> | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| SeaKem Agarose | VWR, Radnor, USA |
| SIGMAFAST [™] 3,3'-Diaminobenzidin-Tabletten | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Applichem, Darmstadt, Deutschland |
| Trinatriumcitrat-Dihydrat | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Tris | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| Triton X-100 | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Tween-20 | Applichem, Darmstadt, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid, 30 % | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| WesternBright [™] Peroxid | Advansta, San Jose, USA |
| WesternBright [™] Sirius | Advansta, San Jose, USA |
| Xylol, Isomerengemisch | Applichem, Darmstadt, Deutschland |
| Zitronensäure-Monohydrat | Merck, Darmstadt, Deutschland |

2.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.4: Verzeichnis der verwendeten Lösungen und Puffer

| Lösung / Puffer | Herstellung | Verwendung |
|--------------------------------------|--|---|
| Äquilibrierungspuffer | 1x DPBS 0,1% SDS | Filter Trap |
| 3,5x Bis/Tris Buffer, pH 6,7 | 1,25 M Bis/Tris | Western Blot |
| Blocking-Lösung | 5% Magermilchpulver 95% 1x TBS | Filter Trap, Western Blot |
| Ethanol 30% | 30% von Ethanol 100% H ₂ O | Immunhistochemie |
| Ethanol 50% | 50% von Ethanol 100% H ₂ O | Immunhistochemie |
| Ethanol 70% | 70% von Ethanol 100% H ₂ O | Immunhistochemie, RNA-Isolierung von humanem Gewebe |
| Ethanol 80% | 80% von Ethanol 100% H ₂ O | Immunhistochemie |
| Ethanol 96% | 96% von Ethanol 100% H ₂ O | Immunhistochemie |
| Laufpuffer | 5% 20x MOPS-SDS H ₂ O ad 1 L | Western Blot |
| 4x Lithiumdodecylsulfat-(LDS) Puffer | 1 M Tris/HCl pH 7.5 3 mM EDTA pH 8,0 43% Glycerol 8% LDS 0,1% Orange G | Western Blot |
| 20x MOPS-SDS | 1 M MOPS 1M Tris-Base 65,3 mM SDS | Western Blot |

Material und Methoden

| | | |
|---|--|---------------------------|
| | 20,5 mM EDTA H ₂ O ad 500 mL | |
| Orange G Ladepuffer 6x | 30% Glycerin Orange G nach belieben | Agarosegelelektrophorese |
| PBS 5x | 0,32 M Na ₂ HPO ₄ 0,02 M NaH ₂ PO ₄ pH 7,4 ddH ₂ O ad 1L | Immunhistochemie |
| PBS 1x | 20% PBS-Puffer ddH ₂ O ad 2 L | Immunhistochemie |
| Ponceau S Färbelösung | 5% Essigsäure 0,1% Ponceau S | Western Blot |
| Stripping Puffer, pH 2,0 | 25 mM Glycin 1% SDS 1% Triton X-100 ddH ₂ O ad 500 mL | Western Blot, Filter Trap |
| Tris-Borate-EDTA-(TBE) Puffer 1x | 10% TBE-Puffer 10x ddH ₂ O ad 2 L | Agarosegelelektrophorese |
| Tris-Borate-EDTA-(TBE) Puffer 10x | 890 mM TRIS Base 890 mM Borsäure 4% 0,5 M EDTA-Na ₂ pH 8,0 ddH ₂ O ad 50 mL | Agarosegelelektrophorese |
| Tris-buffered-saline-Puffer (TBS) 1x | 5% TBS 20x ddH ₂ O ad 1 L | Western Blot, Filter Trap |
| Tris-buffered-saline-Puffer (TBS) 20x | 0.25 M Tris/HCl pH 7.5 3,75 M NaCl ddH ₂ O ad 1 L | Western Blot, Filter Trap |
| Tris-buffered-saline-Puffer mit Tween20 (TBST) 1x | 5% TBST-Puffer 20x ddH ₂ O ad 2 L | Western Blot, Filter Trap |

Material und Methoden

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
| Tris-buffered-saline-Puffer mit Tween20 (TBST) 20x | 0,25 M Tris/HCl pH 7,5 3,75 M NaCl 2,5% Tween-20 ddH ₂ O ad 1 L | Western Blot, Filter Trap |
| TES-Puffer | 20 mM Tris pH 8,0 2 mM EDTA 100 mM NaCl | Probenvorbereitung für Western Blot |
| Transferpuffer 1x | 5% Transferpuffer 20x 15% MeOH ddH ₂ O ad 1,2 L | Western Blot |
| Transferpuffer 20x | 0,5 M Bis7Tris 0,02 M EDTA 0,5 M Bicin | Western Blot |
| Verdünnungspuffer | 1x DPBS 2% SDS | Filter Trap |
| Waschpuffer | 1x DPBS | Filter Trap |
| 10x Zitronensäure-Lösung | 1 mM Zitronensäuremonohydrat | Immunhistochemie |

2.1.6 Kits

Tabelle 2.5: Verzeichnis der verwendeten Kits

| Kit | Hersteller, Hauptsitz und Herkunftsland |
|--|--|
| <i>Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit</i> | New England Bio Labs, Frankfurt a. Main, Deutschland |
| <i>QuantiTect Reverse Transcription Kit</i> (Anleitung vom 03/2009) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| <i>QuantiTect SYBR[®] Green RT-PCR Kit</i> (Anleitung vom 03/2016) | Qiagen, Hilden, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|--|--------------------------------------|
| <i>RNeasy Mini Kit</i> (Anleitung vom 10/2019) | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| <i>VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit, Peroxidase (Standard)</i> | Vector Laboratories, Burlingame, USA |

2.1.7 Gehirnproben

Tabelle 2.6: Verzeichnis der verwendeten post-mortem Kleinhirnproben von Kontroll- und SCA-Patienten unbekanntem Typs

Diese Proben dienen der RNA-Isolierung und Etablierung des qRT-PCR-Nachweises der verwendeten Primer; von der niederländischen Gehirnbiobank wurden diese Proben zu Verfügung gestellt.

| Proben ID | Gruppe | Geschlecht | Alter | Gewebe |
|------------------|---------------|-------------------|--------------|---------------|
| NBB 2007-082 | Kontrolle | männlich | 81 | Cerebellum |
| NBB 2013-004 | SCA | männlich | 88 | Cerebellum |

2.1.8 Proteinproben

Tabelle 2.7: Verzeichnis der verwendeten Proteinproben der 304Q KI Mäuse

Diese wurden als Homogenate und Lysate für Western Blot und Filter Trap (Haas et al., 2022) verwendet.

| Tiernummer | Genotyp | Geschlecht | Alter [Monate] | Entnommenes Gewebe |
|-------------------|----------------|-------------------|---------------------------|-------------------------------|
| EH13C4 | WT/WT | weiblich | 3 | Ganzes Gehirn |
| EH23B3 | WT/WT | männlich | 3 | Ganzes Gehirn |
| EH25B1 | WT/WT | männlich | 3 | Ganzes Gehirn |
| EH11C2 | WT/304Q | männlich | 3 | Ganzes Gehirn |

Material und Methoden

| | | | | |
|---------|-----------|----------|----|---------------|
| EH13C5 | WT/304Q | weiblich | 3 | Ganzes Gehirn |
| EH11C5 | WT/304Q | männlich | 3 | Ganzes Gehirn |
| EH20B6 | 304Q/304Q | männlich | 3 | Ganzes Gehirn |
| EH21D5 | 304Q/304Q | weiblich | 3 | Ganzes Gehirn |
| EH21D6 | 304Q/304Q | weiblich | 3 | Ganzes Gehirn |
| EH12.4 | WT/WT | männlich | 12 | Ganzes Gehirn |
| EH16.2 | WT/WT | männlich | 12 | Ganzes Gehirn |
| EH22A8 | WT/WT | weiblich | 12 | Ganzes Gehirn |
| EH21.7 | WT/304Q | weiblich | 12 | Ganzes Gehirn |
| EH22A1 | WT/304Q | männlich | 12 | Ganzes Gehirn |
| EH23.7 | WT/304Q | weiblich | 12 | Ganzes Gehirn |
| EH21A1 | 304Q/304Q | männlich | 12 | Ganzes Gehirn |
| EH21A3 | 304Q/304Q | männlich | 12 | Ganzes Gehirn |
| EH21A6 | 304Q/304Q | weiblich | 12 | Ganzes Gehirn |
| EH12.12 | WT/WT | weiblich | 18 | Ganzes Gehirn |
| EH18A2 | WT/WT | männlich | 18 | Ganzes Gehirn |
| EH22.1 | WT/WT | männlich | 18 | Ganzes Gehirn |
| EH19.4 | WT/304Q | männlich | 18 | Ganzes Gehirn |
| EH21.2 | WT/304Q | weiblich | 18 | Ganzes Gehirn |
| EH21.3 | WT/304Q | weiblich | 18 | Ganzes Gehirn |
| EH19.1 | 304Q/304Q | männlich | 18 | Ganzes Gehirn |
| EH19.2 | 304Q/304Q | männlich | 18 | Ganzes Gehirn |
| EH19.3 | 304Q/304Q | männlich | 18 | Ganzes Gehirn |

2.1.9 Gehirnschnitte

Tabelle 2.8: Verzeichnis der verwendeten Sagittalschnitte der 304Q KI Mäuse und Wildtypen für die Immunhistochemie (Haas et al., 2022)

| Tiernummer | Genotyp | Geschlecht | Alter [Monate] |
|------------|-----------|------------|-------------------|
| EH18D1 | WT/WT | männlich | 3 |
| EH22B1 | 304Q/304Q | männlich | 3 |
| EH16A11 | WT/WT | weiblich | 12 |
| EH23A4 | WT/WT | männlich | 12 |
| EH21A2 | 304Q/304Q | männlich | 12 |
| EH22.2 | WT/WT | männlich | 18 |
| EH25C6 | WT/WT | männlich | 18 |
| EH20.1 | 304Q/304Q | männlich | 18 |
| EH26A1 | 304Q/304Q | männlich | 18 |

2.1.10 Primer

Die in Tabelle 2.9 aufgeführten Primer wurden von der Firma Metabion International AG aus Planegg, Deutschland, die in Tabelle 2.10 aufgeführten Primer von der Firma Biomol GmbH aus Hamburg, Deutschland, bestellt.

Tabelle 2.9: Verzeichnis der verwendeten Primer von der Firma Matbion International AG

| Primer | Sequenz (5' – 3') | Produktlänge [bp] | Melting- Temperatur [°C] |
|--|---------------------|----------------------|--------------------------------|
| SDHA Homo sapiens Housekeeping Vorwärts | AGAAGCCCTTTGAGGAGCA | 93 | 57 |

Material und Methoden

| | | | |
|--|-------------------------|-----|-------|
| V392 | | | |
| SDHA Homo sapiens Housekeeping Rückwärts V393 | CGATTACGGGTCTATATTCCAGA | 93 | 57 |
| GAPDH Homo sapiens Housekeeping Vorwärts V398 | AGCCACATCGCTCAGACAC | 66 | 60,08 |
| GAPDH Homo sapiens Housekeeping Rückwärts V399 | GCCCAATACGACCAAATCC | 66 | 56,36 |
| TBP Homo sapiens Housekeeping Vorwärts V400 | GAAGTTGGGTTTTCCAGCTAA | 182 | 56,35 |
| TBP Homo sapiens Housekeeping Rückwärts V401 | GGAGAACAATTCTGGGTTTGA | 182 | 56,06 |
| PDHP Homo sapiens Housekeeping Vorwärts V402 | GAGGCTGGCCACAGTTTG | 71 | 48,64 |
| PDHP | GAAATTGAACGCAGGACCTT | 71 | 56,63 |

Material und Methoden

| | | | |
|--|-----------------------|-----|-------|
| Homo sapiens Housekeeping Rückwärts V403 | | | |
| OTOF Homo sapiens Primer Paar 9 Vorwärts V757 | ACTTTGCCTCCATTGACACCA | 112 | 60,13 |
| OTOF Homo sapiens Primer Paar 9 Rückwärts V758 | ATTGACCCCTTCAGGCCCTC | 112 | 61,58 |
| OTOF Homo sapiens Primer Paar 3 Vorwärts V759 | AAGTGACTTCCGAGGGCAA | 113 | 59,53 |
| OTOF Homo sapiens Primer Paar 3 Rückwärts V760 | CATTTCTGTCGATGCTGCTGG | 114 | 59,94 |
| SFT2D2 Homo sapiens Primer Paar 1 Vorwärts V761 und W048 | CACTTACCCTGTGTTCTGCCT | 131 | 59,93 |
| SFT2D2 Homo sapiens Primer Paar 1 | CTTCTTCACAGCATCCCTTGC | 131 | 59,53 |

Material und Methoden

| | | | |
|---|------------------------|-----|-------|
| Rückwärts V762 und W049 | | | |
| SUSD1 Homo sapiens Primer Paar 2 Vorwärts V763 | AGACACTCCTGTGCAGTTTGG | 114 | 60,48 |
| SUSD1 Homo sapiens Primer Paar 2 Rückwärts V764 | GCATGAGTGACGAATCTGTGTG | 114 | 59,91 |
| SUSD1 Homo sapiens Primer Paar 2 Vorwärts V933 | CGGTTTCCAGACAGCTGAAGT | 149 | 60,54 |
| SUSD1 Homo sapiens Primer Paar 2 Rückwärts V934 | ACCTCTGACCCAGAACGGTA | 149 | 59,89 |
| SUSD1 Homo sapiens Primer Paar 8 Vorwärts V935 | ACAATAGCAACTCCCCCAGC | 132 | 60,03 |
| SUSD1 Homo sapiens Primer Paar 8 Rückwärts V936 | CTGGCCCCAAATGTGGAATAAA | 132 | 59,16 |

Material und Methoden

| | | | |
|--|-----------------------|-----|-------|
| OTOF Homo sapiens Primer Paar 8 Vorwärts V937 | CTGTGAGGATGTGGCTGACTT | 132 | 60,00 |
| OTOF Homo sapiens Primer Paar 8 Rückwärts V938 | AAGGTCCCGATGAGCTTGTTG | 132 | 60,61 |

Tabelle 2.10: Verzeichnis der verwendeten Primer von der Firma Biomol GmbH

| Primer | Sequenz (5' – 3') | Produktlänge [bp] | Melting- Temperatur [°C] |
|--|--------------------------|------------------------------|---|
| OTOF Homo sapiens Primerset 1 Vorwärts | GGACACAGACGTCCACTACC | 154 | 58 |
| OTOF Homo sapiens Primerset 1 Rückwärts | GGGGATCTTGTACTCGGTCT | 154 | 58 |
| OTOF Homo sapiens Primerset 2 Vorwärts | GGAGAACTGTGAGGATGTGG | 181 | 58 |
| OTOF Homo sapiens Primerset 2 Rückwärts | CTCCACATGGCTCTCCTCTA | 181 | 58 |

Material und Methoden

| | | | |
|--|----------------------|-----|----|
| OTOF Homo sapiens Primerset 3 Vorwärts | GACTGGCTGCACACTTTCAA | 174 | 58 |
| OTOF Homo sapiens Primerset 3 Rückwärts | GAACATGCCGTAGGTGGAGT | 174 | 58 |
| OTOF Homo sapiens Primerset 4 Vorwärts | CCCCAGGTCTTCCAAGTACA | 220 | 58 |
| OTOF Homo sapiens Primerset 4 Rückwärts | GTGAGAGGAGCCAAGTGGAG | 220 | 58 |

2.1.11 Antikörper

Tabelle 2.11: Verzeichnis der verwendeten Primär-Antikörper für Western Blot und Filter Trap

| Antigen | Wirt | Anwendung | Verdünnung | Hersteller, Hauptsitz, Herkunftsland |
|-------------------|-------------|------------------------------|-------------------|---|
| ATXN3 Klon 1H9 | Maus | Western Blot, Filter Trap | 1:2500 | Chemicon International, Temecula, USA |
| ACY3 | Hase | Western Blot, Filter Trap | 1:2000 | LSBio, Seattle, USA |

Material und Methoden

| | | | | |
|-----------|------|------------------------------|---|--|
| CA9 | Maus | Western Blot, Filter Trap | 1:2500 mit 5% Milchpulver, 1:5000 | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| DNAJC13 | Hase | Western Blot, Filter Trap | 1:250 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| GAPDH | Maus | Western Blot | 1:5000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA |
| HDJ2 | Maus | Western Blot, Filter Trap | 1:200 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| HSP27 | Maus | Western Blot, Filter Trap | 1:5000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA |
| HSP105 | Hase | Western Blot, Filter Trap | 1:5000 | Abcam, Cambridge, Großbritannien |
| HSPA2 | Hase | Western Blot, Filter Trap | 1:5000 | Abcam, Cambridge, Großbritannien |
| Ubiquitin | Hase | Filter Trap | 1:250 | Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark |
| Vinculin | Hase | Western Blot | 1:1000 | Cell Signaling Technology Europe B.V., Leiden, Niederlande |

Material und Methoden

| | | | | |
|----------------|------|--------------|--------|-------------------------------------|
| β -Aktin | Maus | Western Blot | 1:5000 | Merck, Darmstadt, Deutschland |
|----------------|------|--------------|--------|-------------------------------------|

Tabelle 2.12: Verzeichnis der verwendeten Sekundär-Antikörper für Western Blot und Filter Trap

| Antikörper | λ [nm] | Wirt | Anwendung | Verdünnung | Hersteller, Hauptsitz, Herkunftsland |
|-------------------|----------------------------------|-------------|------------------------------|-------------------|---|
| Anti-Hase 680 | 700 | Ziege | Western Blot | 1:5000 | Licor, Lincoln, USA |
| Anti-Hase 800 | 800 | Ziege | Western Blot | 1:5000 | Licor, Lincoln, USA |
| Anti-Hase HRP | Chemi- lumines- zenz | Ziege | Western Blot, Filter Trap | 1:5000 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Anti-Maus 680 | 700 | Ziege | Western Blot | 1:5000 | Licor, Lincoln, USA |
| Anti-Maus 800 | 800 | Ziege | Western Blot | 1:5000 | Licor, Lincoln, USA |
| Anti-Maus HRP | Chemi- lumine- szenz | Ziege | Western Blot, Filter Trap | 1:5000 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

Tabelle 2.13: Verzeichnis der verwendeten Primär-Antikörper für Immunhistochemie

| Antigen | Wirt | Verdünnung | Hersteller, Hauptsitz, Herkunftsland |
|----------------|-------------|-------------------|---|
| IH9 | Maus | 1:4000 | Chemicon International, Temecula, USA |
| DNAJC13 | Hase | 1:250 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| HDJ2 | Maus | 1:200 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

Material und Methoden

| | | | |
|--------|------|--------|----------------------------------|
| HSP105 | Hase | 1:5000 | Abcam, Cambridge, Großbritannien |
| HSPA2 | Hase | 1:5000 | Abcam, Cambridge, Großbritannien |

Tabelle 2.14: Verzeichnis der verwendeten Sekundär-Antikörper für Immunhistochemie

| Antikörper | Eigenschaft | Wirt | Verdünnung | Hersteller, Herkunftsland | Hauptsitz, |
|------------|--------------|-------|------------|------------------------------|---------------|
| Anti-Hase | biotinyliert | Ziege | 1:200 | Vector Burlingame, USA | Laboratories, |
| Anti-Maus | biotinyliert | Ziege | 1:250 | Vector Burlingame, USA | Laboratories, |

2.1.12 Softwares

Tabelle 2.15: Verzeichnis der verwendeten Softwares

| Softwares | Hersteller, Hauptsitz und Herkunftsland |
|--|--|
| CorelDraw Version 23.1.0.389/24.1.0.360 | Corel Corporation, Ottawa, Canada |
| Excel Version 1808 | Microsoft, Redmond, USA |
| <i>GenomeLabTM GeXP Genetic Analysis System</i> | Beckman Coulter Life Science, Brea, USA |
| GraphPad Prism Version 9.2.1 (226) | Dotmatics, Boston, USA |
| Image Studio Lite Version 5.2.5 | Licor, Lincoln, USA |
| <i>Light Cycler® 480 SW 1.5.1</i> | Roche, Basel, Schweiz |
| <i>VisionWorks Acquisition and Analysis Software</i> | Analytik Jena, Jena, Deutschland |
| <i>Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Version 81348237</i> | Qiagen, Hilden, Deutschland |

2.1.13 Datensätze in *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA)

Dem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik liegen mehrere Datensätze im Rahmen der SCA3 Forschung vor. Die Datensätze (Tabelle 2.16) beruhen entweder humanem oder murinem Gewebe (SCA3 KI Mäuse (Haas et al., 2022) und YAC84Q Mäuse (Cemal et al., 2002))

Tabelle 2.16: Verzeichnis der verwendeten IPA-Datensätze

| Humane Datensätze | Murine Datensätze |
|---|---|
| SCA3 Patient Cerebellum | SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum) |
| Blut ESMI Baseline alle | SCA3 Maus KI 2M (Cerebellum) |
| Blut ESMI Baseline Kontrolle vs. Mutationsträger | SCA3 Maus Transgen 84Q Striatum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M |
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild | SCA3 Maus Transgen 84Q Striatum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M |
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild weiblich | SCA3 Maus Transgen 84Q Striatum Wildtyp 2M vs. Wildtyp 12M |
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild männlich | SCA3 Maus Transgen 84Q Striatum Transgen 2M vs. Transgen 12M |
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. Kontrolle | SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M |
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. Kontrolle Altersübereinstimmung | SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M |
| Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch | SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Wildtyp 12M |
| Blut ESMI Baseline schwer vs. Kontrolle | SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Transgen 2M vs. Transgen 12M |
| Blut ESMI Kontrolle männlich jung vs. alt | SCA3 Maus Transgen 84Q präfrontaler Cortex Wildtyp 12M vs. Transgen 12M |
| Blut ESMI Baseline Kontrolle weiblich jung vs. alt | SCA3 Maus Transgen 84Q präfrontaler Cortex Wildtyp 2M vs. Transgen 2M |

| | |
|--|---|
| Blut ESMI Baseline männlich jung vs. alt | SCA3 Maus Transgen 84Q präfrontaler Cortex Transgen 2M vs. Transgen 12M |
| Blut ESMI Baseline weiblich jung vs. alt | SCA3 Maus Transgen 84Q präfrontaler Cortex Wildtyp 2M vs. Wildtyp 12M |

2.2 Methoden

2.2.1 *Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*

Bei der *Ingenuity Pathway Analysis (IPA)* handelt es sich um eine webbasierte Softwareanwendung, durch welche Analysen und Kenntnisse von Daten aus Genexpressionen ermöglicht werden. Durch IPA können einzelne Gene, Proteine etc. gezielt gesucht und im Rahmen der Regulation in Netzwerken und *Pathways* interpretiert werden.

Für meine Dissertation wurden vor allem die Proteine, die in Teil B und Teil C verwendet wurden, untersucht, um deren Expression besser verstehen zu können. Hierfür wurden RNA-Sequenzierungsdaten von homozygoten 304Q KI-Mäusen (Haas et al., 2022), von hemizygoten YAC84Q Mäusen (Cemal et al., 2002) und von SCA3 PatientInnen analysiert. Zwei und zwölf Monate alte YAC84Q Mäuse und 304Q KI-Mäuse wurden mit alters- und geschlechtsgematchten Wildtyp-Mäusen verglichen. Zudem wurden bei den YAC84Q Mäusen Cerebellum, präfrontaler Cortex und Striatum analysiert; bei den 304Q KI-Mäusen standen die Daten vom Cerebellum zu Verfügung. Die Sequenzierungsdaten von SCA3-PatientInnen wurden sowohl von *post-mortem* Cerebellum-Proben als auch von Blutproben generiert und mit entsprechenden Kontrollpersonen verglichen. Für alle Datensätze wurde eine Expressionsanalyse basierend auf dem expr-log -Verhältnis durchgeführt. Der Schnitt der Werte wurde für die \log_2 -fache Änderung festgelegt. Es wurden folgenden Werte ausgewählt: -0,25 bis 0,25; -0,3 bis 0,3; -0,5 bis 0,5; -0,6 bis 0,6. Als Signifikanz wurde ein p-Wert kleiner 0,05 festgelegt. Die Netzwerke und Wege der jeweiligen Analysen wurden für die Proteine des Interesses genauer betrachtet und graphisch dargestellt.

Die Legende (siehe Abbildung 2.1) von IPA zeigt die Interaktion der verschiedenen Gene, Proteine etc. zueinander.

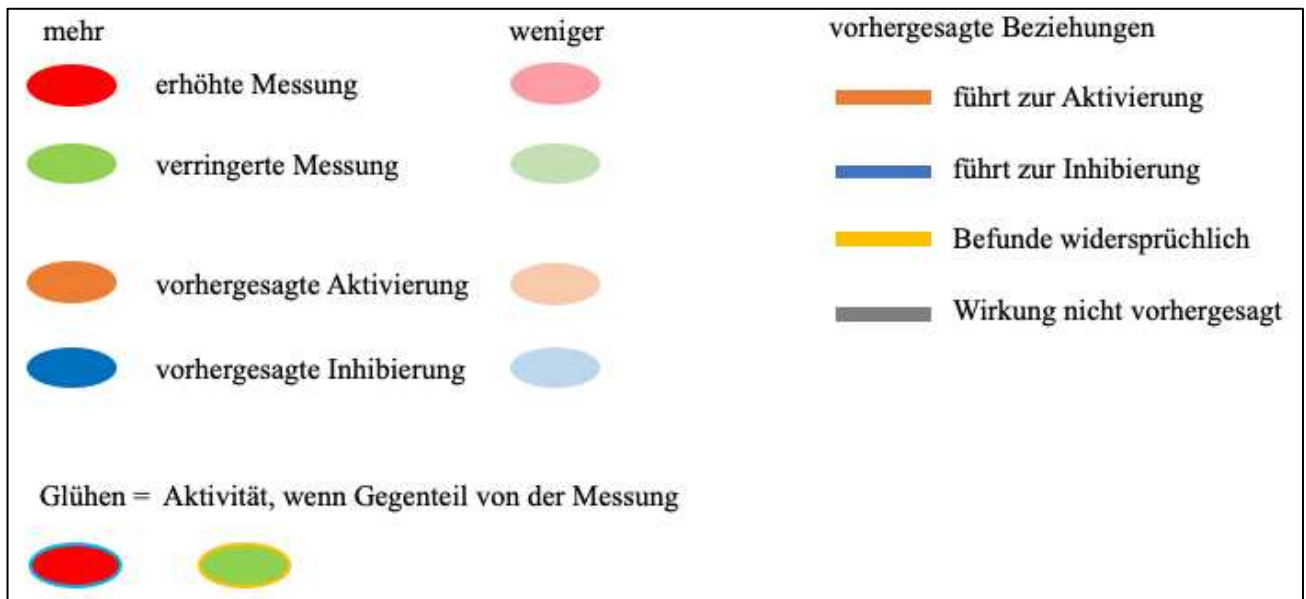


Abbildung 2.1: Legende für Ingenuity Pathway Analyse (erstellt in Microsoft PowerPoint)

2.2.2 RNA

2.2.2.1 RNA-Isolierung von humanem Cerebellum

Für die Etablierung der qRT-PCR wurden von *post-mortem* Cerebellum-Proben eines SCA-Patienten unbekanntem Typs und eines Kontrollpatienten, welche von einer niederländischen Gehirnbank zu Verfügung gestellt wurden, die RNA isoliert (siehe Tabelle 2. 6 im Kapitel 2.1.7 Gehirnprouben). Für die RNA-Extraktion wurde sich am RNeasy Mini Handbuch von Qiagen (Oktober 2019) orientiert.

Pro 30 mg Cerebellum wurde 300 µL Qiazol auf Eis in den Dounce-Homogenisator pipettiert und mit diesem die Cerebellum-Probe zerkleinert, bis es zu einer homogenen Lösung wurde. Dann wurde das hergestellte Produkt in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Probe für 15 Minuten bei 4°C und höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde nun abgenommen und 1 Volumen von 70%igem Ethanol in das Reaktionsgefäß hinzugegeben und invertiert. Daraufhin wurde in eine Aufreinigungssäule die Lösung aus Cerebellum und Isopropanol pipettiert und das

Reaktionsgefäß mit Säule für 30 Sekunden bei 4°C und 9.800 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Die Flüssigkeit im 1,5 mL Reaktionsgefäß, die durch die Zentrifugation durch die Aufreinigungssäule geflossen ist, wurde verworfen. Nachfolgend wurde auf Eis 700 µL RW1 Puffer auf die Aufreinigungssäule pipettiert und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor die Probe zentrifugiert und die Flüssigkeit im Sammelgefäß verworfen. Danach wurden auf Eis 500 µL RPE Puffer auf die Säule pipettiert und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Durchfluss im Sammelgefäß verworfen. Es wurden wieder auf Eis 500 µL RPE Puffer auf die Säule gegeben und für zwei Minuten bei 4°C und 9.800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss im Sammelgefäß verworfen und die Probe für eine Minute bei 4°C und 9.800 rpm zentrifugiert. Dann wurde die Aufreinigungssäule in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gesetzt und auf Eis 30 µL RNase-freies Wasser auf die Aufreinigungssäule gegeben. Die Probe wurde für eine Minute bei 4°C und 9.800 rpm zentrifugiert. Die RNA im 1,5 mL Reaktionsgefäß wurde auf Eis gelagert und währenddessen wurde die Säule in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde der Vorgang mit dem RNase-freien Wasser und dem Zentrifugieren wiederholt. Somit wurde in einer RNA-Isolation zweimal RNA hergestellt. Anschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch gemessen (siehe 2.2.2.2 photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung).

2.2.2.2 Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration und Reinheit der RNA zu bestimmen, wurden diese mit Hilfe eines BioPhotometers von der Firma Eppendorf gemessen. Das Photometer enthielt vorprogrammierte Einstellungen, die RNA-Konzentrationsbestimmung wurde mit einem Absorptionskoeffizienten von 260 nm durchgeführt und das Programm für einzelsträngige RNA ausgewählt. Je nachdem ob der Leerwert oder die Probe gemessen wurde, wurde „blank“ oder „sample“ ausgewählt. Der Wert A₂₆₀ wurde gemessen, da isolierte RNA bei 260 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Gleichzeitig wurde sowohl bei A₂₆₀/280 und A₂₆₀/230 gemessen. Durch A₂₆₀/280 wurde der Reinheitsgrad auf Kontaminationen durch Proteine und Phenole überprüft; bei reiner RNA wurde ein

Quotient von 1,8-2,0 erwartet. Durch A260/230 wurde der Reinheitsgrad auf allgemeine Kontamination durch organische Verbindungen bestimmt; hier wurde ein Verhältnis von >2,0 erwartet. Die RNA-Konzentration wird mit der dieser Formel berechnet:

$$C [\mu\text{g/mL}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionskoeffizient.}$$

Der Extinktionskoeffizient beträgt für einzelsträngige RNA 40.

2.2.2.3 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese als biochemische Methode wird die cDNA mittels der reversen Transkriptase – ein Enzym – aus RNA synthetisiert. Die hergestellte cDNA wurde später bei der qPCR verwendet. Für die cDNA-Synthese wurde das QuantiText Reverse Transcription Kit (Anleitung 03/2009) verwendet. Da RNA sehr empfindlich ist, wurden die Pipetten, Tischplatten und weitere verwendete Geräte mit RNaseZAP™ geputzt und TipOne® Filter-Pipettenspitzen von STARLAB International GmbH verwendet.

Der gDNA Wipeout Puffer, die Quantiscript Reverse Transkriptase, der Quantiscript RT Puffer, der RT Primer Mix und das RNase-freie Wasser wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und zentrifugiert, danach wurden diese auf Eis gelagert. Die RNA wurde die ganze Zeit auf Eis gelagert. Dann wurde die DNA-Eliminierungsreaktion, wie in Tabelle 2.17 beschrieben, auf Eis vorbereitet. Bei der Etablierung wurde 100 ng RNA gewählt, um so wenig wie möglich an humanem *post-mortem* Gewebeproben zu verbrauchen.

Tabelle 2.17: genomische DNA-Eliminierungsreaktion

| Komponente | Volumen/Reaktion | Finale Konzentration |
|-------------------------|------------------------|----------------------|
| gDNA Wipeout Puffer, 7x | 2 µL | 1x |
| RNA | Variabel (bis zu 1 µg) | 100-500 ng |
| RNase-freies Wasser | variabel | - |
| Gesamtvolumen | 14 µL | - |

Anschließend wurden die gefüllten 0,2 mL Reaktionsgefäße für zwei Minuten bei 42°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt.

Tabelle 2.18: Master Mix für die Reverse Transkription

| Komponente | Volumen/Reaktion | Finale Konzentration |
|---|------------------|----------------------|
| Quantiscript RT Puffer, 5x | 4 µL | 1x |
| RT Primer Mix | 1 µL | - |
| Quantiscript Reverse Transkriptase | 1 µL | - |
| Gesamte genomische DNA-Elminierungsreaktion | 14 µL | - |
| Gesamtvolumen | 20 µL | - |

Dann wurde der Master Mix für die Reverse Transkription pipettiert (siehe *Tabelle 2.18: Master Mix für die Reverse Transkription*). Es wurde aber vorerst die Reverse Transkriptase weggelassen. Dann wurde der unvollständige Master Mix in das Reaktionsgefäß für RT-, eine Negativkontrolle ohne Enzym, bei welcher in der darauffolgenden qPCR keine Amplifikation erwartet wurde, pipettiert und daraufhin der Mastermix mit der Reversen Transkriptase vervollständigt. Zum Schluss wurde der Mastermix in die Reaktionsgefäße mit den Proben hinzugegeben. Folgend wurden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das Programm für die cDNA-Synthese fortgeführt (siehe *Tabelle 2.19: Programmeinstellungen für cDNA-Synthese*). Nach Beenden des Programms wurde die cDNA bei -20°C gelagert, bis diese für die qPCR verwendet wurde.

Tabelle 2.19: Programmeinstellungen für cDNA-Synthese

| Schritte | Temperatur [°C] | Dauer |
|------------|-----------------|-----------|
| Inkubation | 42 | 2 min |
| Inkubation | 42 | 15 min |
| Inkubation | 95 | 3 min |
| Lagerung | 10 | unendlich |

2.2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) mit *Two-Step* Verfahren

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) als biochemische Methode wird zum Nachweis und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren verwendet. Es wurde eine farbstoffbasierte qPCR gewählt, bei der in Echtzeit die Fluoreszenz eines Farbstoffs, der spezifisch an cDNA bindet, gemessen wurde.

Für die Etablierung wurde ein *Two-Step* Verfahren gewählt. Dadurch wurde die RNA zuerst durch eine cDNA-Synthese in cDNA umgeschrieben und dann wurde die cDNA im weiteren Schritt bei der qPCR eingesetzt.

Bevor begonnen wurde, wurden alle Arbeitsflächen und Geräte mit RNaseZAP gereinigt, um RNase-Verunreinigungen zu entfernen. Während des Vorbereitens und Pipettieren der qPCR wurde auf Eis gearbeitet.

Für die Etablierung der Primer (siehe 2.1.10 Primer) wurden zuerst menschliche Kontroll-Gehirnproben verwendet (siehe 2.1.7 Gehirnproben). Bei diesen Proben wurden zuvor eine RNA-Isolierung und cDNA-Synthese durchgeführt. Im zweiten Schritt wurden die Primer mit RNA-Blutproben von SCA3 PatientInnen und Kontrollpersonen etabliert. Dafür wurde zuvor eine Reverse Transkription durchgeführt.

Für die qPCR wurde eine Standardreihe benötigt, die 1:5 – 1:10 – 1:50 – 1:250 mit RNase freiem Wasser verdünnt wurde. Die aus den humanen Gehirn-Proben hergestellte cDNA wurde 1:10 verdünnt. Der Mastermix wurde mit SYBR® Green – einem Fluoreszenz-Farbstoff – angesetzt und aufgrund der Fluoreszenz wurde UV-geschützt gearbeitet (siehe *Tabelle 2.20: Mastermix für qPCR mit Two-Step Verfahren*).

Tabelle 2.20: Mastermix für qPCR mit Two-Step Verfahren

| Mastermix | n = 1 |
|---------------------------------|--------------|
| SYBR® Green | 5 µL |
| Primer Vorwärts, 1:10 verdünnt | 1 µL |
| Primer Rückwärts, 1:10 verdünnt | 1 µL |
| RNase freies Wasser | 1 µL |
| Gesamtmenge | 8 µL |

Material und Methoden

In eine 384-Well Platte wurden pro Vertiefung 8 μL Mastermix und 2 μL aus der Standardreihe, der interessierten Probe oder Negativkontrolle – RT- oder H_2O – pipettiert, sodass insgesamt 10 μL pro Vertiefung gegeben wurden. Jede Probe wurde als Duplikat pipettiert, um Pipettier-Fehler erkennen zu können. Anschließend wurde die pipettierte Platte in einer Zentrifuge für eine Minute bei 1.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um Bläschen zu entfernen. Dann wurde eine Klebefolie auf die Mikrotiterplatte gelegt und mit einer Rolle die Blasen herausgedrückt. Somit wurde die Folie fest auf die Platte ohne Lufteinschuss geklebt. Diese klare Folie erleichtert die Fluoreszenzanalyse der qPCR und Schmelzkurve und verhindert Verdunstung und Kontamination. Daraufhin wurde wiederum mit gleicher Einstellung für eine Minute die Platte in die Zentrifuge gestellt, um die Proben gut zu vermischen.

Die 384-Well Platte wurde in den Light Cycler 480 gebracht und in der Software das Programm „SYBR Green I / HRM Dye“ ausgewählt. Die Annealing-Temperatur, die je nach Primer unterschiedlich ist, wurde beim Schritt Annealing eingegeben und das Programm gestartet (siehe *Tabelle 2.21: Einstellungen des Programmes SYBR Green I / HRM Dye*).

Tabelle 2.21: Einstellungen des Programmes SYBR Green I / HRM Dye

| Schritte | Temperatur [°C] | Dauer | Ramp Rate [°C/sec] |
|-----------------------------|------------------------|--------------|---------------------------|
| Einleitung | 95 | 15 min | 4,8 |
| Amplifikation mit 55 Zyklen | | | |
| Denaturierung | 94 | 15 sec | 2,5 |
| Annealing | 60, variabel | 30 sec | 2,5 |
| Verlängerung | 72 | 30 sec | 4,8 |
| Schmelzen | | | |
| | 95 | 10 sec | 4,8 |
| | 60 | 15 sec | 2,5 |
| | 90 | | 0,04 |
| Kühlung | 40 | 10 | 2,5 |

Nach Durchlauf des Programms wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Software *Light Cycler® 480 SW 1.5.1* ausgewertet, dafür wurden im Programm die jeweiligen Positionen auf der Platte mit Konzentration und Inhalt beschriftet und dann die Programme „absolute Quantifizierung“ und „Schmelzkurve“ ausgewählt. Die Auswertungen wurden in eine Excel-Tabelle überführt. Für die Standardkurve wurde eine Effizienz von 1,8 bis 2,0 angestrebt.

2.2.2.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) mit *One-Step* Verfahren

Die qPCR als biochemische Methode wurde in (2.2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) mit *Two-Step* Verfahren) beschrieben. Da für diese Dissertation viele RNA-Blutproben von SCA3 PatientInnen und Kontrollpersonen vorlagen, wurde nach dem Schritt der Etablierung im *Two-Step* Verfahren das *One-Step Kit Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit* von *New England BioLabs* gewählt. Ein großer Vorteil des einstufigen Workflows ist, dass die Reverse Transkription und qPCR in einem Schritt und somit in einem Reaktionsgemisch ablaufen. Dadurch wurde nicht nur Zeit gespart, sondern auch die unvermeidliche Pipettierfehleranfälligkeit minimiert.

Wie auch beim Zwei-Stufen-Modell wurden vor dem Beginn alle Arbeitsflächen und Geräte mit RNaseZAP gereinigt, um RNase-Verunreinigungen zu entfernen. Während des Vorbereitens und Pipettierens der qPCR wurde auf Eis gearbeitet.

Die verwendeten Primer wurden zuvor im *Two-Step* Verfahren etabliert und nun in der Ein-Schritt-Methode ein weiteres Mal etabliert. Nach der Etablierung für das *Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit* von *New England BioLabs* wurden mit den etablierten Primern die RNA-Blutproben von SCA3 PatientInnen und Kontrollpersonen pipettiert, um später Ergebnisse durch die qPCR zu erzielen.

Für die qPCR wurde eine Standardreihe von 1:10 – 1:50 – 1:250 – 1:1250 gewählt; mit RNA-Mengen von 10 ng, 2 ng, 0,4 und 0,08 ng. Als Negativkontrolle wurde RNase freies Wasser und RT- mit einer Verdünnung von 1:20 und einer RNA-Menge von 5 ng eingesetzt, um Verunreinigungen auszuschließen.

Tabelle 2.22: Mastermix für qPCR mit One-Step Verfahren

| Mastermix | n = 1 |
|--------------------------------------|--------|
| Luna Universal One-Step Reaction Mix | 5 µL |
| Primer Vorwärts (10 µM) | 0,4 µL |
| Primer Rückwärts (10 µM) | 0,4 µL |
| RNase freies Wasser | 2,7 µL |
| Luna Warm Start Rt Enzyme mix | 0,5 µL |
| Gesamtmenge | 9 µL |

In eine 384-Well Platte wurden pro Vertiefung 9 µL Mastermix (siehe *Tabelle 2.22: Mastermix für qPCR mit One-Step Verfahren*) und 1 µL aus der Standardreihe, der interessierten Probe oder Negativkontrolle – RT- oder H₂O – pipettiert, sodass insgesamt 10 µL pro Vertiefung gegeben wurden. Jede Probe wurde als Duplikat pipettiert, um Pipettier-Fehler erkennen zu können. Wie bei 2.2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) mit *Two-Step* Verfahren wurde auch im *One-Step* Verfahren die Platte zweizeitig zentrifugiert und eine Klebefolie aufgebracht.

Die 384-Well Platte wurde in den *Light Cycler® 480* gebracht und in der Software das Programm für das *Luna Universal RT-qPCR Kit* ausgewählt. Die Annealing-Temperatur, die je nach Primer unterschiedlich ist, wurde dementsprechend eingegeben und das Programm gestartet (siehe *Tabelle 2.23: Einstellungen des Programmes für das Luna Universal RT-qPCR Kit inklusive Melting*).

Tabelle 2.23: Einstellungen des Programmes für das Luna Universal RT-qPCR Kit inklusive Melting

| Schritt | Temperatur [°C] | Dauer [sec] | Zyklen |
|------------------------|-----------------|-------------|--------|
| Reverse Transkription | 55 | 600 | |
| Initiale Denaturierung | 95 | 60 | |
| Denaturierung | 95 | 10 | 45 |

Material und Methoden

| | | | |
|---|--------------|----|----|
| Kombinierte Primer-Anlagerung und Amplifikation | 60, variabel | 60 | 45 |
|---|--------------|----|----|

Melting

| Schritt | Temperatur [°C] | Dauer [sec] | Ramp Rate [°C/sec] |
|-----------|-----------------|-------------|--------------------|
| Schmelzen | 95 | 10 | 0,04 |
| | 60 | 15 | |
| | 60-90 | | |
| Abkühlen | 40 | | |

Nach Durchlauf des Programms wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Software *Light Cycler® 480 SW 1.5.1* ausgewertet, dafür wurden im Programm die jeweiligen Positionen auf der Platte mit Konzentration und Inhalt beschriftet und dann die Programme „absolute Quantifizierung“ und „Schmelzkurve“ ausgewählt. Die Auswertungen wurden in eine Excel-Tabelle überführt. Für die Standardkurve wurde eine Effizienz von 1,8 bis 2,1 angestrebt.

2.2.2.6 Gradienten-PCR zur Optimierung

Die Gradienten-PCR dient dazu, die bestmögliche Annealing-Temperatur für ein Primerpaar zu finden, in der die Polymerase-Kettenreaktion abläuft. Aus diesem Grund wurden Primerpaare mittels Gradienten-PCR getestet, welche nicht direkt bei der berechneten Annealing-Temperatur funktioniert haben. Deshalb wurde eine Gradienten-PCR für die verwendeten qRT-PCR Primerpaare (siehe 2.1.10 Primer) durchgeführt. Zudem wurde einmal die MgCl₂ Menge von 2,5 mM im SYBR® Green nicht verändert, einmal auf 3,5 mM MgCl₂ und einmal auf 5,0 mM MgCl₂ erhöht. Dadurch konnte die bestmögliche Annealing-Temperatur und MgCl₂-Konzentration für das jeweilige Primerpaar ermittelt werden. Pro Primerpaar wurde ein Mastermix (siehe *Tabelle 2.24: Mastermix für Gradienten-PCR*) hergestellt.

Tabelle 2.24: Mastermix für Gradienten-PCR

| Mastermix | 2,5 mM MgCl ₂ | 3,5 mM MgCl ₂ | 5,0 mM MgCl ₂ |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SYBR® Green | 5 µL | 5 µL | 5 µL |
| Primer Vorwärts, 1:10 verdünnt | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| Primer Rückwärts, 1:10 verdünnt | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| H ₂ O | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| MgCl ₂ (25 mM) | 0 µL | 0,4 µL | 1 µL |

Es wurden pro 0,2 mL Reaktionsgefäß 2 µL 1:10 verdünnte cDNA pipettiert. Für die Gradienten-PCR wurden acht verschiedene Annealing-Temperaturen pro Primerpaar ausgewählt: 55,1 °C, 55,9 °C, 58,0 °C, 59,3 °C, 60,6 °C, 61,9 °C, 63,4 °C, 64,3 °C, 64,9 °C, 65,2 °C. Nach dem Pipettieren wurden das voreingestellte Programm (siehe *Tabelle 2.25: Programm des Thermocyclers für Gradienten-PCR*) im Thermocycler ausgewählt und die Reaktionsgefäße in die Maschine gestellt.

Tabelle 2.25: Programm des Thermocyclers für Gradienten-PCR

| Schritte | Temperatur [°C] | Dauer |
|-------------------------|-----------------|-----------|
| Automatischer Warmstart | 110 | |
| 55 Zyklen | | |
| Temperaturschritte | 95 | 30 sec |
| Gradient | 55-65 | 30 sec |
| Temperaturschritte | 72 | 1 min |
| Zyklus beenden | | |
| Temperaturschritte | 72 | 7 min |
| Lagerung | 10 | unendlich |

Danach wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der das Agarosegel 1,5% mit 1x TBE hergestellt wurde. Die weiteren Schritte der Gelelektrophorese und Detektion sind im Abschnitt 2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese beschrieben.

2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese als biochemische und molekularbiologische Methode werden Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe getrennt; dadurch ist es möglich, die Masse und Größe zu bestimmen. Das Gel funktioniert wie ein Netz, wodurch sich kleinere Moleküle schneller bewegen als größere. Durch das elektrische Feld während der Gelelektrophorese wird eine Größenauftrennung erreicht, die durch die Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht wird.

Vor der eigentlichen Gelelektrophorese wurde das Agarosegel hergestellt. Die Gelkonzentration wurde je nach Methode unterschiedlich gewählt. Je höher die Konzentration ist, desto kleiner die Poren im Gel und desto fester das ausgehärtete Gel. Für die Sanger-Sequenzierung wurde ein 4% Gel, für die Gradienten-PCR ein 1,5% Gel und für die Fragmentlängenbestimmung ein 1% Gel angefertigt. Das Agarose Pulver wurde in 1x TBE bei 800 Watt für ca. 1 Minute in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde zum Gesamtvolumen 6% Ethidiumbromid, um unter UV-Licht aufgetrennte Banden erkennen zu können, pipettiert und leicht geschwenkt. Dann wurde das flüssige Gel in eine Kammer gegeben und ein Kamm aufgesteckt. Nachdem das Gel fest wurde, wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Kammer in eine Elektrophoresezelle gestellt, welche mit 1x TBE gefüllt wurde, sodass das Gel komplett mit 1x TBE bedeckt wurde. In die erste Tasche wurde ein Marker als Größenstandard mit 5 µL pipettiert. In den nächsten Taschen wurden die Proben mit 6x Orange G Farbstoff beladen. Je nach Größe der Taschen wurden 10-25 µL pipettiert. Anschließend wurde die Elektrophoresezelle mit einem Deckel verschlossen und Strom auf 100 V gestellt. Nach Auftrennen der Moleküle wurde die Gelelektrophorese beendet.

Daraufhin wurde das Gel mit dem UVP Gelstudio PLUS von Analytik Jena ausgewertet.

2.2.3 Protein

2.2.3.1 Herstellung von Gewebe-Homogenaten

Bei der Homogenisierung als biochemisches Verfahren werden Zellen zerstört, um das Homogenat – z.B. Proteine, DNA, mRNA – zu erhalten.

Zuerst wurden die Cerebella der Maus-Proben auf einer Feinwaage abgewogen und dann auf Eis mit dem zehnfachen Volumen TES-Complete-Lysepuffer, welcher den Proteaseinhibitor-Cocktail Complete enthält, im Dounce Homogenisator geschreddert. Dann wurde die Flüssigkeit in ein Reaktionsgefäß überführt und das 10%ige Volumen TNES-Puffer hinzu pipettiert. Daraufhin wurde die Probe für 30 Minuten auf Eis gelagert und alle zehn Minuten gevortext. Als Gefrierschutz wurde dem fertigen Homogenat 10% des Volumens Glycerol hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C eingefroren. Die Homogenate wurden später für Filtertrap (siehe 2.2.3.5) verwendet.

2.2.3.2 Herstellung von Gewebe-Lysaten

Die Lyse von Zellen und Gewebe wird durchgeführt, um durch aktives Aufbrechen von Zellen aus Gewebe an Proteine und DNA im Zellinneren zu gelangen.

Aus den unter 2.2.3.1 beschriebenen Homogenaten wurden zur Durchführung von Western Blot Analysen Lysate hergestellt. Die Homogenate wurden zuerst dreimal für drei Sekunden bei einer 10%igen Intensität ultrageschallt und anschließend wurde 15 µL Probe entnommen und diese in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Daraufhin wurden die Proben für 30 Minuten auf höchster Geschwindigkeit bei 4 °C zentrifugiert. Dem hergestellten Lysat wurde 1/10 Glycerol hinzugegeben und dann bei -80 °C eingefroren.

2.2.3.3 Bradford

Der Bradford (Bradford, 1976) wurde zur Evaluation der Proteinkonzentration der einzelnen Proben genutzt. Für diesen wurde eine Standardreihe pipettiert, die aus Wasser und Bovine-Serum-Albumin (BSA)-Stock (10 mg/ml) zusammengesetzt wurde (siehe *Tabelle 2.26: Bradford-Standardreihe*). Bei den zu untersuchenden Lysat- oder Homogenat-Proben wurden 798 µL Wasser und 2 µL Probe in ein Reaktionsgefäß pipettiert; bei den verwendeten Gehirnprouben wurde häufig eine 1/5 Verdünnung der Proben gewählt. Anschließend wurden 200 µL Bradford in die Reaktionsgefäße der Standardreihe und Proben pipettiert und diese wurden für fünf Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden auf einer 96-Well-Platte je 100 μL der Flüssigkeit in die Vertiefungen pipettiert, jede Probe und Standardreihe wurde dupliziert. Anschließend wurde das Programm *Gen5* geöffnet und mit diesem die Extinktion mit einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Mittels einer linearen Eichgerade wurde die Gesamtproteinmenge der untersuchten Probe in Excel berechnet. Dafür wurde folgende Funktion gewählt: $y = m \times x + t$ (m = Steigung, t = y-Achsen-Abschnitt). Anschließend wurde in Excel eine Berechnung durchgeführt, um die Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] unter Berücksichtigung des Gesamtvolumens der Probe zu ermitteln:

$$\frac{\text{Proteinmenge} \times \text{Endvolumen}}{\text{eingesetztes Volumen}} \div 1.000.$$

Tabelle 2.26: Bradford-Standardreihe

| | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| BSA [μg] | 0 | 1 | 2 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| H₂O [μL] | 800 | 799 | 798 | 795 | 790 | 785 | 780 |

2.2.3.4 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren der Molekularbiologie, in welchem Proteine durch eine Übertragung – Blotting – auf eine Trägermembran übertragen und dort mittels Antikörperbindung nachgewiesen werden.

Bevor die eigentlichen Schritte des Western Blots begonnen werden konnten, wurden die Proben vorbereitet. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde zuvor durch einen Bradford Assay (siehe 2.2.3.3 Bradford) bestimmt. Der Mastermix wurde, wie in Tabelle 2.27 beschrieben, hergestellt. Je nach gemessener Probenmenge – abhängig von der im Bradford bestimmten Proteinkonzentration – wurde TES-Puffer hinzugegeben, damit am Ende eine Proteinkonzentration von 30 μg pro Probe vorlag.

Material und Methoden

Tabelle 2.27: Mastermix zur Probenvorbereitung

| Mastermix | |
|-------------------------|---------|
| Probenmenge | 30,0 µg |
| finales Volumen, ad TES | 20,0 µL |
| LDS Puffer (4x) | 5,0 µL |
| 1 M DTT (10x) | 2,0 µL |

Nach dem Zusammenbau der Polyacrylamid (PAGE)-Gießstation, bei welchem man unter anderem eine dicke und eine dünne Glasplatte benötigt, und nach deren Überprüfen mit Wasser auf Dichtigkeit wurde die prozentualen Mengenangaben der Komponenten der Gele vom Sheet von T. Knaut, 2020, entnommen (siehe *Tabelle 2.28: 8%iges Trenngel und 6%iges Sammelgel für ein Gel*). Für das Trenngel wurde ein 8%iges Gemisch gewählt, für das Sammelgel 6%. Dieser Prozentsatz ergibt sich aus zwei Parametern, und zwar der Gesamtmonomerkonzentration (%T, in g/100 mL) sowie aus dem Gewichtsprozentsatz der Vernetzung (%C). Durch diese Parameter kann die Porengröße des Gels optimiert und somit eine sehr gute Trennung und Auflösung der zu untersuchenden Proteine zu erzielt werden. Ein höheres %T bedeutet durchschnittlich kleinere Poren, da sich dieses auf ein größere Polymer-Wasser-Verhältnis bezieht.

Tabelle 2.28: 8%iges Trenngel und 6%iges Sammelgel für ein Gel

| Komponente | Trenngel (1 Gel, 5mL) | Sammelgel (2 Gele, 5 mL) |
|---|------------------------------|---------------------------------|
| 3,5x Bis/Tris-Puffer; pH 6,7; 1,25 M | 1,42 mL | 1,42 mL |
| Acrylamid | 1,34 mL | 1 mL |
| H ₂ O | 2,2 mL | 2,58 mL |
| APS (Ammoniumpersulfat) | 30 µL | 30 µL |
| TEMED (Tetramethylethyldiamin) | 4 µL | 4 µL |

In zwei 15 mL Falcons wurde zuerst Wasser, dann Tris-Puffer und Acrylamid hinzugegeben. Da TEMED ein Katalysator und APS ein Radikalinitiator ist, wodurch die

Material und Methoden

Polymerisation ausgelöst wird, wurden beide Komponenten sehr schnell hinzugegeben. Zuerst wurde dieser Schritt für das Trenngel durchgeführt, daraufhin wurde das Falcon zwei- bis dreimal invertiert. Anschließend wurde ca. 4,5 mL flüssiges Trenngel mit dem Pipetboy aus dem Falcon pipettiert und in der Horizontalen in die Gießstation zwischen den zwei aneinander liegenden Glasplatten gegeben. Folgend wurden ca. 0,5 mL Isopropanol in der Horizontale auf das Trenngel pipettiert, dadurch wurde das Trenngel in eine gerade Horizontale bewegt. Nach ca. 15 Minuten wurde das Trenngel aufgrund der Polymerisation fest und mit einem Whatman-Papier wurde das flüssige Isopropanol abgetupft. Im Anschluss wurde der Vorgang für das Sammelgel wiederholt. Nachdem das Sammelgel zwischen die Glasplatten pipettiert worden war, wurde der Kamm – entweder 10er oder 15er Kamm – eingebracht. Nach ca. 15 min war das Sammelgel auspolymerisiert, nachfolgend wurden die Reste des Gels von den Gläsern unter fließendem Wasser weggespült und der Kamm vorsichtig entfernt. 1x MOPS-Laufpuffer wurde für zwei Gele folgendermaßen angesetzt: 50 mL 20x MOPS – Stocklösung – auf 1 L H₂O auffüllen. Hiernach wurde die Kammer zusammengebaut und mit Wasser auf Dichtigkeit geprüft. Die innere Kammer, welche durch die Gele gebildet wurde, wurde randvoll und die äußere Kammer bis ca. 1/3 mit MOPS-Laufpuffer gefüllt. Mit einer Pipette wurden die Taschen mit Laufpuffer gespült und dann mit den Proben befüllt. Zuerst wurde die Gel-Elektrophorese 15 Minuten für 100 V gestartet. Nachdem die Proben scharf abgegrenzt die Sammel-Trenngel-Grenze erreicht hatten, wurde die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht für eineinhalb Stunden auf 120 V durchgeführt. Da bei der Probenvorbereitung LDS zu den Proteinen hinzugefügt wurde, wurden dadurch alle Proteine von negativer Ladung umfüllt, dadurch wurden die Proteine vom Minuspol zum Pluspol gezogen. Somit wurde sichergestellt, dass die Proteine nach Größe und nicht nach Ladung aufgetrennt wurden. Zudem wurde in der Vorbereitung DTT – ein Reduktionsmittel – hinzugegeben. Die Disulfidbrücken-Bindungen wurden durch DTT aufgebrochen, wodurch die Proteine reduziert wurden. Zusätzlich wurden die Proteine aufgrund einer Hitzedenaturierung für zehn Minuten und 70 °C zu ihrer Primärstruktur aufgebrochen. Nachdem die Proteine der Größe nach mittel Acrylamid-Elektrophorese aufgetrennt wurden, wurde ein Proteintransfer durchgeführt. Für den Transfer der Proteine wurde ein Transferpuffer mit einem Volumen von 1,2 L benötigt. Für den Transferpuffer wurden 60 mL von 20x Transferpuffer, sowie 180 mL von

Material und Methoden

Methanol benötigt und anschließend mit ddH₂O auf 1,2 L aufgefüllt. Für den Transfer wurden eine Nitrocellulose-Membran á 8,5 mm x 7,5 mm und vier Whatman-Papiere á 9 mm x 9 mm benötigt. Die Membran und die Filterpapiere wurden zuerst für 30 Sekunden in H₂O und anschließend in Transferpuffer eingelegt. Nun wurde die dünne Glasplatte vorsichtig von der dicken Glasplatte abgelöst und die Membran auf das Gel gelegt. Nachfolgend wurde die Membran mit Transferpuffer befeuchtet und es wurde ein Filterpapier auf die Membran gelegt, ebenfalls befeuchtet. Dann wurden mit einem Spatel sanft die Luftblasen zwischen Gel, Membran und Whatman-Papier ausgestrichen. Dies wurde mit einem weiteren Filterpapier wiederholt. Daraufhin wurde der Stapel Gel-Membran-Filterpapier auf einen dicken Schwamm und auf das weiße Gitter des Siebes gelegt, dann wurde das Paket umgedreht. Der ganze Vorgang wurde nun mit der dicken Glasplatte wiederholt. Am Ende wurden ein dünner Schwamm und das schwarze Gitter des Siebes aufgelegt (Abb. 2.2).

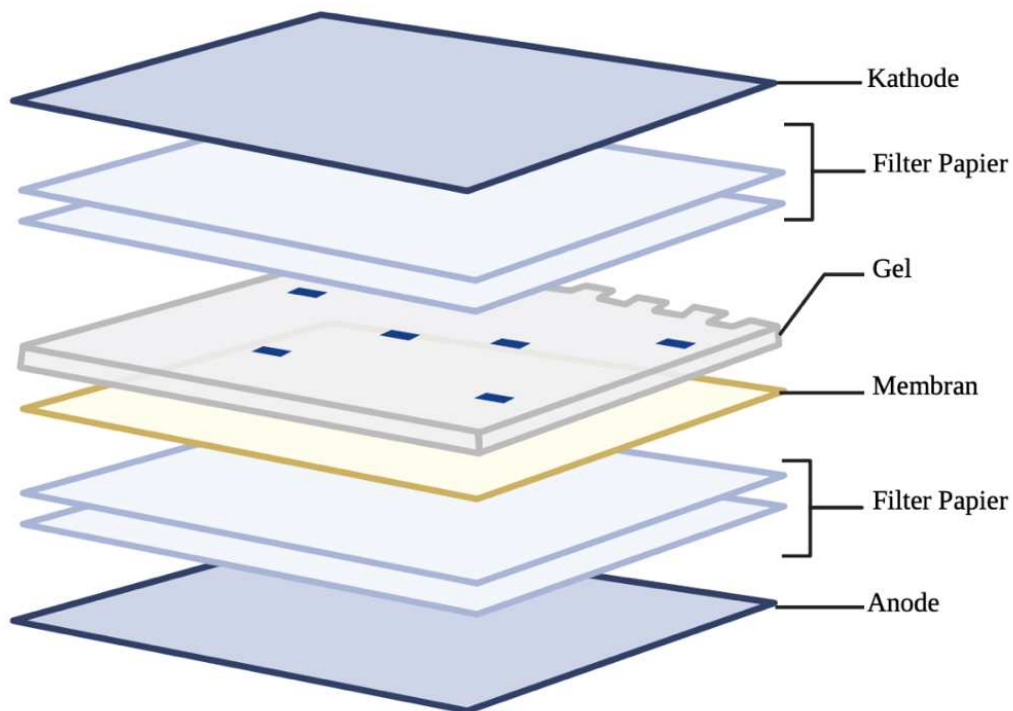


Abbildung 2.2: Zusammenbau des Gitters mit den aus der PAGE-resultierenden Proteinbanden auf eine Membran (erstellt in BioRender.com)

Material und Methoden

Die Gitter wurden nun zusammengeklemmt und die Kassette in den Transfer-Blotting-Tank eingebracht. Der Transfer wurde unter Wasserkühlung und 80 V für zwei Stunden durchgeführt. Nach der Laufzeit wurden das Gitter geöffnet, die Filterpapiere mit einer Pinzette entfernt und die Membran in einer Schale in Ponceau S Färbung gelegt. Nach einer Einwirkzeit von ca. 30 Sekunden wurde die Membran zwei- bis dreimal mit Wasser gewaschen, bis die Rotfärbung auf der Membran heller wurde. Die Färbung wurde als Beweis des funktionierten Transfers durchgeführt, da Ponceau S reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine bindet. Dann wurde die Membran in eine mit 1x TBS gefüllte Schale gelegt und auf einen Wippschüttler gebracht. Dieser Vorgang wurde bis zur vollständigen Entfärbung der Membran wiederholt. Danach wurde die Membran in ein 50 mL Falcon gerollt. Es wurde darauf geachtet, dass die Rückseite der Membran auf die Innenseite des Falcons gelegt und somit die Vorderseite der Membran im Inneren des Falcons positioniert wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit Blocking-Reagenz, um unspezifische Bindungen des später eingesetzten Antikörpers an Proteine, an welche er nicht binden soll, zu verhindern. Für ein Gel wurden von 10 mL 1x TBS und 5%iges Milchpulver in ein 15 mL Falcon gegeben und gut gelöst. Das Blocking-Reagenz wurde dann in das Falcon mit der Membran gegeben und eine Stunde auf der Rollwippe inkubiert. Anschließend wurde das Blocking-Reagenz aus dem Falcon entfernt und die Membran dreimal mit 1x TBST-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurde das Falcon für fünf Minuten auf der Rollwippe inkubiert. Der Primär-Antikörper (Primär-AK) wurde vorher mit 1x TBST-Puffer verdünnt. In der Regel wurde eine 1:5.000 Verdünnung gewählt. Die jeweils gewählte Verdünnung ist allerdings von Antikörper zu Antikörper unterschiedlich und im Kapitel 2.1.11 für jeden Antikörper aufgeführt. Für eine 1:5.000 Verdünnung wurden 5 mL 1x TBST, 50 μ L 2% NaN_3 – Verhinderung des Bakterienwachstums – und 1 μ L Primär-Antikörper in einen 15 mL Falcon gegeben und auf der Rollwippe für zehn Minuten unter Bewegung auf einer Rollwippe bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wurde nach dem Waschvorgang zum Membran-Falcon gegeben und über Nacht bei 4 °C auf der Rollwippe inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Primär-AK von der Membran entfernt, danach wurde die Membran mit 1x TBST-Puffer für dreimal je fünf Minuten auf der Rollwippe gewaschen. Der Sekundär-Antikörper (Sekundär-AK) – gegen die Spezies vom Primär-Antikörper

gerichtet – wurde ebenfalls mit 1x TBST-Puffer auf 1:5.000 verdünnt, zum Membran-Falcon gefüllt und eine Stunde auf der Rollwippe inkubiert. Entweder wurden HRP-gekoppelte Sekundär-AK oder Fluoreszenz-gekoppelte Sekundär-AK verwendet. Bei Letzteren musste ab diesem Schritt im Dunkeln gearbeitet werden. Im Kapitel 2.1.11 Antikörper sind die Sekundär-AK und deren jeweilige Verdünnung zu finden. Danach wurde mit 1x TBST-Puffer gewaschen: viermal je fünf Minuten bei Raumtemperatur auf der Rollwippe.

Falls die Chemilumineszenz, bei der durch eine chemische Reaktion elektromagnetische Strahlung im Bereich sichtbaren und ultravioletten Lichts emittiert wird, angewendet wurde, folgten im Vergleich zur Fluoreszenz bis zur Detektion noch weitere Schritte. Nach der viermaligen Waschung mit 1x TBST-Puffer wurde zusätzlich einmal mit 1x TBS-Puffer für fünf Minuten bei Raumtemperatur auf der Rollwippe gewaschen. Das HRP-Substrat für die Chemilumineszenz wurde 1:1:2 angesetzt, das heißt, es wurden in ein 50 mL Falcon 1 mL Peroxid, 1 mL Sirius und 2 mL H₂O hinzugegeben. Die Membran wurde nun in das Falcon mit dem Chemilumineszenz-Substrat gegeben und dieses für zwei Minuten bei Raumtemperatur auf der Rollwippe inkubiert.

Für die Detektion wurde die Membran auf ein feuchtes Tablett gelegt und auf der Vorderseite mit Wasser befeuchtet. Auf die Membran wurde dann eine Folie gelegt und mit einem Tuch wurden die Blasen entfernt. Mit dem Programm *Image Studio Lite Version 5.2* wurden die Kanäle, je nach Sekundär-AK, – 700, 800, Chemilumineszenz – ausgewählt und die Detektion gestartet. Um die Membran mit weiteren Antikörpern inkubieren zu können, wurden die Membranen zur Entfernung des ersten Antikörperkomplexes gestrippt. Dafür wurden 10 mL Stripping-Puffer in das Falcon gegeben und für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf der Rollwippe inkubiert; dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 5 mL 1x TBST-Puffer und einmal mit 5 mL 1x TBS-Puffer gewaschen; bei jedem Waschschrift wurde die Membran für fünf Minuten bei Raumtemperatur auf der Rollwippe inkubiert. Währenddessen wurde ein Blocking-Reagenz mit 5%igem Milchpulver und 10 mL 1x TBS-Puffer hergestellt und gut gemischt. Nach dem Waschen wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf der Rollwippe geblockt. Daraufhin wurde dreimal mit 5 mL 1x TBST-Puffer gewaschen; bei jedem Waschschrift wurde die Membran für fünf Minuten bei Raumtemperatur auf der Rollwippe inkubiert.

Anschließend wurde der Primär-AK über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die nächsten Schritte wurden wiederholt wie oben beschrieben.

2.2.3.5 Filter Trap

Der Filter Trap als biochemische Methode weist die Interaktion von Molekülen nach. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und dreimal für drei Sekunden mit 10%iger Intensität ultrageschallt. Bei einer sehr hohen Proteinkonzentration wurden die Proben vor der Probenvorbereitung 1:10 verdünnt. Bei dieser wurden je nach Probenkonzentration der Verdünnungs-Puffer, die Probe und DTT hinzugegeben (siehe *Tabelle 2.29: Mastermix für Filter Trap*). Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt.

Tabelle 2.29: Mastermix für Filter Trap

| Mastermix | einfach |
|--------------------|----------------|
| Proteinmenge | 1,00 µg |
| Verdünnungsvolumen | 100,0 µL |
| 1 M DTT | 7,5 µL |

Nach der Probenvorbereitung wurde das Mikrofiltrationsgerät zusammgebaut und die zuvor zurecht geschnittenen Whatman-Papiere – 6,6 cm breit und 22 cm lang – und die 0,45 µm dicke Nitrocellulose-Membran – 6,6 cm breit mit variabler Länge je nach Probenauftrag – eingelegt. Folgend wurden zweimal alle Slots mit 100 µL Äquilibrations-Puffer, dann wurden die Proben mit 100 µL in die Slots pipettiert. In der Horizontalen wurde der gleiche Genotyp der Proben mit n=3 aufgetragen. Anschließend wurden die Slots zweimal mit Wasch-Puffer von je 100 µL gereinigt. Daraufhin wurde die Membran zurechtgeschnitten und in ein 50 mL Falcon überführt; die Vorderseite der Membran wurde in das Innere des Falcons gelegt, sodass die Rückseite der Membran auf der Innenseite des Falcons platziert wurde. Die Membran wurde zweimal mit 5 mL 1x TBST für fünf Minuten auf der Rollwippe bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde pro Membran ein Blocking-Reagenz mit 10 mL 1x TBS und 5%igem Milchpulver in das

Falcon gegeben und dieses für eine Stunde geblockt. Nachfolgend wurde die Membran dreimal mit 1x TBST für fünf Minuten auf der Rollwippe inkubiert. Dann wurde der mit 1x TBST verdünnte Primär-AK in den Falcon gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einer Rollwippe inkubiert (siehe 2.1.11 Antikörper).

Am nächsten Tag wurde die im Falcon aufbewahrte Membran dreimal mit 5 mL 1x TBST für 5 Minuten auf der Rollwippe gewaschen und daraufhin der mit 1x TBST verdünnte Sekundär-AK in das Falcon gegeben und eine Stunde UV-geschützt auf der Rollwippe inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal mit 5 mL 1x TBST für fünf Minuten auf der Rollwippe gewaschen. Die Detektion, das nachfolgende Strippen, Waschen, Blocken, Waschen wurde, wie beim Western Blot beschrieben (siehe 2.2.3.4), durchgeführt. Die weiteren Schritte ab dem Primär-AK wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.3.6 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wird verwendet, um gewebe- und zelltypische Proteine durch spezifische Antikörper zu identifizieren und darzustellen. Dadurch kann bestimmt werden, in welchem Gewebe oder in welcher Region das Protein vorhanden ist.

Für diese Methode wurden Gehirnschnitte von Mäusen mit 3 Monaten, 12 Monaten und 13 Monaten gewählt. Die SCA3-KI-Mäuse (Haas et al., 2022) mit Wildtyp und Homozygot 304Q expandiertem murinen ATXN3 wurden verglichen; beide sind im Materialteil unter 2.1.9 aufgelistet. Die Deparaffinierung der Maushirnschnitte (7µm) wurde mit dem Leica Autostainer XL der Firma Leica Biosystems, wie in Tabelle 2. 30 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 2.30: Deparaffinierung der Maushirnschnitte

| Schritt | Lösemittel | Konzentration | Zeit [Minuten] |
|---------|------------|---------------|----------------|
| 1 | Xylol | 100% | 8 |
| 2 | Xylol | 100% | 8 |
| 3 | Xylol | 100% | 8 |

Material und Methoden

| | | | |
|----|----------------|--------|---|
| 4 | Ethanol (EtOH) | 100% | 5 |
| 5 | EtOH | 100% | 5 |
| 6 | EtOH | 96% | 5 |
| 7 | EtOH | 96% | 5 |
| 8 | EtOH | 80% | 5 |
| 9 | EtOH | 70% | 5 |
| 10 | EtOH | 50% | 5 |
| 11 | EtOH | 30% | 5 |
| 12 | 1x PBS | pH 7,4 | 5 |

Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit 1x PBS für fünf Minuten auf einem Wippschüttler gewaschen. Die Objektträger wurden dreimal mit 10 mM Citrat, pH 6, für fünf Minuten bei maximaler Leistung in der Mikrowelle erhitzt. Dann wurden die Schnitte in 1x PBS fünf Minuten auf dem Wippschüttler gewaschen. Nachfolgend wurde die endogene Peroxidase gehemmt, indem 1% Wasserstoffperoxid auf die Objektträger für 10 Minuten bei Raumtemperatur gegeben wurde. Nach diesem Schritt wurden die Schnitte dreimal mit 1x PBS für fünf Minuten auf einen Wippschüttler gegeben. Für das Blocken im Anschluss wurden die Objektträger in 5% Normales Ziegen Serum mit 0,3% Triton-X in 1x PBS bei Raumtemperatur für 45 Minuten gegeben. Der Schritt mit dem dreimaligen Waschen mit 1x PBS, wie oben beschrieben, wurde wiederholt. Die Schnitte auf einem Objektträger wurden mit einem Fettstift voneinander getrennt, um eine Kontamination der verschiedenen Antikörper zu vermeiden. Die Primär-Antikörper (siehe 2.1.11) wurden mit 3%igem Ziegen Serum in 1x PBS verdünnt, sodass pro Schnitt 100 µL aufgetragen wurde. Danach wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Mausschnitte dreimal mit 1x PBS für fünf Minuten auf einem Wippschüttler gewaschen und anschließend mit dem Sekundär-Antikörper (siehe 2.1.11) inkubiert. Für diesen Antikörper wurde eine Verdünnung mit 1,5% Ziegen Serum in 1x PBS angesetzt und dieser auf den Schnitten eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das ABC-Reagenz gemischt. Dafür wurden jeweils 2% von Reagenz A und Reagenz B aus dem VECTASTAIN Elite ABC-HRP Kit in 1x PBS gegeben, kurz gevortext und dann für eine Stunde zur Komplexbildung stehen gelassen.

Material und Methoden

Danach wurden die Objektträger einmal mit 1x PBS für fünf Minuten gewaschen und je Schnitt wurden 100 μ L ABC-Komplex aufgetragen und dies für eineinhalb Stunden inkubiert. Anschließend wurde der wie oben beschriebene Waschvorgang dreimal durchgeführt. Diaminobenzidin-Tabletten (DAB) wurden in 1 mL 1x PBS gelöst und auf die Schnitte wurde eine Menge von 80-100 μ L dieser Lösung pipettiert. Für jeden Schnitt wurde die gleiche Inkubationszeit gewählt. Zum Stoppen der Inkubationszeit wurden die Flüssigkeit längsseitig abgekippt und die Objektträger in einen Wasserkasten gestellt. Im Anschluss wurde mit dem Leica Autostainer XL die Dehydrierung durchgeführt (siehe *Tabelle 2.31: Dehydrierung der Maushirnschnitte*).

Tabelle 2.31: Dehydrierung der Maushirnschnitte

| Schritt | Lösemittel | Konzentration | Zeit [Minuten] |
|---------|----------------|---------------|----------------|
| 1 | Ethanol (EtOH) | 70% | 5 |
| 2 | EtOH | 80% | 5 |
| 3 | EtOH | 96% | 5 |
| 4 | EtOH | 96% | 5 |
| 5 | EtOH | 100% | 5 |
| 6 | EtOH | 100% | 5 |
| 7 | Xylol | 100% | 8 |
| 8 | Xylol | 100% | 8 |
| 9 | Xylol | 100% | 8 |

Abschließend wurden die Objektträger mit CV Ultra Mounting Medium engedeckelt und über Nacht unter den Abzug gestellt. Am nächsten Tag wurde mit dem Axioplan2 Mikroskop detektiert. Die fünf Hirnregionen – Cerebellum, Hippocampus, Nuclei cerebelli, Pons, Truncus encephali –, die am stärksten an der SCA3-Pathogenese beteiligt sind, wurden analysiert. Mit dem Programm *AxioVision* wurden die Bilder der Schnitte aufgenommen und bearbeitet.

2.2.4 Statistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse von Filter Trap, Western Blot und qPCR wurde *GraphPad Prism* in der Version 9.4.0 verwendet. Für die Auswertung der Unterschiede zwischen Wildtyp, Heterozygot und Homozygot wurde eine *TwoWay ANOVA* durchgeführt. Im Rahmen der Statistik-Analyse wurde auf Normalität und auf die Normalität von Residuen aus der nichtlinearen Regression als Teil der nichtlinearen Regressionsanalyse getestet. Darüber hinaus wurde eine deskriptive Statistik angewendet. Für die Auswertung der qPCR-Ergebnisse wurde der unpaare t-Test verwendet, der die Differenz zwischen genau zwei Werten berechnet; t-Test ist die häufigste Methode, um den Durchschnitt einer Stichprobe zu ermitteln.

Die Signifikanzniveaus wurden für alle statistischen Auswertungen gleichermaßen ausgewählt:

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

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht des Forschungsprojektes

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) gehört zu den Spinozerebellären Ataxien, welche als genetisch heterogene Gruppe von autosomal-dominant vererbten progressiven Störungen zusammengefasst sind. SCA3, auch Machado-Joseph-Krankheit (MJD) genannt, zeigt sich mit Symptomen wie Ataxie, Ophthalmoplegie, Spastik und Gesichtsatrophie. Die Neuropathologie findet im Gyrus Dentatus des Hippocampus, den Basalganglien, Substantia nigra und im Rückenmark statt (Klockgether et al., 2019). Durch makroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Gehirne von SCA3-PatientInnen mit einer Krankheitsdauer von mehr als 15 Jahren durchweg eine erhebliche Atrophie des Cerebellums, der Pons und der Medulla oblongata, eine Depigmentierung der Substantia nigra und eine Atrophie der Hirnnerven N. oculomotorius und N. hypoglossus aufweisen (Riess et al., 2008). Darüber hinaus sind durch histologische Untersuchungen intranukleäre Inklusionen, welche Aggregate der expandierten ATXN3-Proteine beinhalten, in vielen Arealen des Gehirns auszumachen (Bichelmeier et al., 2007). Bisher wurden noch nicht ausreichend Biomarker validiert, die für verschiedene Fragestellungen – wie Progression oder Therapie – zur Verfügung stehen. Um neue Biomarker im Blut von SCA3-PatientInnen zu identifizieren, wurde in dieser Dissertation auf bestehende bioinformatische RNA-Sequenzierungs-Datensätze zurückgegriffen. Diese Datensätze sind vom Gewebe Blut bei SCA3 PatientInnen verfügbar. Die ProbandInnen wurden in mehrere Gruppen aufgeteilt, die sich aus dem SARA-Score von Schmitz-Hübsch et al., 2006 ergeben: präataktisch, mild, moderat, schwer, Kontrolle. Außerdem gibt es weitere bioinformatische Sequenzierungs-Datensätze, die aus dem Cerebellum von SCA3 PatientInnen und KontrollprobandInnen als auch von SCA3 KI Mäusen mit 304Q (Haas et al., 2022) gewonnen wurden. Hier wurden die SCA3 Tiere mit gleichaltrigen wildtypischen Tieren verglichen. Des Weiteren wurden Sequenzierungs-Datensätze von YAC84Q Mäusen (Cemal et al., 2002) analysiert. Diese Daten wurden innerhalb des Gewebes – Cerebellum, präfrontaler Cortex, Striatum –, innerhalb der Genotypen wildtypisch und transgen und des Alters gegenübergestellt. Da Chaperone bei dem Aggregationsprozess involviert sind (Satyal et

al., 2000), wurden von diesen einige ausgewählt und auf RNA- und Protein-Ebene in Bezug auf die Pathogenese der Spinocerebellären Ataxie Typ 3 untersucht.

Deswegen werden im folgenden Abschnitt die Ergebnisse der Dissertation in drei Teilen dargelegt; zur Veranschaulichung dient Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1. Teil A präsentiert die IPA-Analyse, welche mittels der webbasierten Software *Ingenuity PathwayAnalysis* durchgeführt wurde. Mittels dieser konnten Analysen und Kenntnisse von Daten aus Genexpression ermittelt werden, welche unter anderem in Netzwerken und *Pathways* präsentiert wurde. Anhand dieser Methode wurden die ausgewählten Proteine, die in der aktuellen Literatur, in einer Studie mit 60 ESMI-ProbandInnen (Raposo et al., 2023) und in der Masterarbeit mit longitudinalen Blutproben in RNA-Sequenzierungen und bioinformatischen Auswertungen (Nicole Vasilenko, Masterarbeit) exprimiert waren, analysiert (Tabelle 3.1). Es wurden RNA-Sequenzierungsdaten von homozygoten 304Q KI-Mäusen (Haas et al., 2022), hemizygoten YAC84Q Mäusen (Cemal et al., 2002) und SCA3 PatientInnen analysiert. Neben der bioinformatischen Analyse wurden die exprimierten Proteine OTOF, SUSD1 und SFT2D2, welche in der RNA-Sequenzierung und bioinformatischen Auswertung von longitudinalen Blutproben am stärksten reguliert waren (Nicole Vasilenko, Masterarbeit), mittels quantitativer Echtzeit-PCR in Teil B untersucht. Dies wurde zuerst mittels *Two-Step* Verfahren und später nach der Etablierung dieser im *One-Step* Verfahren durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse in der IPA-Analyse wurde mit dem etablierten SUSD1 qPCR-Analyse die Gruppe der SCA3 PatientInnen mit schwerer Ataxie in Bezug zu den präataktischen SCA3 PatientInnen ermittelt. Zudem wurden die Proteine des Interesses in Teil C mit den Protein-Methoden – Western Blot, Filter Trap und Immunhistochemie – in SCA3 Knock-In (KI) Mäusen (Haas et al., 2022) analysiert. Es wurden verschiedene Altersstufen der KI-Mäuse von 3 Monaten, 12 Monaten und 18 Monaten untersucht, um den Einfluss im Krankheitsverlauf abzubilden. Um lösliche Proteinlevel der verschiedenen Proteine zu ermitteln, wurden diese in 304Q KI Maus Gehirnproben zu unterschiedlichen Lebenszeitpunkten in 304Q KI Tieren mittels Western Blot untersucht. Um die Aggregation der untersuchten Chaperone in den verschiedenen Genotypen zu analysieren, wurden diese in 18-monatigen SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen ermittelt. Mittels Immunhistochemie wurden die Sagittalschnitte von homozygoten 304Q KI Tieren und wildtypischen Mäusen

Ergebnisse

gefärbt und vor allem die Gehirnareale Cerebellum, Pons und Hippocampus vergleichsweise ausgewertet.

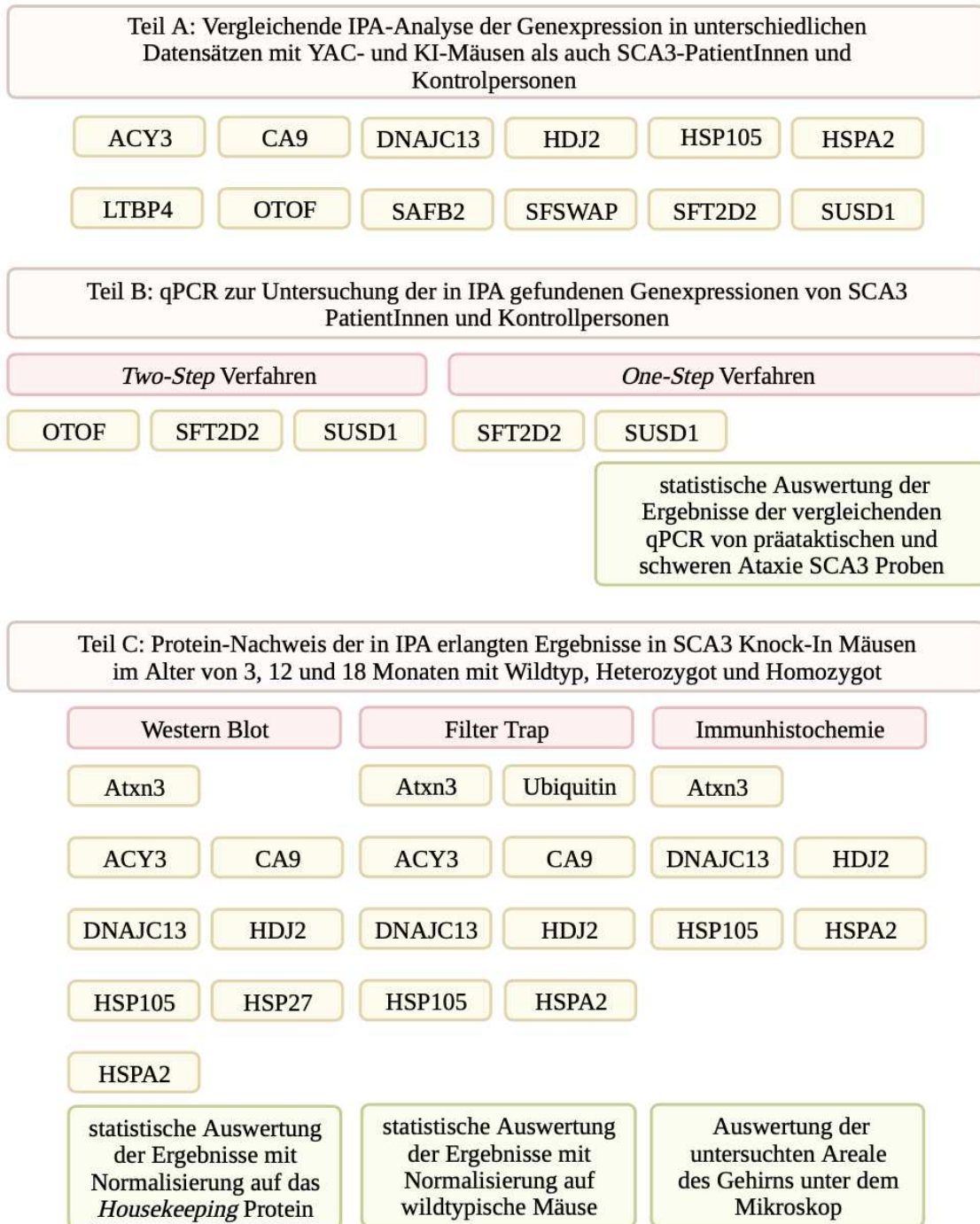


Abbildung 3.1: Übersicht des Workflows der Verfahren (erstellt in BioRender.com)

Workflow aus drei Teilen (A, B, C) bestehend

Teil A: hier wurde eine bioinformatische Analyse mit allen ausgewählten Proteinen vorgenommen

Ergebnisse

Teil B: hier wurden quantitative Echtzeit-PCRs aufgrund der Ergebnisse in Teil A erst im Two-Step und dann im One-Step Verfahren durchgeführt; es folgte eine statistische Auswertung der vergleichenden qPCR von präataktischen MutationsträgerInnen und SCA3 PatientInnen mit schwerer Erkrankungsform

Teil C: hier wurden die Proteinmethoden Filter Trap, Western Blot und Immunhistochemie aufgrund der Ergebnisse in Teil A angewendet; beim Filter Trap und Western Blot wurde eine statistische Auswertung der Ergebnisse mit Normalisierung auf die wildtypischen Tiere oder auf das Housekeeping Protein vorgenommen; bei der Immunhistochemie erfolgte die Auswertung der untersuchten Gehirnareale unter dem Mikroskop

Tabelle 3.1: Ausgewählte Proteine für die Dissertation

| Auswahl begründet auf Referenzen | Proteine |
|--|--|
| RNA-Sequenzierung und bioinformatische Auswertung longitudinaler Blutproben (Nicole Vasilenko, Masterarbeit) | SUSD1, SFT2D2, OTOF |
| Blood transcriptome sequencing identifies biomarkers able to track disease stages in spinocerebellar ataxia type 3 (Raposo et al., 2023) | SFSWAP, SAFB2, LTBP4 |
| Exprimierte Proteine oder Hitzeschockproteine aus aktueller Literatur | ACY3, CA9, DNAJC13, HDJ2, HSP105, HSP27, HSPA2 |

3.2 Teil A: IPA-Analyse

Die Software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) wurde verwendet, um Kenntnisse über die Chaperone in Bezug auf SCA3 PatientInnen und Kontrollpersonen als auch YAC- und KI-Mäusen zu erlangen. IPA ermöglicht, dass Analysen in Form von Netzwerken und *Pathways* dargestellt werden können. Anhand der Netzwerke konnte herausgefunden werden, in welchem Verhältnis und mit welcher Expression das gesuchte Gen steht, währenddessen im Pathway gezeigt werden konnte, in welchem biologischen Kontext das Chaperon auftaucht. Die Entscheidung der Auswahl der Chaperone für *Ingenuity Pathway Analysis* wurde auf Basis der aktuellen Literatur, der Studie von Raposo et al.,

2023 und der Daten von Nicole Vasilenkos Masterarbeit getroffen (Tabelle 3.1). Im Anhang ist die Tabelle 9.1 zu finden, welche die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse aller untersuchten Proteine tabellarisch darstellt.

3.2.1 Hochreguliertes ACY3 in Verbindung mit Creb

Das Enzym Aminoacylase 3, kodiert durch ACY3, deacetyliert Acetylcystein und N-acetylierte aromatische Aminosäuren. Maus-Studien belegen, dass ACY3 am häufigsten in der Niere, Leber, Herz und Gehirn gefunden wurde (Pushkin et al., 2004). Im humanen Gewebe findet die Expression von ACY3 in Neuronen und dem Nebennierenmark statt (Long et al., 2011). Mit der Methodik der IPA-Analyse wurde ACY3 (Tab. 3.2) in folgenden Netzwerken der RNA-Sequenzierungs-Datensätzen als hochreguliert ermittelt: SCA3 Maus KI 2M (Cerebellum), SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M, SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M, SCA3 Maus Transgen 84Q Striatum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M.

Tabelle 3.2: Alle signifikanten Expressionen von ACY3 in der bioinformatischen Auswertung

| Datensatz | logFold Change | p-Wert | Netzwerk | Pathway |
|--|-----------------------|---------------|--|----------------|
| SCA3 Maus KI 2M (Cerebellum) | 0,926 | $1,66e^{-4}$ | Zellentwicklung, Zellwachstum und -proliferation, Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems | |
| SCA3 Maus Transgen 84Q Striatum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M | 1,057 | $3,08e^{-9}$ | Entwicklungsstörung, Erbstörung und Stoffwechselerkrankung | |
| SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum | 0,484 | $1,16e^{-3}$ | Zellmorphologie, Zellfunktion und -erhaltung, | |

Ergebnisse

| | | | |
|---|-------|--------------|---|
| Wildtyp 12M vs. Transgen 12M | | | Entwicklung und Funktion des Nervensystems |
| SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M | 0,691 | $3,15e^{-5}$ | Zellaufbau und -organisation, Zellentwicklung, Zellfunktion und -erhaltung |

Im Datensatz zu der SCA3 Knock In (KI) Maus mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) wurde ACY3 in 2 Monate alten Mäusen (2M, Cerebellum) im Netzwerk „Zellentwicklung, Zellwachstum und -proliferation, Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems“ mit einem logFold Change von 0,926 und einem p-Wert von $1,66 e^{-4}$ hochreguliert in SCA3 Mäusen in Bezug auf gleichaltrige Kontrolltiere ermittelt. Auch im Datensatz der zweiten untersuchten SCA3 Maus, welche das humane ATXN3 mit 84Q und allen regulatorischen Elementen und dem endogenen Promotor (YAC84Q, (Cemal et al., 2002)) enthielt, wurde ACY3 in 2 Monate alten SCA3 Tieren im Netzwerk „Zellaufbau und -organisation, Zellentwicklung, Zellfunktion und -erhaltung“ mit einem logFold Change von 0,691 und einem p-Wert von $3,15 e^{-5}$ hochreguliert analysiert. Die Analyse des gleichen Tiermodells (YAC84Q) im Alter von 12 Monaten zeigte, dass ACY3 mit einem logFold Change von 0,484 und einem p-Wert von $1,16 e^{-3}$ im Netzwerk „Zellmorphologie, Zellfunktion und -erhaltung, Entwicklung und Funktion des Nervensystems“ in Bezug auf gleichaltrige wildtypische Mäuse hochreguliert wurde. ACY3 steht in allen drei Netzwerken (Abb. 3.2A) in Verbindung mit *Creb – cAMP responsive element binding protein*. Durch *Creb*, welches selbst keine differentielle Expression in den Datensätzen zeigte, kann es, laut des dargestellten Netzwerks, zu einer indirekten Aktivierung von dem hochregulierten ACY3 in Form einer Inhibierung kommen. ACY3 als auch *Creb* üben eine Expression auf sich selbst aus; bei *Creb* wird dadurch eine Inhibierung ausgelöst, währenddessen bei ACY3 die Wirkung nicht vorherzusagen ist (Abb. 3.2A). Mit einem logFold Change von 1,057 und einem p-Wert von $3,08 e^{-9}$ wurde ebenfalls in den SCA3 YAC84Q Mäusen im Striatum, welche nicht den Hauptpathogeneseort der SCA3 darstellt und hier eher als Kontrollhirnregion fungierte, in zwölfmonatigen, transgenen YAC84Q Mäusen im Netzwerk „Entwicklungsstörung, Erbstörung und Stoffwechselerkrankung“ eine Hochregulation

gefunden in Bezug auf gleichaltrige, gleichgeschlechtliche Geschwistertiere. Das hochregulierte ACY3 steht, wie in Abbildung 3.2B gezeigt, in Verbindung mit dem aus dem Netzwerk aus Abb. 3.2A beschriebenen Creb. Durch das runterregulierte Creb kommt es hier zu einer indirekten Expression von ACY3 in Form einer Inhibierung. Auch hier wird eine Selbst-Expression durch Creb, wodurch es zur Inhibierung kommt, als auch durch ACY3 ausgeübt. Jedoch ist die Wirkung des Mechanismus auf ACY3 nicht vorhersehbar (Abb. 3. 2B).

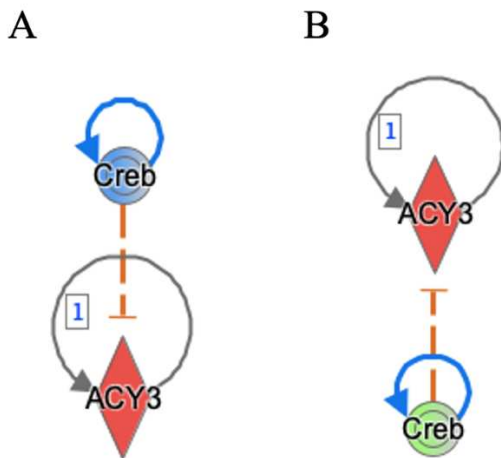


Abbildung 3.2: Hochreguliertes ACY3 in Verbindung mit Creb

A: hochreguliertes ACY3 im Netzwerk „Zellentwicklung, Zellwachstum und -proliferation, Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 2M (Cerebellum), im Netzwerk „Zellaufbau und -organisation, Zellentwicklung, Zellfunktion und -erhaltung“ aus dem Datensatz SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M und im Netzwerk „Zellmorphologie, Zellfunktion und -erhaltung, Entwicklung und Funktion des Nervensystems“ aus dem Datensatz SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M; hochreguliertes ACY3 wird vom inhibierten Creb (cAMP responsive element binding protein) mittels indirekter Inhibierung exprimiert

B: hochreguliertes ACY3 im Netzwerk „Entwicklungsstörung, Erbstörung und Stoffwechselerkrankung“ aus dem Datensatz SCA3 Maus Transgen 80Q Striatum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M ACY3; runterreguliertes Creb exprimiert durch eine indirekte Inhibierung das hochregulierte ACY3

rot: hochreguliert; grün: runterreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

3.2.2 Runterreguliertes CA9 in Verbindung mit runterreguliertem ATXN3 bei zweimonatigen SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen

Die Carbonsäureanhydrase 9, CA9, ist ein pH-regulierendes Transmembranprotein. Zur Aufrechterhaltung der intrazellulären pH-Homöostase katalysiert CA9 die reversible Hydratation von Kohlendioxid. CA9 ist in Tumoren der Brust, Lunge, Niere, Dickdarm/Rektum, Gebärmutterhals, Mundhöhle, Gallenblase und Leber überexprimiert (Hilvo et al., 2008). Mittels *Ingenuity Pathway Analysis* wurde das runterregulierte CA9 in den Netzwerken der Datensätzen SCA3 Patient Cerebellum, SCA3 Maus KI 2M (Cerebellum) und SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum) runterreguliert ermittelt (Tab. 3.3).

Tabelle 3.3: Alle signifikanten Expressionen von CA9 in der bioinformatischen Auswertung

| Datensatz | logFold Change | p-Wert | Netzwerk | Pathway |
|--------------------------------|----------------|--------------|--|---------|
| SCA3 Patient Cerebellum | 0,698 | $3,44e^{-2}$ | Entwicklungsstörung, Augenkrankheit, Organismenverletzung und Anomalien | |
| SCA3 Maus KI 12 M (Cerebellum) | -0,911 | $6,26e^{-6}$ | Krebs, Störungen des endokrinen Systems, Verletzungen und Anomalien von Organismen | |
| SCA3 Maus KI 2 M (Cerebellum) | -0,658 | $3,75e^{-4}$ | Zellmorphologie, Zellaufbau und -organisation, Gewebemorphologie | |

Die Abbildungen der Datensätze, bei denen SCA3 Knock In Mäuse mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) im Alter von 12 Monaten mit gleichaltrigen wildtypischen Tieren und das *post-mortem* Cerebellum von SCA3 PatientInnen mit dem von gesunden ProbandInnen verglichen wurden, sind im Anhang (Abb. 9.2, 9.1) zu finden. Der Datensatz der zweimonatigen SCA3 KI Mäuse, welche 304 Glutamine besitzen (Haas et al., 2022), wird im Folgenden hervorgehoben. Das runterregulierte CA9 wurde mit einem logFold Change von -0,658 und einem p-Wert von $3,75 e^{-4}$ im Netzwerk

Ergebnisse

„Zellmorphologie, Zellaufbau und -organisation, Gewebemorphologie“ erfasst. In Abbildung 3.3 ist vor allem zu erkennen, dass CA9 indirekt sich selbst inhibiert. Histon H3 steht, hier in der aus IPA gespeicherten Analyse, in einer nicht vorhersehbaren Verbindung zu ATXN3, allerdings konnten Evert et al., 2006 schon eine erhöhte Acetylierung des gesamten Histons H3 in erweiterten Ataxin3-exprimierenden Zellen finden, währenddessen normales ATXN3 mit einer erhöhten Deacetylierung von Histon H3 verbunden ist (Evert, Araujo, et al., 2006). Außerdem ist ATXN3 in SCA3 KI Mäusen im Alter von 2 Monaten in Bezug auf gleichaltrige Geschwistertiere runterreguliert und inhibiert sich selbst, wobei die Ergebnisse nicht mit dem Zustand des nachgeschalteten Moleküls übereinstimmen.

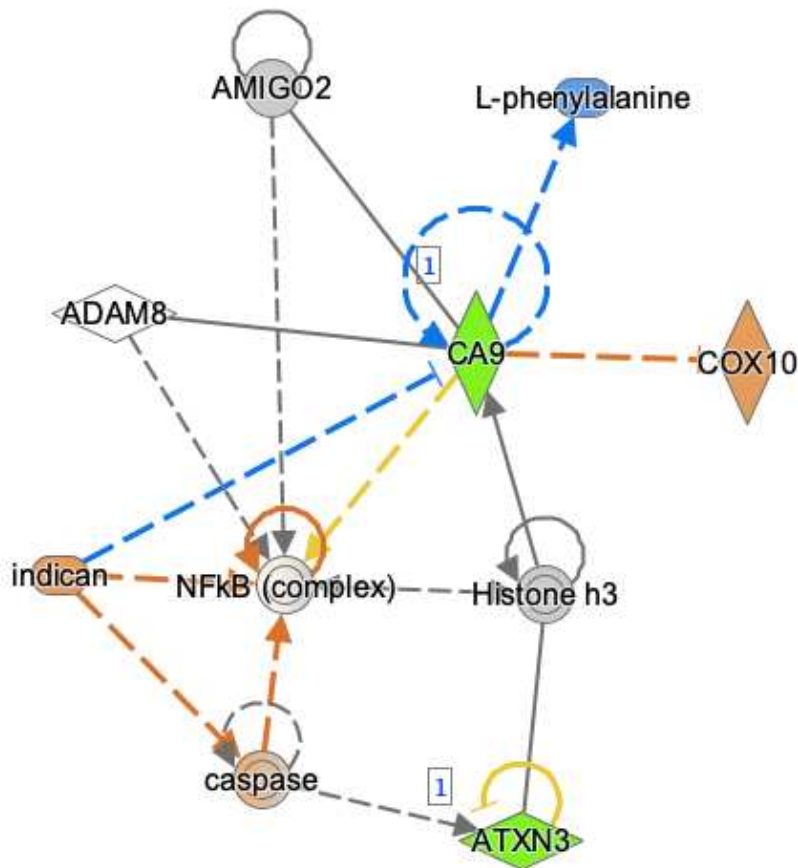


Abbildung 3.3: Runterreguliertes CA9 im indirekten Bezug zum runterregulierten ATXN3 im Netzwerk „Zellmorphologie, Zellaufbau und -organisation, Gewebemorphologie“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 2M (Cerebellum)

Runterreguliertes CA9 inhibiert sich indirekt selbst; CA9 drückt indirekt eine Inhibierung zum inhibierten L-Phenylalanin aus; CA9 wird durch die Expression von Indikan indirekt

Ergebnisse

*inhibiert; CA9 steht mit AMIGO2 (adhesion molecule with Ig like domain 2) und ADAM (ADAM metallopeptidase) in Interaktion, bei der die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist; NFkB (Komplex) - nuclear factor kappa B – wird durch CA9 indirekt aktiviert, doch stimmen die Ergebnisse nicht mit dem Zustand des nachgeschalteten Moleküls überein; CA9 drückt durch Inhibierung eine Aktivierung von COX10 (cytochrome c oxidase assembly factor heme A:farnesyltransferase COX10) aus; Histon H3 aktiviert CA9, aber auch hier ist die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar; Histon H3 selbst steht in einer Verbindung zu ATXN3, die nicht vorhersehbar ist; ATXN3 ist in SCA3 KI Mäusen im Alter von 2 Monaten in Bezug auf gleichaltrige Geschwistertiere runterreguliert und inhibiert sich selbst, wobei die Ergebnisse nicht mit dem Zustand des nachgeschalteten Moleküls übereinstimmen
grün: runterreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert*

3.2.3 Keine signifikanten Expressionen der Mitglieder der DNAJ-Familie (DNAJC13 und HDJ2) in der bioinformatischen Auswertung

Da ja bereits bekannt ist, dass die Mitglieder der DNAJ-Familie einen Einfluss auf die Pathogenese der SCA3 ausüben, sollte im Folgenden die Expression von DNAJC13 und HDJ2 in den zuvor beschriebenen und vorhandenen RNA-Sequenzierungsdaten analysiert werden. *DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13*, DNAJC13, gehört zu den Hitzeschockproteinen und ist eine Komponente des am endosomal-lysosomal-retrograden Wegs beteiligten Retromerkomplexes (Girard et al., 2005; Seaman & Freeman, 2014). In der Pathogenese von Parkinson wurden DNAJC13-Mutationen gefunden, somit gilt DNAJC13 als potenzielle Quelle für Risikovarianten und seltene kausale Mutationen (Appel-Cresswell et al., 2014; Gustavsson et al., 2015). Es ist deshalb zu nennen, dass DNAJC13 auch als PARK21 (*Parkinsons disease 21*) bekannt ist. Ebenso wie DNAJC13 gehört HDJ2, auch DNAJA1 (*DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1*) genannt, zur Hitzeschockprotein-Familie 40, welche an verschiedenen zellulären Aktivitäten beteiligt ist, beispielsweise der Proteinübersetzung, der Translokation und dem Abbau (Qiu et al., 2006). Die Daten von Parrales et al., 2016 legen dar, dass eine Runterregulation von HDJ2 den Kernexport, die Ubiquitylation und

den Abbau von falsch gefalteten mutp53 (Mutante des Tumor Proteins 53) induziert, jedoch eine Überexpression von HDJ2 den Abbau von mutp53 verhindert (Parrales et al., 2016). Es wurde der Einfluss auf die Pathogenese der SCA3 in unseren Datensätzen analysiert, jedoch wurde mit Methode der *Ingenuity Pathway Analysis* weder DNAJC13 noch HDJ2 in den Datensätzen der SCA3 KI und YAC84Q Mäuse sowie bei SCA3 PatientInnen und Kontrollpersonen mit relevanter hoch- oder runterregulierter Genexpression gefunden.

3.2.4 HSP105 und HSPA2 in gemeinsamen *Pathway* und HSPA2 in *Pathways* der Huntington-Krankheit exprimiert

HSP105 mit dem offiziellen vollen Namen *heat shock protein family H (Hsp110) member 1* wird auch HSPH1 genannt und ist ein Mitglied der Hsp70-Familie. HSP105 kann in Kooperation mit Hsp70 und Hsp40 Amyloid und vorgeformte Aggregate aufspalten (Shorter, 2011). Mit der webbasierten Software *Ingenuity Pathway Analysis* wurde HSP105 mit einem logFold Change von -0,387 und einem p-Wert von $2,82 \cdot 10^{-2}$ im Datensatz der SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen im Alter von zwölf Monaten (Haas et al., 2022) im *Pathway* „Aldosteron-Signalisierung in Eptihelzellen“ in Bezug zu Kontrolltieren mit runterregulierter Expression ermittelt. *Heat shock protein family A (Hsp70) member 2*, kurz HSPA2, ist das Mitglied der Hsp70-Gruppe von Hitzeschock-Proteinen, welche eine Rolle beim Chaperon-System als auch bei der Proteinfaltung eine Rolle spielen. Zudem deuten weitere Daten darauf hin, dass HSPA2 eine größere Beteiligung an vielen Zellprozessen hat, wie zum Beispiel die synaptische Übertragung, die Autophagie, die Zelltodsignalisierung und weiteren (Stetler et al., 2010). In Tabelle 3.4 sind alle ermittelten Netzwerke und *Pathways* von HSP105 und HSPA2 zu finden.

Ergebnisse

Tabelle 3.4: Alle signifikanten Expressionen von HSP105 und HSPA2 in der bioinformatischen Auswertung

| Gen | Datensatz | logFold Change | p-Wert | Netzwerk | Pathway |
|--------|-------------------------------------|----------------|--------------|---|---|
| HSP105 | SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum) | -0,387 | $2,82e^{-2}$ | | Aldosteron-Signalisierung in Eptihelzellen |
| HSPA2 | SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum) | 0,253 | $2,33e^{-2}$ | | Aldosteron-Signalisierung in Eptihelzellen; Signalisierung der Huntington-Krankheit; HIF1 α Signalisierung |
| HSPA2 | SCA3 Patient Cerebellum | -2,364 | $2,54e^{-4}$ | Organmorphologie, Entwicklung und Funktion des Skelett- und Muskelsystems, Gewebe-morphologie | Signalisierung der Huntington-Krankheit; BAG2-Signalweg |

Im Datensatz der zwölfmonatigen SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) wurde eine HSPA2-Expression mit einem logFold Change von 0,253 und einem p-Wert von $2,33 e^{-2}$ in den Pathways „Aldosteron-Signalisierung in Eptihelzellen“, „Signalisierung der Huntington-Krankheit“ und „HIF1 α Signalisierung“ mit Bezug auf gesunde Kontrollmäuse im gleichen Alter analysiert. Im Pathway „Aldosteron-Signalisierung in Eptihelzellen“ ist wie oben beschrieben auch HSP105 zu finden. In allen Pathways wurden HSPA2 als auch HSP105 als HSP bzw. Hsp70 gekennzeichnet. Außerdem wurde HSPA2 durch die bioinformatische Analyse runterreguliert mit einem logFold Change von -2,364 und einem p-Wert von $2,54 e^{-4}$ im

Ergebnisse

Netzwerk „Organmorphologie, Entwicklung und Funktion des Skelett- und Muskelsystems, Gewebemorphologie“ aus dem Datensatz mit den SCA3 PatientInnen mit dem untersuchten *post-mortem* Gewebe Cerebellum ermittelt und als Kontrollwert diente das Cerebellum gesunder Personen. Im Folgenden werden die *Pathways* „Signalisierung der Huntington-Krankheit“ und „BAG2-Signalweg“ näher betrachtet; die weiteren *Pathways* als auch das erwähnte Netzwerk sind im Anhang (Abb. 9.3, 9.5, 9.7, 9.8) zu finden. Im Pathway „Signalisierung der Huntington-Krankheit“ ist das signifikant exprimierte HSPA2 (als HSP70 zu erkennen) in den Datensätzen der SCA3 PatientInnen (Abb. 3.4A), bei denen *post-mortem* Cerebellum entwendet wurde, im Vergleich zu gesunden Kontrollen analysiert wurden mit -2,364 und ein p-Wert von $2,54 e^{-4}$ als auch in den SCA3 Knock In Mäuse im Alter von 12 Monaten (Abb. 3.4B), welche 304 Glutamine aufweisen (Haas et al., 2022), im Vergleich zu gleichaltrigen wildtypischen Tieren mit einem logFold Change von 0,253 und einem p-Wert von $2,33 e^{-2}$ in perinukleären Einschlüssen mit weiteren Proteinen zu finden. Vor allem sind hier Huntingtin (HTT), das Krankheitsprotein von Chorea-Huntington, und Ubiquitin zu nennen. Durch die Gegenüberstellungen (Abb. 3.4A und 3.4B) ist zu erkennen, dass sich die Funktion und Lokalisation von HSP70 bei der Signalisierung der Huntington-Krankheit zwischen SCA3 PatientInnen und zwölfmonatigen SCA3 KI Mäusen gleicht. Die komplette Darstellung der *Pathways* sind im Anhang (Abb. 9.6, 9.4) hinterlegt.

A

B

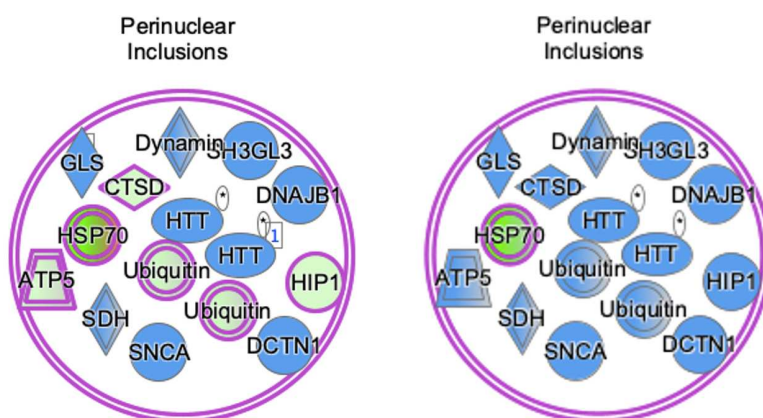


Abbildung 3.4: In perinukleären Einschlüssen runterreguliertes HSPA2 mit Huntingtin im Pathway „Signalisierung der Huntington-Krankheit“

Ergebnisse

A: runterreguliertes HSPA2 (als HSP70 zu erkennen) im Pathway „Signalisierung der Huntington-Krankheit“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum; Ubiquitin, ATP5 (ATP synthase subunit 5), HIP1 (huntingtin interacting protein 1) und CTSD (cathepsin D) ebenfalls runterreguliert; HTT (Huntingtin), Dynamin, SH3GL3 (SH3 domain containing GRB2 like 3, endophilin A3), DNAJB1 (DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1), DCTN1 (dynactin subunit 1), SNCA (synuclein alpha), SDH (serine dehydratase), GLS (glutaminase) sind alle inhibiert

B: runterreguliertes HSPA2 (als HSP70 zu erkennen) im Pathway „Signalisierung der Huntington-Krankheit“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum); alle weiteren Proteine sind inhibiert, dazu gehören Ubiquitin, HTT (Huntingtin), Dynamin, SH3GL3 (SH3 domain containing GRB2 like 3, endophilin A3), DNAJB1 (DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1), HIP1 (huntingtin interacting protein 1), DCTN1 (dynactin subunit 1), SNCA (synuclein alpha), SDH (serine dehydratase), ATP5 (ATP synthase subunit 5), CTSD (cathepsin D), GLS (glutaminase)

In einem weiteren *Pathway* ist HSPA2 signifikant mit einem logFold Change von -2,364 und einem p-Wert von $2,54 \cdot 10^{-4}$ runterreguliert und steht in Bezug zu den neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Spinozerebelläre Ataxie Typ 3. Es handelt sich hier um den *Pathway* „BAG2-Signalweg“ aus dem Datensatz der PatientInnen mit SCA3 Erkrankung in Bezug zu KontrollprobandInnen (Abb. 3. 5). Der Komplex mit HSPA2 (hier als HSP70 dargestellt), HSPA8 (heat shock protein family A (Hsp70) member 8), STUB1 (STIP1 homology and U-box containing protein 1) und BAG2 (BAG cochaperone 2) steht in Verbindung mit weiteren Proteinen, welche die genannten neurodegenerativen Erkrankungen auslösen. Im Fall von SCA3 wird durch die Aktivierung von ATXN3, welches pathogene Polyglutamin-Wiederholungen enthält, die Erkrankung ausgelöst.

Ergebnisse

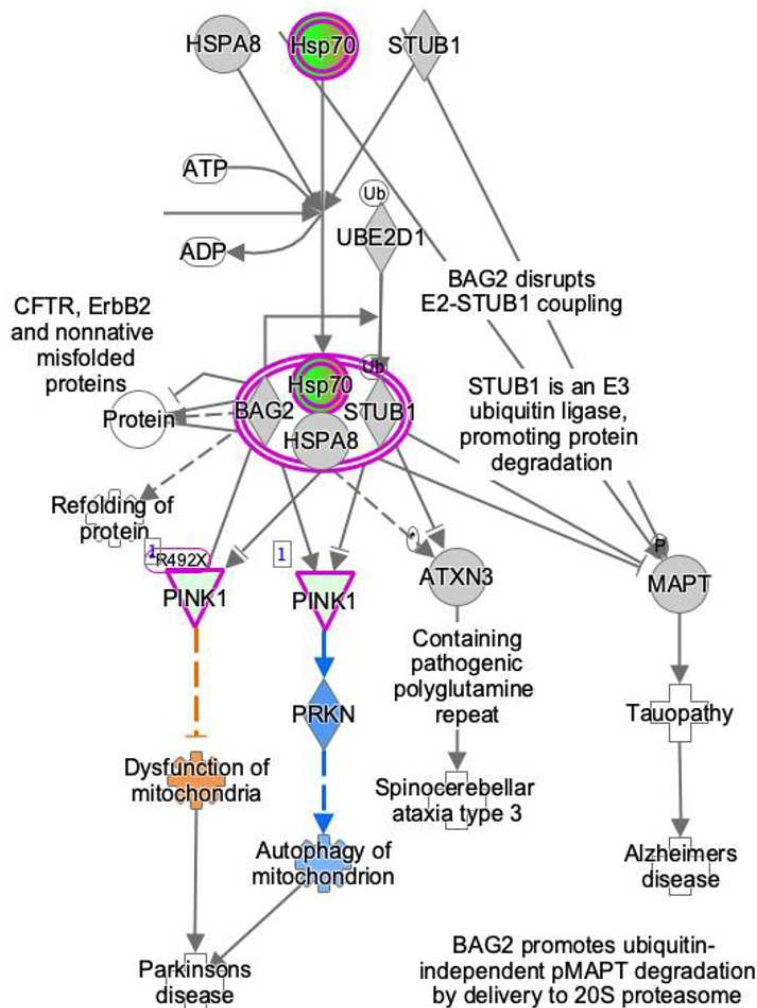


Abbildung 3.5: Runterreguliertes HSPA2 in Verbindung stehend mit den neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und SCA 3 im Pathway „BAG2-Signalweg“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum

Runterreguliertes HSPA2, als HSP70 in der Abbildung zu finden, ist im Komplex mit HSPA8 (heat shock protein family A (Hsp70) member 8), BAG2 (BAG cochaperone 2) und STUB1 (STI1 homology and U-box containing protein 1); dieser Komplex steht in Verbindung mit ATXN3, welches pathogene Polyglutamin-Wiederholungen enthält; der Komplex mit HSPA2 inhibiert MAPT (microtubule associated protein tau), das wiederum Tauopathie auslöst, wodurch es zur Alzheimer Erkrankung kommt; der HSPA2-Komplex steht in Interaktion mit PINK1 (PTEN induced kinase 1), das auf zwei Wege zur Morbus Parkinson führt; erstens wird über eine indirekte Inhibition die Funktionsstörung der Mitochondrien aktiviert; zweitens wird mittels Expression von PINK1 auf PRKN (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase) dieses inhibiert, was die Autophagie der Mitochondrien inhibiert

grün: runterreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

3.2.5 HSP27 signifikant exprimiert in IPA

HSP27, ferner HSPB1 genannt, trägt den vollen Namen *heat shock protein family B (small) member 1*. Es ist bekannt, dass HSP27 in verschiedenen Zelltypen und Geweben in bestimmten Stadien der Entwicklung und Differenzierung exprimiert (Garrido, 2002). Zudem steigert die Expression von HSP27 das Überleben von Säugetierzellen, welche vielen zytotoxischen Wirkstoffen (z.B. Hitzeschock, oxidativer Stress) ausgesetzt sind (Landry et al., 1989). HSP27 wurde durch die Software *Ingenuity Pathway Analysis* als HSPB1 in folgenden Datensätzen ausgemacht: Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild, Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch, SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum) (Tab. 3.5). Die Abbildungen der Sequenzierungs-Datensätze Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild und Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch sind im Anhang (Abb. 9.9, 9.10) zu finden.

Tabelle 3.5: Alle signifikanten Expressionen von HSP27 in der bioinformatischen Auswertung

| Datensatz | LogFold Change | p-Wert | Netzwerk | Pathway |
|--|----------------|------------------|--|---------|
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild | 0,289 | 1,14 e^{-2} | Zell-Kompromittierung, Zellentwicklung, Zellwachstum und -proliferation | |
| Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch | -0,346 | 2,81 e^{-2} | Zellvermittelte Immunantwort, Zellentwicklung, Zellfunktion und -erhaltung | |
| SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum) | -1,116 | 8,54 e^{-5} | Zellfunktion und -erhaltung, Entwicklung und Funktion hämatologischer Systeme, Proteinsynthese | |

Im Datensatz der SCA3 Knock In Maus mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) wurde HSPB1 in zwölf Monate alten Mäuse im Netzwerk „Zellfunktion und -erhaltung, Entwicklung und Funktion hämatologischer Systeme, Proteinsynthese“ mit einem

Ergebnisse

logFold Change von -1,116 und ein p-Wert von $8,54 e^{-5}$ runterreguliert in SCA3 Mäusen in Bezug zu Kontrolltieren gefunden. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen, aktiviert sich HSPB1 selbst, wobei die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist. Das gleiche gilt für die Verbindung von HSPB1 zum runterregulierten NPHP4 (*nephrocystin 4*) und hochregulierten TGFB1I1 (*transforming growth factor beta 1 induced transcript 1*). Zudem wird HSPB1 jeweils vom runterregulierten AGT (*angiotensinogen*) und vom runterregulierten KLF4 (*KLF transcription factor 4*) durch eine Expression indirekt inhibiert. HSPB1 selbst aktiviert mittels indirekter Inhibierung Caspase.

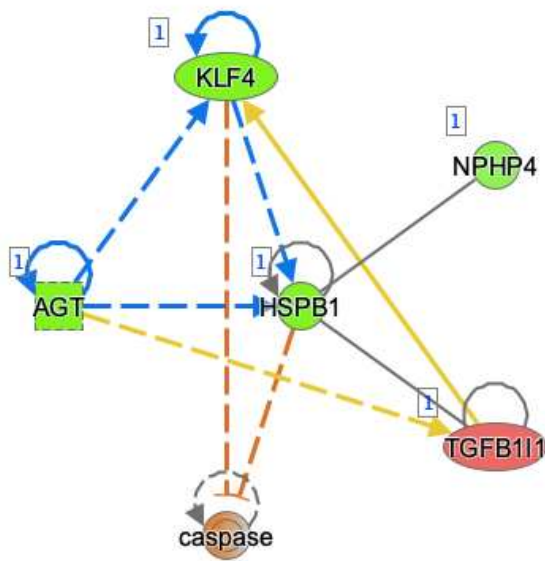


Abbildung 3.6: Runterreguliertes HSPB1 im Netzwerk „Zellfunktion und -erhaltung, Entwicklung und Funktion hämatologischer Systeme, Proteinsynthese“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum)

Runterreguliertes HSPB1, welches sich selbst aktiviert, hat eine Verbindung zum runterregulierten NPHP4 (*nephrocystin 4*) und hochregulierten TGFB1I1 (*transforming growth factor beta 1 induced transcript 1*), wobei keine Vorhersage über die Wirkung der Interaktion möglich ist; jeweils vom runterregulierten AGT (*angiotensinogen*) und vom runterregulierten KLF4 (*KLF transcription factor 4*) wird HSPB1 durch eine Expression indirekt inhibiert; aufgrund einer indirekten Inhibierung durch HSPB1 wird Caspase aktiviert
rot: hochreguliert; grün: runterreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

3.2.6 Runterreguliertes LTBP4 in IPA-Datensätzen

Das Protein LTBP4 (*latent transforming growth factor beta binding protein 4*) bindet TGF β und sequestriert dieses in der extrazellulären Matrix, um seine Verfügbarkeit für den TGF β -Rezeptor zu modulieren (Su & Urban, 2021). In Tabelle 3.6 sind alle Datensätze mit Netzwerken, in denen LTBP4 signifikant exprimiert ist, aufgelistet.

Tabelle 3.6: alle signifikanten Expressionen von LTBP4 in der bioinformatischen Auswertung

| Datensatz | LogFold Change | p-Wert | Netzwerk | Pathway |
|---|----------------|---------------|---|---------|
| SCA3 Patient Cerebellum | -0,45 | 4,18 e^{-1} | Krebs, Magen-Darm-Erkrankungen, Organismenverletzungen und Anomalien | |
| SCA3 Maus Transgen 84Q präfrontaler Cortex Wildtyp 2M vs. Transgen 2M | -0,533 | 1,12 e^{-4} | Störungen des endokrinen Systems, Magen-Darm-Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen | |

Im Folgenden wird der Datensatz mit den untersuchten SCA3 PatientInnen, welche *post-mortem* Cerebellum der Forschung gaben, näher betrachtet. Der andere Datensatz ist dem Anhang (Abb. 9.11) zu entnehmen. LTBP4 wurde im Netzwerk „Krebs, Magen-Darm-Erkrankungen, Organismenverletzungen und Anomalien“ mit einem logFold Change von -0,45 und einem p-Wert von $4,51 e^{-2}$ mit einem Bezug auf gesunde Kontrollprobanden mit runterregulierter Genexpression ermittelt (Abb. 3.7). Durch das runterregulierte LTBP4 wird eine Inhibierung auf *Ltb* (*latent transforming growth factor beta binding*), welches runterreguliert ist, erwirkt. LTBP4 steht in Interaktion zum runterregulierten LTBP2 (*latent transforming growth factor beta binding protein 2*), runterregulierten FBLN5 (*fibulin 5*) und hochregulierten VWCE (*von Willebrand factor C and EGF domains*), wobei die Wirkung nicht vorhersehbar ist.

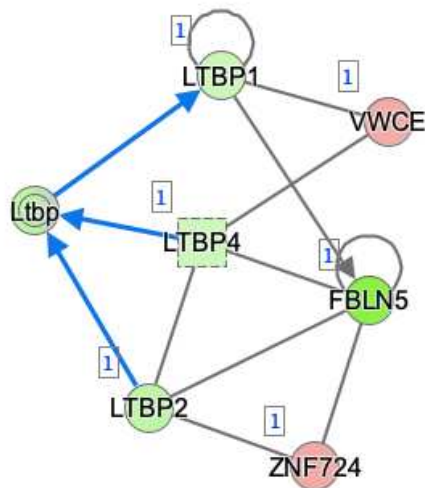


Abbildung 3.7: *LTBP4* im Netzwerk „Krebs, Magen-Darm-Erkrankungen, Organismenverletzungen und Anomalien“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum

Das runterregulierte *LTBP4* exprimiert eine Inhibierung auf das runterregulierte *Ltb* (latent transforming growth factor beta binding); durch *Ltb* wird eine Inhibierung auf *LTBP1* (latent transforming growth factor beta binding protein 1) erwirkt; *LTBP4* interagiert mit dem runterregulierten *LTBP2* (latent transforming growth factor beta binding protein 2), dem runterregulierten *FBLN5* (fibulin 5) und dem hochregulierten *VWCE* (von Willebrand factor C and EGF domains), wobei die Wirkung nicht vorhersehbar ist; *VWCE* steht in unvorhersehbarer Verbindung mit *LTBP1*; *FBLN5* interagiert mit *LTBP2* und *LTBP1* mit *FBLN5*; bei beiden Verbindungen ist keine Vorhersage der Wirkung des Mechanismus möglich; *LTBP2* löst auf *Ltb* durch Expression eine Inhibierung aus; *LTBP2* und *FBLN5* stehen jeweils in nicht-vorhersehbarer Verbindung mit dem hochregulierten *ZNF724* (zinc finger protein 724)
 rot: hochreguliert; grün: runterreguliert; blau: inhibiert

3.2.7 OTOF in vielen Netzwerken von IPA signifikant exprimiert

OTOF (Otoferlin), welches bei der Membranfusion und in endozytischen, sekretorischen und lysosomalen Wegen mitwirkt (Roux et al., 2006), weist eine erhöhte Genexpression vor allem im Innenohr und Gehirn auf (Schug et al., 2006). Das Protein OTOF wurde durch die bioinformatische Analyse in folgenden Datensätzen mit signifikanten logFold Change und p-Werten ermittelt: Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild, Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild Frauen, Blut ESMI Baseline

Ergebnisse

präataktisch vs. mild Männer, Blut ESMI Baseline Kontrolle vs. Mutationsträger, SCA3 Maus Transgen 80Q Cerebellum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M, SCA3 Maus Transgen 80Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M (Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Alle signifikanten Expressionen von LTBP4 in der bioinformatischen Auswertung

| Datensatz | LogFold Change | p-Wert | Netzwerk | Pathway |
|--|-----------------------|------------------|--|----------------|
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild | 2,556 | 2,42 e^{-8} | Zellmorphologie, Infektionskrankheiten, Organismenschäden und Anomalien | |
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild weiblich | 1,61 | 3,47 e^{-3} | Erbkrankheiten, Stoffwechselkrankheiten, Organismenschäden und Anomalien | |
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild männlich | 2,596 | 4,39 e^{-4} | Hörkrankheit, immunologische Krankheit, Organismenverletzung und Anomalien | |
| Blut ESMI Baseline Kontrolle vs. Mutationsträger | 1.563 | 1,03 e^{-4} | Entzündliche Erkrankung, Entzündungsreaktion, Organismenverletzung und Anomalien | |
| Blut ESMI Baseline alle | 1,5 | 1,28 e^{-4} | Zellmorphologie, Embryonalentwicklung, Haar- und Hautentwicklung und -funktion | |
| SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M | 0,439 | 2,07 e^{-2} | Zellwachstum und -proliferation, Entwicklung und Funktion des Fortpflanzungssystems, Gewebeentwicklung | |

Ergebnisse

| | | | | |
|--|--------|------------------|---|--|
| SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M | -0,383 | 2,18 e^{-2} | Störungen des endokrinen Systems, Verletzungen und Anomalien von Organismen, Erkrankungen des Fortpflanzungssystems | |
|--|--------|------------------|---|--|

Im Datensatz der SCA3 Patientinnen, welche in der ersten Untersuchung des ESMI Projektes Blut abgaben, wurde OTOF bei den präataktischen weiblichen SCA3 Patientinnen mit einem logFold Change von 1,61 und ein p-Wert von $3,47 e^{-3}$ im Netzwerk „Erbkrankheiten, Stoffwechselkrankheiten, Organismenschäden und Anomalien“ in Bezug auf Frauen mit milder Spinozerebellärer Ataxie Typ 3 hochreguliert analysiert. Wie in Abbildung 3.8A dargestellt, aktiviert sich das hochregulierte OTOF indirekt selbst, wobei die Wirkung nicht vorhersehbar ist. Zudem steht OTOF jeweils zum Adaptor Protein 2 und zum hochreguliertem MYO6 (*myosin VI*) in Verbindung.

Zudem wurde im Datensatz der untersuchten SCA3 Maus, welche das humane ATXN3 mit 84Q und allen regulatorischen Elementen und dem endogenen Promotor (YAC84Q, (Cemal et al., 2002)) enthielt, OTOF in zwölfmonatigen SCA3 Tieren in der Region des Cerebellums – Ort der Hauptpathogenese – im Netzwerk „Zellwachstum und Zellproliferation, Entwicklung und Funktion des Fortpflanzungssystems, Gewebeentwicklung“ mit einem logFold Change von 0,439 und einem p-Wert von $2,07 e^{-2}$ in Bezug zu gleichaltrigen wildtypischen Mäuse hochreguliert analysiert (Abb. 3.8B). Das hochregulierte OTOF aktiviert sich indirekt selbst, wobei die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist. Genau das gleiche gilt für die Interaktion von OTOF zum aktivierten Coch (*cochlin*) und OTOF zum inhibierten SLC4A4 (*solute carrier family 4 member 4*). Außerdem wird OTOF vom aktivierten beta-Estradiol indirekt aktiviert.

Die Abbildungen der weiteren Netzwerke, bei welchen OTOF signifikant hoch- oder runterreguliert ist, sind im Anhang zu finden (Abb. 9.12 – 9.16).

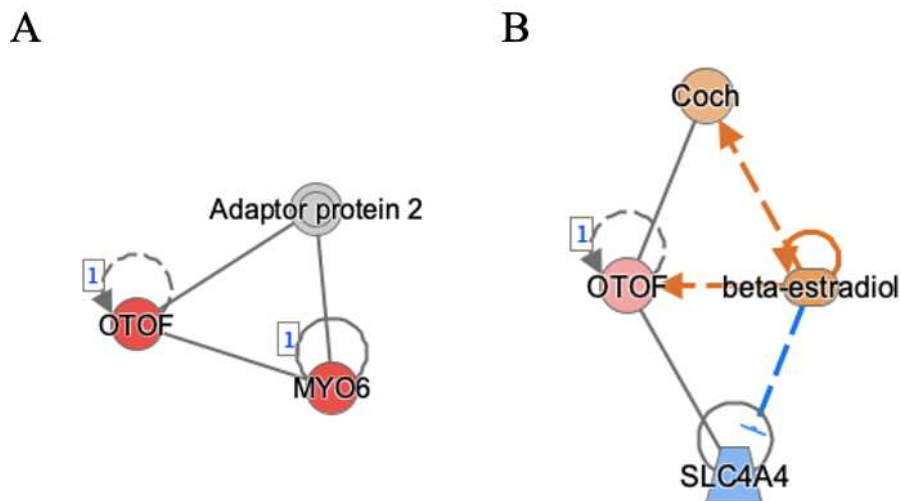


Abbildung 3.8: Hochreguliertes OTOF in Netzwerken von IPA

A: OTOF im Netzwerk „Erbkrankheiten, Stoffwechselkrankheiten, Organismenschäden und Anomalien“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild Frauen; hochreguliertes OTOF aktiviert sich indirekt selbst, aber die Wirkung des Mechanismus ist nicht vorhersehbar; OTOF interagiert jeweils mit dem Adaptor Protein 2 und mit dem hochregulierten MYO6 (myosin VI)

B: OTOF im Netzwerk „Zellwachstum und -proliferation, Entwicklung und Funktion des Fortpflanzungssystems, Gewebeentwicklung“ aus dem Datensatz SCA3 Maus Transgen 80Q Cerebellum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M; hochreguliertes OTOF aktiviert sich indirekt selbst, wobei die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist; OTOF steht in unvorhersehbarer Verbindung zum aktivierten Coch (cochlin) und zum inhibierten SLC4A4 (solute carrier family 4 member 4); vom aktivierten beta-Estradiol wird OTOF indirekt aktiviert.

rot: hochreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

3.2.8 SAFB2 und SFT2D2 in Netzwerken mit Zell-Bezug hochreguliert und SFSWAP ohne signifikante Expressionen in *Ingenuity Pathway Analysis*

Splicing factor SWAP, SFSWAP, wird zu einer Proteinfamilie gezählt, die die RNA-Verarbeitung, das Spleißen und die Transkript-Verlängerung mitreguliert. SFSWAP gilt als RS-Domäne enthaltendes – SR-ähnliches – Protein (Twyffels et al., 2011) und konnte mittels der webbasierten Software *Ingenuity Pathway Analysis* nicht mit signifikanten Expressionen in den Datensätzen der SCA3 KI- und YAC84Q Mäuse und SCA3

Ergebnisse

PatientInnen in Verbindung gebracht werden. SAFB2 (*scaffold attachment factor B2*) gehört zu SAFB-Familie, welche aus DNA-RNA-bindenden Proteinen zusammengesetzt ist. Diese Proteine regulieren mit an der Transkription und mRNA-Verarbeitung, zellulären Reaktion auf Stress und DNA-Reparatur (Norman et al., 2016). SFT2D2 (*SFT2 domain containing 2*) gilt als Vesikeltransporter von Multipassmembranen und weist erhöhte Expressionen in humanen Gehirnregionen auf. SFT2D2 wird vor allem in immunbezogenen Zellen, wie den Mikroglia im Zentralen Nervensystem (ZNS) und dendritischen Zellen im Peripheren Nervensystem (PNS) exprimiert (Liu et al., 2022). Im Folgenden werden die ermittelten Netzwerke mit SAFB2 und SFT2D2 näher betrachtet (Tab. 3.8).

Tabelle 3.8: Alle signifikanten Expressionen von SAFB2 und SFT2D2 in der bioinformatischen Auswertung

| Gen | Datensatz | LogFold Change | p-Wert | Netzwerk | Pathway |
|--------|---|----------------|-------------------|---|---------|
| SAFB2 | SCA3 Patient Cerebellum | 0,572 | 1,37 e^{-2} | Zelluläre Entwicklung, Embryonalentwicklung, Organismische Entwicklung | |
| SFT2D2 | SCA3 Maus Transgen 84Q präfrontaler Cortex Transgen 2M vs. Transgen 12M | 1,007 | 2,59 e^{-12} | Zellaufbau und - organisation, Zellfunktion und -erhaltung, Erbkrankheit | |

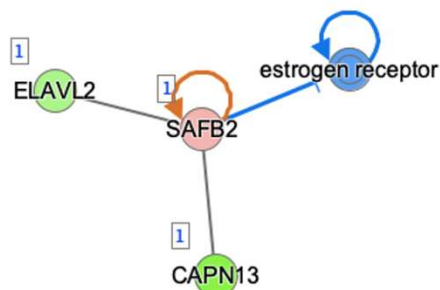
Mittels bioinformatischer Analyse wurde im Datensatz der SCA3 PatientInnen, bei welchen das Cerebellum *post-mortem* untersucht wurde, im Netzwerk „Zelluläre Entwicklung, Embryonalentwicklung, Organismische Entwicklung“ SAFB2 mit einem logFold Change von 0,572 und eine p-Wert von $1,37 e^{-2}$ in Bezug auf Kontrollpersonen eine Hochregulation ermittelt. Das hochregulierte SAFB2, welches sich selbst aktiviert, interagiert mit dem runterregulierten CAPN13 (*calpain 13*) und dem runterreguliertem ELAVL2 (*ELAV like RNA binding protein 2*), wobei die Wirkung nicht vorhersehbar ist.

Ergebnisse

Durch die Expression von SAFB2 entsteht eine Inhibierung auf den Östrogen Rezeptor, der sich selbst inhibiert (Abb. 3.9A).

Im Datensatz der untersuchten SCA3 Maus, welche das humane ATXN3 mit 84Q und allen regulatorischen Elementen und dem endogenen Promotor (YAC84Q, (Cemal et al., 2002)) enthielt, wurde SFT2D2 in zwei Monate alten SCA3 Tieren im Netzwerk „Zellaufbau und -organisation, Zellfunktion und -erhaltung, Erbkrankheit“ mit einem logFold Change von 1,007 und p-Wert von $2,59 e^{-12}$ in Bezug auf zwölfmonatige transgene 84Q SCA3 Mäuse hochreguliert analysiert. Wie in Abbildung 3.9B zu erkennen steht SFT2D2 in Interaktion mit dem runterreguliertem REEP4 (*receptor accessory protein 4*), welches mit dem ebenfalls runterregulierten TMEM51 (*transmembrane protein 51*) interagiert. Auch SFT2D2 steht in Korrelation zu TMEM51. Zudem gibt es eine Interaktion zwischen SFT2D2 und runterreguliertem PBX3 (*PBX homeobox 3*), welches sich selbst inhibiert. Doch bei allen abgebildeten Interaktionen ist die jeweilige Wirkung nicht vorhersehbar.

A



B

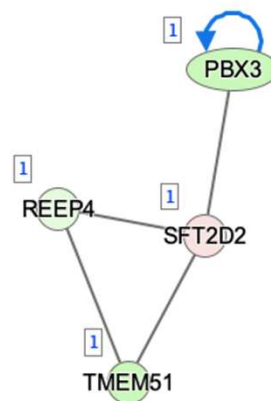


Abbildung 3.9: Hochregulierte Gene SAFB2 und SFT2D2 in Netzwerken von IPA

A: hochreguliertes SAFB2 im Netzwerk „Zelluläre Entwicklung, Embryonalentwicklung, Organismische Entwicklung“ aus dem Datensatz SA3 Patient Cerebellum; hochreguliertes SAFB2 aktiviert sich selbst; SAB2 inhibiert den inhibierten Östrogen Rezeptor; runterreguliertes CAPN13 (*calpain 13*) und runterreguliertes ELAVL2 (*ELAV like RNA binding protein 2*) stehen jeweils in Verbindung zu SAFB2, wobei hier keine Vorhersage über die Wirkung möglich ist

B: SFT2D2 im Netzwerk „Zellaufbau und -organisation, Zellfunktion und -erhaltung, Erbkrankheit“ aus dem Datensatz SCA3 Maus Transgen 80Q präfrontaler Cortex Transgen 2M vs. Transgen 12M; hochreguliertes SFT2D2 interagiert jeweils mit dem runterregulierten

PBX3(*PBX homeobox 3*), dem runterregulierten *REEP4* (*receptor accessory protein 4*) und dem runterregulierten *TMEM51* (*transmembrane protein 51*)

rot: hochreguliert; grün: runterreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

3.2.9 **SUSD1** signifikant exprimiert in Sequenzierungsdatensätzen von ESMI-ProbandInnen

SUSD1 (*sushi domain containing 1*) wird durch DNA-Methylierung gesteuert und ist sowohl für die Entwicklung einer epigenetischen Signatur erforderlich als auch bei venösen Thromboembolien beteiligt (Tang et al., 2013). In folgenden Datensätzen wurde *SUSD1* entweder mit hoch- oder runterregulierter Genexpression gefunden: SCA3 Patient Cerebellum, Blut ESMI Baseline präataktisch vs. Kontrolle, Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild, SCA3 Maus Transgen 80Q Cerebellum Wildtyp 2M und Transgen 2M und Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch (Tab. 3.9). Im Folgenden werden drei Netzwerke genauer betrachtet; die restlichen Netzwerke inklusive Abbildungen sind im Anhang (Abb. 9.17, 9.18) zu finden.

Tabelle 3.9: Alle signifikanten Expressionen von *SUSD1* in der bioinformatischen Auswertung

| Datensatz | LogFold Change | p-Wert | Netzwerk | Pathway |
|--|----------------|---------------|--|---------|
| SCA3 Patient Cerebellum | -1,199 | 3,47 e^{-3} | Arzneimittelstoffwechsel, Energieproduktion, posttranslationale Modifikation | |
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild | 0,27 | 3,47 e^{-5} | Zellfunktion und -erhaltung, Lipidstoffwechsel, Biochemie kleiner Moleküle | |
| Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch | 0,324 | 2,21 e^{-4} | Krebs, Hämatologische Erkrankung, Immunologische Erkrankung | |

Ergebnisse

| | | | |
|---|--------|------------------|---|
| Blut ESMI Baseline präataktisch vs. Kontrolle | -0,297 | 6,20 e^{-5} | Hämatologische Erkrankungen, Infektionskrankheiten, Orga- nismenschäden und Anomalien |
| SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M | 0,32 | 3,32 e^{-1} | Kohlenhydratstoffwechsel, molekularer Transport, posttranslationale Modifikation |

Im Datensatz der SCA3 PatientInnen mit untersuchtem *post-mortem* Cerebellum wurde SUSD1 mit einem logFold Change von -1,199 und einem p-Wert von $3,47 e^{-2}$ im Netzwerk „Arzneimittelstoffwechsel, Energieproduktion, posttranslationale Modifikation“ in Bezug zu gesunden PatientInnen runterreguliert ermittelt. Wie in Abb. 3.10A beschrieben, interagiert das runterregulierte SUSD1 mit dem runterregulierten PTPRK (*protein tyrosine phosphatase receptor type K*), wobei die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist. Zudem wurde im Datensatz der SCA3 präataktischen PatientInnen aus der Baseline-Sitzung des ESMI Projektes SUSD1 im Netzwerk „Zellfunktion und -erhaltung, Lipidstoffwechsel, Biochemie kleiner Moleküle“ mit einem logFold Change von 0,27 und ein p-Wert von $3,47 e^{-5}$ in Bezug zu SCA3 PatientInnen mit milder Form hochreguliert ermittelt. Die hochregulierten Proteine TFAFA2 (TFAFA chemokine like family member 2) und CD1A (*CD1a molecule*) interagieren jeweils mit dem hochregulierten SUSD1, aber auch hier ist eine Vorhersage der Wirkung nicht möglich (Abb. 3.10B). Auch im Datensatz der schwer erkrankten SCA3 PatientInnen, welche Blut bei der ersten Untersuchung des ESMI-Projektes abgaben, wurde SUSD1 im Netzwerk „Krebs, Hämatologische Erkrankung, Immunologische Erkrankung“ mit einem logFold Change von 0,324 und ein p-Wert von $2,21 e^{-4}$ in Bezug auf präataktische SCA3 PatientInnen mit hochregulierter Genexpression analysiert (Abb. 3.10C). Die hochregulierten Proteine CD1A (*CD1a molecule*), welche schon in den vergleichenden Datensätzen der präataktischen und milden SCA3 PatientInnen als auch präataktischen SCA3 PatientInnen und Kontrollpersonen vorhanden waren, standen in Verbindung mit SUSD1.

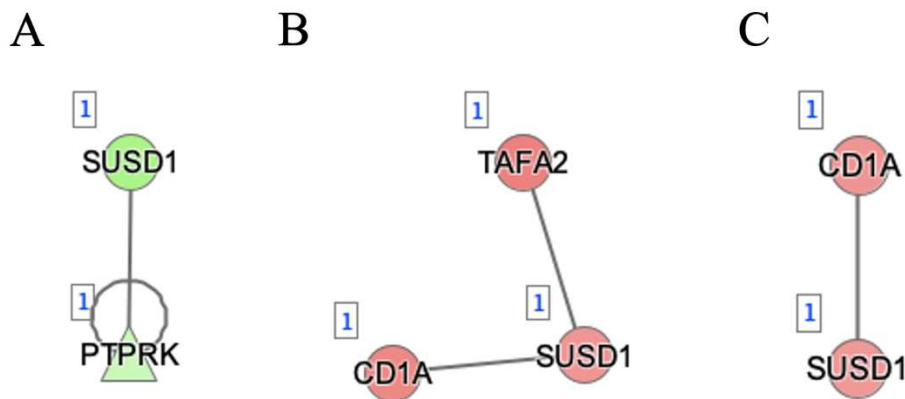


Abbildung 3.10: Runter- und hochreguliertes SUSD1 in Netzwerken von IPA

A: SUSD1 im Netzwerk „Arzneimittelstoffwechsel, Energieproduktion, posttranslationale Modifikation“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum; runterreguliertes SUSD1 interagiert mit dem runterreguliertem PTPRK (protein tyrosine phosphatase receptor type K), wobei die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist

B: SUSD1 im Netzwerk „Zellfunktion und -erhaltung, Lipidstoffwechsel, Biochemie kleiner Moleküle“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild; hochregulierte Proteine TFA2 (TFA chemokine like family member 2) und CD1A (CD1a molecule) interagieren jeweils mit dem hochregulierten SUSD1, aber eine Vorhersage der Wirkung ist nicht möglich

C: SUSD1 im Netzwerk „Krebs, Hämatologische Erkrankung, Immunologische Erkrankung“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch; hochreguliertes SUSD1 steht in Verbindung mit hochreguliertem CD1A (CD1a molecule), wobei die Verbindung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist

3.3 Teil B: qPCR mit RNA von SCA3 PatientInnen und Kontrollpersonen

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) handelt es sich um eine Polymerase-Kettenreaktion, die während des ganzen Vorgangs überwacht und die Daten mittels der Software *Light Cycler® 480 SW 1.5.1* erfasst werden. Dabei wird die interkalierende Fluoreszenz gemessen, welche mit der Menge an PCR-Produkten gleichzusetzen ist. Die Menge der Transkripte in der Probe werden mittels Standardreihe evaluiert und der Zeitpunkt, bei welchem zum ersten Mal ein spezifisches Produkt über dem Hintergrundsignal entsteht, nennt sich deltaCp-Wert. Da RNA als Template nicht

verwendet werden kann, müssen die vorliegenden RNA-Proben mittels Reverse Transkription (RT) in cDNA vor der qPCR umgewandelt werden. Dies kann anhand des *Two-* oder *One-Step* Verfahrens durchgeführt werden. Bei der zweistufigen Methode wird die umgekehrte Transkription zur Synthese von cDNA zuerst unabhängig von der qPCR durchgeführt, später kann die cDNA mit einem qPCR-Mastermix für die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt werden und die qPCR kann im *Light Cycler® 480 II Real Time PCR System* ablaufen. Im Ein-Schritt-Workflow wird die RNA mit dem *One-Step* Mastermix in ein Reaktionsgefäß gegeben, wodurch die cDNA-Synthese während der qPCR abläuft. Die Vorteile des einstufigen Verfahrens, welches häufig bei einer großen Anzahl von Proben verwendet wird, sind die Zeitersparnis und die geringere Pipettier- Ungenauigkeit, da weniger Pipettier-Schritte benötigt werden. Bevor Ergebnisse mit der ESMI-Kohorte erzielt werden konnten, mussten mittels *Two-Step* Verfahren die Versuchsbedingungen für die ausgewählten Primer etabliert, optimiert und vorbereitet werden. Zuerst wurden die Bedingungen für die Standardreihen, dann für die Annealing-Temperatur und anschließend für die Konzentration der Proben festgelegt. Daraufhin wurden die Primer etabliert und die Ergebnisse der Etablierung festgehalten. Nach der Etablierung im *Two-Step* Verfahren wurden die etablierten Primer im *One-Step* Verfahren eingesetzt, auch hier erfolgte eine Festlegung der Standardreihe, der Annealing-Temperatur, der Konzentration der Proben und der Primer. Danach konnten quantitative Echtzeit-PCRs mit der ESMI-Kohorte durchgeführt werden (Abb. 3.11). Die Entscheidung, welche Versuchsgruppen anschließend in der ESMI-Kohorte analysiert werden sollten, wurde aufgrund der Ergebnisse aus der IPA-Analyse gefällt. Bei den ausgewählten Primern für die qPCR handelt es sich um OTOF, SFT2D2 und SUSD1. Im folgenden Kapitel wird zuerst das *Two-Step* Verfahren und dann das *One-Step* Verfahren beschrieben.

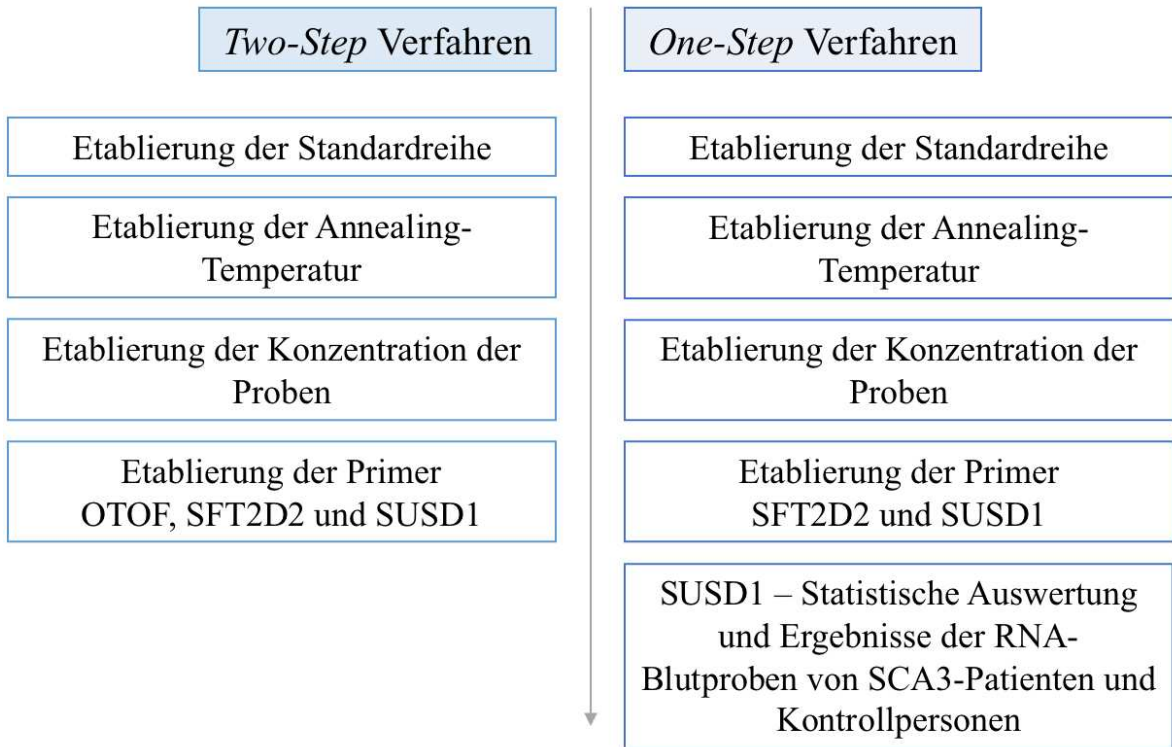


Abbildung 3.11: Flussdiagramm zum Ablauf der Etablierung des Two-Step und One-Step Verfahrens (erstellt in Microsoft PowerPoint)

3.3.1 Two-Step Verfahren

Für das Two-Step Verfahren wurde das *QuantiTect SYBR® Green RT-PCR Kit* (Qiagen, Anleitung vom 03/2016) verwendet, welches im Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen als Standardverfahren benutzt wurde. Der *SYBR® Green* Farbstoff bindet hochspezifisch an doppelsträngige DNA und reichert sich während der qPCR von Zyklus zu Zyklus an, wodurch das PCR-Produkt in Echtzeit nachgewiesen werden kann.

3.3.1.1 Etablierung der Standardreihe

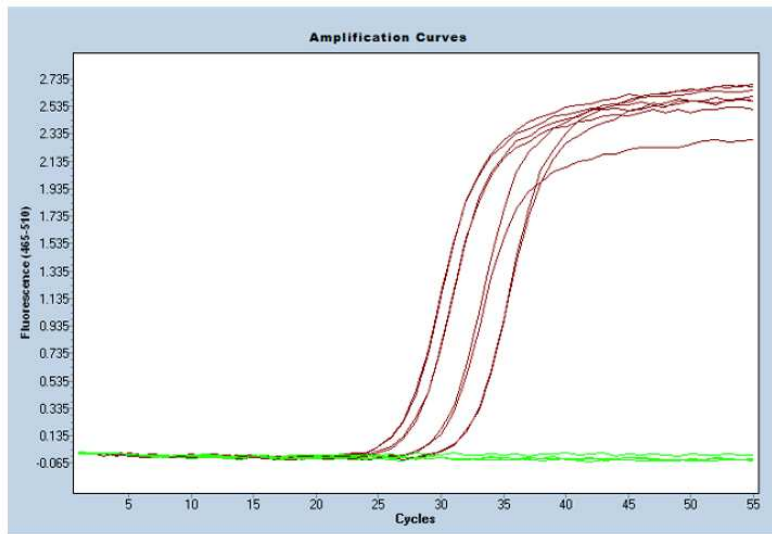
Als Erstes wurde die Standardreihe mit inbegriffener Standardkurve, mit dieser die Effizienz berechnet wird, festgelegt. Für die Standardreihe musste eine Verdünnung mit

Ergebnisse

zufällig ausgewählten Proben pipettiert werden. Zuerst wurde die qPCR mit einer Standardreihe von 1:10 – 1:50 – 1:250 – 1:1250 gewählt, jedoch wurde für die Dissertation später mit der Standardreihe von 1:5 – 1:10 – 1:50 – 1:250 gearbeitet. Bei letztgenannter Verdünnungsreihe wurde mit 10 ng cDNA / RNA gestartet, sodass folgend mit 5 ng, 1 ng und 0,2 ng gearbeitet wurde. In Abbildung 3.12 ist beispielhaft eine Standardreihe von 1:5 – 1:10 – 1:50 – 1:250 zu erkennen. An der x-Achse der Abbildung wird die Anzahl der Zyklen angezeigt, während an der y-Achse das Fluoreszenz-Signal der Standards präsentiert wird. Für jede Verdünnung ergibt sich eine braune Kurve. An dem Punkt, an dem sich die Kurve, also das Fluoreszenz-Signal signifikant vom Hintergrundrauschen, abhebt, entsteht der *Crossing-Point* (Cp)-Wert. Je früher eine Kurve nach oben geht, desto mehr Target-cDNA / RNA ist in der ursprünglichen Probe enthalten. Das heißt, die frühen Kurven besitzen eine höhere Konzentration von Target-cDNA / RNA. In der Regel ist dies die Probe mit der geringsten Verdünnung. Um Pipettier-Ungenauigkeiten auszuschließen, wurde jede Probe zweimal pipettiert, deswegen ist in der Abbildung auch zu sehen, dass zwei Kurven fast aufeinander liegen. Da zwischen der ersten und zweiten Verdünnung der Unterschied 1:2 betrifft, liegen diese Kurven näher zusammen und die folgenden Kurven mit einem Verdünnungsunterschied von 1:5 weiter auseinander, jedoch dann immer mit gleicher Distanz. Bei der qPCR wurden Negativkontrollen – Proben ohne Target-cDNA / RNA – pipettiert, diese zeigen sich in der untenstehenden Abbildung als horizontale neongrüne Linien, da kein Fluoreszenz-Signal detektiert wurde. Negativkontrollen wurden unter anderem verwendet, um eine Verunreinigung im Mastermix auszuschließen (Abb. 3 .12A). Aus den Cp-Werten der Standardreihe wurde die Standardkurve und daraus die Effizienz der qPCR berechnet. Auf der x-Achse ist die Konzentration der Standard-Proben in logarithmischer Skalierung und auf der y-Achse der Cp-Werte angegeben. Die neongrünen Punkte entsprechen den Cp-Werten der vier Verdünnungen der Standardreihe; mit diesen Punkten wurde eine lineare Gerade gezogen (Abb. 3 .12B). Anschließend wurde daraus die PCR-Effizienz ermittelt. Es wurde ein Wert von 2,0 für die Effizienz angestrebt, da es in jedem Zyklus theoretisch zu einer Verdopplung des Ausgangsmaterials kommt. Der Toleranzbereich für die späteren Auswertungen der qPCR-Effizienzen lag zwischen 1,7 und 2,1.

Ergebnisse

A



B

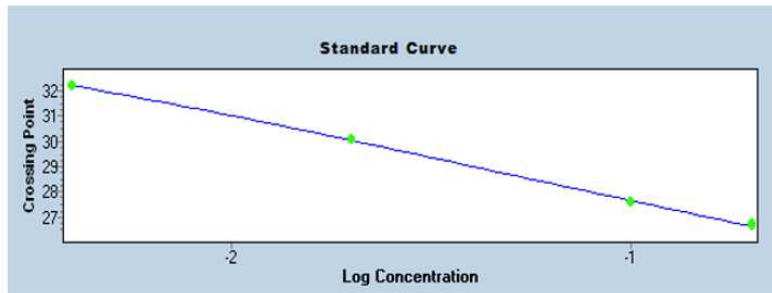


Abbildung 3.12: Standardreihe und Effizienz der Standardkurve im Two-Step Verfahren

Verdünnung von 1:5 – 1:10 – 1:50 – 1:250; Mastermix mit humanem Cerebellum 004 und 082; als Primer diente das Housekeeping Gen humanes SDHA; Effizienz betrug 1,979

A: Standardreihe; x-Achse entspricht abgelaufene PCR-Zyklen; y-Achse spiegelt Fluoreszenz-Signal wider; braune Kurven: Signale der Standardreihe; neon grüne Linien: Negativkontrollen

B: Standardkurve zu in Abb. 3.7A dargestellten Standardreihe; auf x-Achse befindet sich Cp-Wert, welcher den Moment angibt, bei dem sich das Fluoreszenz-Signal der Standard-Probe vom Hintergrund rauschen abhebt; die 4 neon grünen Punkte entsprechen den 4 Werten der 4 Verdünnungen; jeweilige Konzentration wurde in die Software Light Cycler® 480 SW 1.5.1 eingetragen; dadurch entsteht Gerade (blaue Linie) durch die 4 neon grünen Punkte; daraus wurde PCR-Effizienz von 1,979 berechnet

3.3.1.2 Etablierung der Annealing-Temperatur

Für die Etablierung der Annealing-Temperatur wurde zuerst mit einer Gradienten-PCR gearbeitet, um die optimalen Bedingungen der Primer herauszufinden. Bei der Gradienten-PCR wurden mehrere Annealing-Temperaturen und andere Parameter wie beispielsweise die benötigte Magnesiumchlorid-Konzentration in einem einzigen Lauf getestet, um die beste Kombination von Temperatur und Magnesiumchlorid-Konzentration für die Primer der späteren qPCR zu identifizieren. Es wurden Gradienten-PCRs ohne (Gesamtkonzentration von 2,5 mM Magnesiumchlorid) und mit zusätzlichem Magnesiumchlorid (Gesamtkonzentration von 3,5 mM und 5,0 mM) durchgeführt. In die Taschen des Agarosegels wurden PCR-Produkte mit unterschiedlicher Temperatur – auf der Horizontalen eingetragen – pipettiert. Bei der Vertikalen ist die Markierung der Basenpaare (bp) des Markers zur Größenabschätzung der entstandenen PCR-Produkte zu erkennen. Für OTOF und SUS1 wurden drei verschiedene Primer-Paare und für SFT2D2 ein Primer-Paar getestet. Im Folgenden wird die Gradienten-PCR von SUS1 V933-V934 (Abb. 3.13) näher betrachtet, die anderen Abbildungen der Gradienten-PCRs sind im Anhang (Abb. 9.19 – 9.24) hinterlegt. Für den Primer SUS1 V933-V934 wird ein PCR-Produkt von 149 bp erwartet. Bei der Gradienten-PCR 3,5 mM MgCl₂ (Abb. 3.13B) sind auf der Höhe von ca. 150 bp Banden bei den Temperaturen 55,9 °C, 58,0 °C, 61,9 °C und 65,2 °C zu erkennen (siehe Doppelpfeil in Abb. 3.13B), was der Erwartung des PCR-Produkts von SUS1 entspricht. Vor allem bei 61,9 °C ist die Bande deutlich intensiver, weshalb mit einer Annealing-Temperatur von 62 °C und einer Gesamtkonzentration von MgCl₂ bei 3,5 mM SUS1 V933-V934 etabliert wurde. Im Vergleich zur Abbildung 3.13B sind in Abbildung 3.13A und Abbildung 3.13C unter 100 bp Primer-Dimer, Nebenprodukte der PCR, (siehe Einfachpfeil in Abb. 3.13A und Abb. 3.13C) zu sehen und es gibt keine Banden auf der Höhe von 149 bp. Daran ist zu erkennen, wie wichtig die Gradienten-PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese ist, um die optimalen Bedingungen für die Primer – in diesem Fall die Annealing-Temperatur – zu bestimmen.

Ergebnisse

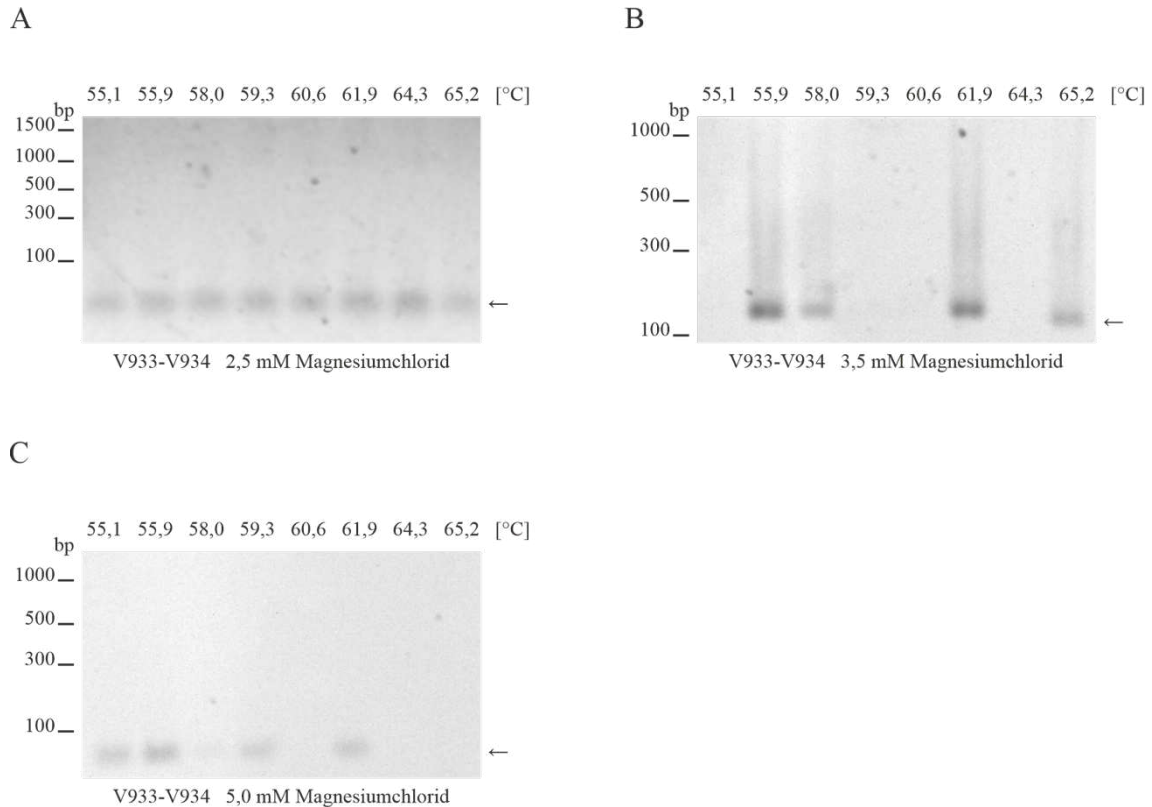


Abbildung 3.13: Gradienten-PCR von *SUSD1* V933-V934 zur Etablierung der Annealing-Temperatur

Horizontale gibt die verschiedenen Temperaturen [°C] an; Vertikale dient als Markierung der Basenpaare (bp)

A: Gesamtkonzentration von 2,5 mM $MgCl_2$; ← zeigt Primer-Dimer unter 100 bp

B: Gesamtkonzentration von 3,5 mM $MgCl_2$; ← zeigt PCR-Produkt auf Höhe von ca. 150 bp bei Temperaturen von 55,9 °C, 58,0 °C, 61,9 °C und 65,2 °C

C: Gesamtkonzentration von 5,0 mM $MgCl_2$; ← zeigt Primer-Dimer unter 100 bp

die verschiedenen Pfeile zeigen die Banden an, die durch die Agarosegel-Gelelektrophorese entstanden sind

3.3.1.3 Etablierung der Konzentration der Proben

Nach der Etablierung der Standardreihe und Annealing-Temperatur wurde die Konzentration der Proben evaluiert. Ziel der Etablierung war, dass das Fluoreszenz-Signal der Proben innerhalb der Standardreihen lag. Dadurch konnte die RNA-Menge der Proben quantifiziert werden. Beispielfhaft ist in Abbildung 3.14 die Amplifikationskurve

Ergebnisse

mit Standardreihe, Negativkontrollen und Proben präsentiert. Wie gewünscht liegen die roten Kurven – Proben – zwischen den braunen Kurven der ersten und zweiten Verdünnung der Standardreihe, nachdem eine cDNA-Menge von 1 ng eingesetzt wurde.

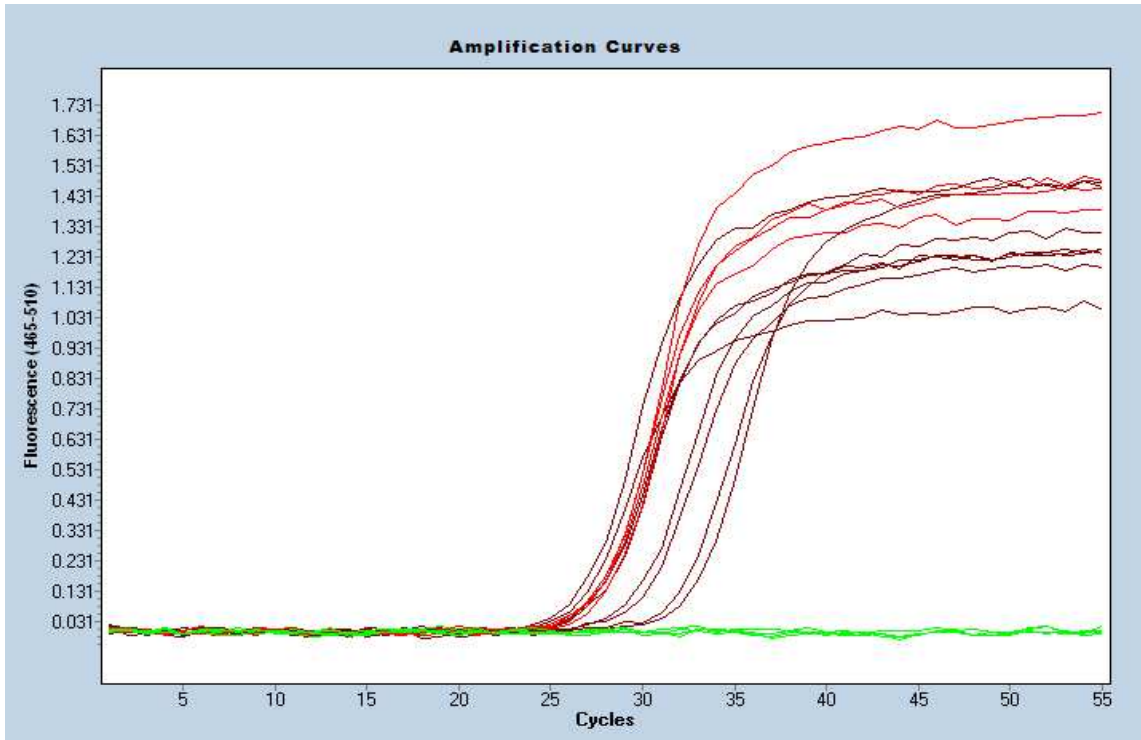


Abbildung 3.14: Signale der Proben zwischen den Kurven der Standardreihe im Two-Step Verfahren

Verdünnung von 1:5 – 1:10 – 1:50 – 1:250; Mastermix mit humanem cDNA von Kontrolle und präataktischen Probanden aus der ESMI-Studie; als Primer diente das Housekeeping Gen humanes SDHA; Effizienz betrug 1,994; x-Achse entspricht abgelaufene PCR-Zyklen; y-Achse spiegelt Fluoreszenz-Signal wider; braune Kurven: Signale der Standardreihe; rote Kurven: Signale der Proben; neongrüne Linien: Negativkontrollen

3.3.1.4 Etablierung der Primer

Die Primer OTOF, SFT2D2 und SUSD1 wurden durch Primer-BLAST des *National Center for Biotechnology Information* erstellt. Die Primer, bei denen zuvor eine Gradienten-PCR durchgeführt wurde, wurden mit den optimalen Annealing-Temperaturen, Standardreihen und MgCl₂-Konzentrationen getestet, bis ein gutes Ergebnis mit den Primern erzielt wurde. Zudem wurde bei der Etablierung der Primer

Ergebnisse

immer zusätzlich ein Housekeeping Gen pipettiert, um unterschiedliche Ausgangskonzentrationen aus der cDNA-Synthese zu erkennen und daraus bei der statistischen Auswertung zu normalisieren. Bei den Housekeeping Genen, welche unabhängig von äußeren Einflüssen, Zelltypen und -stadien exprimiert werden und häufig mit dem Grundstoffwechsel der Zellen in Kontakt stehen, handelt es sich um SDHA, GAPDH, TBP und PDHP. Nach der Etablierung der Primer SFT2D2 V761-V762 und SUS1 V933-V934 (Tab. 3.10) mit humanen Cerebellum-Proben wurden diese mit den humanen ESMI-Blutproben via qPCR ein weiteres Mal im zweistufigen Workflow etabliert.

Bei den von der Firma Metabion AG hergestellten OTOF-Primern wurden keine Ergebnisse bei der Etablierung erzielt (siehe Anhang Abb. 9.22 - 9.24), sodass bei Biomol GmbH vorgefertigte OTOF-Primer – OTOF Primerpaar 1, OTOF Primerpaar 2 – für die qPCR bestellt wurden. Aber auch diese konnten, trotz der oben beschriebenen Etablierungsversuche, nicht etabliert werden; nach Rückfrage bei der Firma wurde festgestellt, dass die Primer mit einem anderen Mastermix und einem anderen *Light Cycler*[®] Programm etabliert wurden als angegeben. Es wurden zusätzlich neue Primer – OTOF Primerpaar 3, OTOF Primerpaar 4 – mit dem zugehörigen Mastermix bei Biomol GmbH bestellt. Aufgrund der langen Lieferzeiten konnten die neuen Primer der Firma Biomol GmbH nicht mehr für diese Dissertation etabliert.

Für SFT2D2 Primer V761-V762, welche selbstständig durch Primer-BLAST erstellt und über Metabion AG bestellt wurden, wurde eine Annealing-Temperatur von 59 °C und eine Gesamtkonzentration von 2,5 mM MgCl₂ festgelegt. SFT2D2 konnte sowohl mit humanem Cerebellum als auch mit den humanen ESMI-Blutproben etabliert werden (Tab. 3.10), sodass dieser Primer für die Etablierung im *One-Step* Verfahren eingesetzt wurde.

Ferner wurde SUS1 Primer V933-V934 mit einer Annealing-Temperatur von 62 °C und einer Gesamtkonzentration von 3,5 mM MgCl₂ etabliert. Wie für SFT2D2 beschrieben, wurden SUS1-Primer mit Primer-BLAST selbstständig erstellt und über Metabion AG bestellt. Da die Etablierung von SUS1 mit humanem Cerebellum und humanen ESMI-Blutproben umgesetzt wurde (Tab. 3.10), konnte SUS1 im *One-Step* Verfahren anschließend etabliert werden.

Tabelle 3.10: Optimale Bedingungen für die qPCR mittels Two-Step Verfahren

| Optimale Bedingungen | SFT2D2 V761-V762 | SUSD1 V933-V934 |
|--------------------------------|--|--|
| Standardreihe | 1:5 – 1:10 – 1:50 – 1:250 (10 ng, 5 ng, 1 ng, 0,2 ng cDNA / RNA) | 1:5 – 1:10 – 1:50 – 1:250 (10 ng, 5 ng, 1 ng, 0,2 ng cDNA / RNA) |
| Konzentration der Proben | 1 ng | 1 ng |
| Annealing-Temperatur | 59 °C | 62 °C |
| Magnesiumchlorid-Konzentration | 2,5 mM MgCl ₂ | 3,5 mM MgCl ₂ |

3.3.2 One-Step Verfahren

Für das *One-Step* Verfahren wurde das *Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit* der Firma New England Bio Labs, welches für die farbstoffbasierte Echtzeit-Quantifizierung von RNA-Sequenzen über den SYBR[®]/FAM Fluoreszenzkanal ausgelegt ist, verwendet. Bei der Ein-Schritt-Methode findet in einem Reaktionsgefäß zuerst die Umwandlung von RNA zu cDNA durch Reverse Transkriptase und dann die Amplifikation der cDNA durch DNA-abhängige DNA-Polymerase statt, was zur Quantifizierung via qPCR führt. Die Gründe für das einstufige Verfahren sind Zeitersparnis, Vermeiden von Folgefehlern aufgrund Pipettier-Ungenauigkeit und das Sparen wertvoller RNA der ESMI-Proben aufgrund des Verzichts auf den Einzelschritt der umgekehrten Transkription. Die Entscheidung für das *Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit* stützte sich auf die Erfahrungsberichte des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen, vor allem der Medizindoktorandin Marie-Kristin Krüger, die in ihrer Dissertation verschiedene *One-Step* Kits für die qPCR verglichen hatte (Doktorarbeit, Marie-Kristin Krüger, unveröffentlicht). Im einstufigen Workflow wurden die Primer SUSD1 und SFT2D2 eingesetzt, da OTOF im *Two-Step* Verfahren nicht etabliert werden konnte.

3.3.2.1 Etablierung der Standardreihe, Annealing-Temperatur und Konzentration der Proben

Das Flussdiagramm (Abb. 3.11) zeigt, dass bei der Etablierung der Standardreihe, Annealing-Temperatur und Konzentration der Proben im *One-Step* Verfahren die gleichen Schritte wie im *Two-Step* Verfahren angewandt wurden. Für die einstufige Methode wurden zuerst die optimalen Bedingungen aus dem Zwei-Schritt-Workflow gewählt und dann angepasst, um die besten Voraussetzungen zu schaffen.

Für die Standardreihe, die aus vier Verdünnungen besteht, wurden mehrere zufällig ausgewählte ESMI RNA Blutproben pipettiert und die Verdünnungsreihe mit 1:10 – 1:50 – 1:250 – 1:1250 gewählt. Die Gesamtkonzentration der RNA bei 1:10 wurde mit 10 ng/ μ L angesetzt, sodass bei den folgenden Verdünnungen 2 ng/ μ L, 0,4 ng/ μ L und 0,08 ng/ μ L RNA-Menge pipettiert wurde. Im Kapitel der Etablierung der Standardreihe im *Two-Step* Verfahren wurde die Abbildung 3.12 mit Standardkurve und berechneter Effizienz ausführlich beschrieben; das Bild der Kurven stimmt mit dem für die zweistufige Methode überein.

Die optimale Annealing-Temperatur, die im *Two-Step* Verfahren durch die Gradienten-PCR etabliert wurde, konnte auf die Primer SFT2D2 und SUSD1 übertragen werden. Diese betrug für SFT2D2 59 °C und für SUSD1 62 °C.

Die Konzentration der RNA-Proben wurde auf 2 ng/ μ L festgelegt, wodurch der Cp-Wert der Proben innerhalb der Standardreihe lag. Beispielhaft wird SUSD1 in Abbildung 3.15 im folgenden Kapitel „Etablierung der Primer SFT2D2 und SUSD1“ gezeigt.

3.3.2.2 Etablierung der Primer SFT2D2 und SUSD1

Die Etablierung von OTOF in der Ein-Schritt-Methode konnte nicht durchgeführt werden, da OTOF im zweistufigen Workflow noch nicht etabliert wurde. Die Etablierung der Primer SUSD1 und SFT2D2 mit dem *Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit* richtete sich nach der Etablierung der Primer im *Two-Step* Verfahren. Für die Primer SFT2D2 V761-V762 wurden die Bedingungen – Annealing-Temperatur von 59 °C – übernommen. Die Etablierung von SFT2D2 wurde nicht komplett abgeschlossen, da der Primer zwar

Ergebnisse

mit den Proben innerhalb der Standardreihe lagen, aber immer eine der Negativproben positiv war. Bei den SUS D1 Primern V933-V934 wurde die Annealing-Temperatur von 62 °C beibehalten, aber die Zugabe von MgCl₂ wurde nicht benötigt; beispielhaft ist die erfolgreiche Etablierung von SUS D1 in der untenstehenden Abbildung 3.15 zu sehen. An der x-Achse wird die Anzahl der Zyklen und an der y-Achse das Fluoreszenz-Signal der Standards – als braune Kurven – und Proben - als rote Kurven – angezeigt. Die neongrünen Linien stehen für die Negativkontrollen, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass der Mastermix Verunreinigungen aufweist. Anhand der roten Kurven, die zu unterschiedlichen Zyklen einen C_p-Wert haben, kann auf unterschiedliche Konzentrationen von Target-RNA geschlossen werden. Die Konzentrationen unterscheiden sich somit je nach den drei ProbandInnen-Gruppen Kontrolle, moderat und schwer. Es wurde eine Effizienz von 1,983 berechnet; diese liegt im Toleranzbereich.

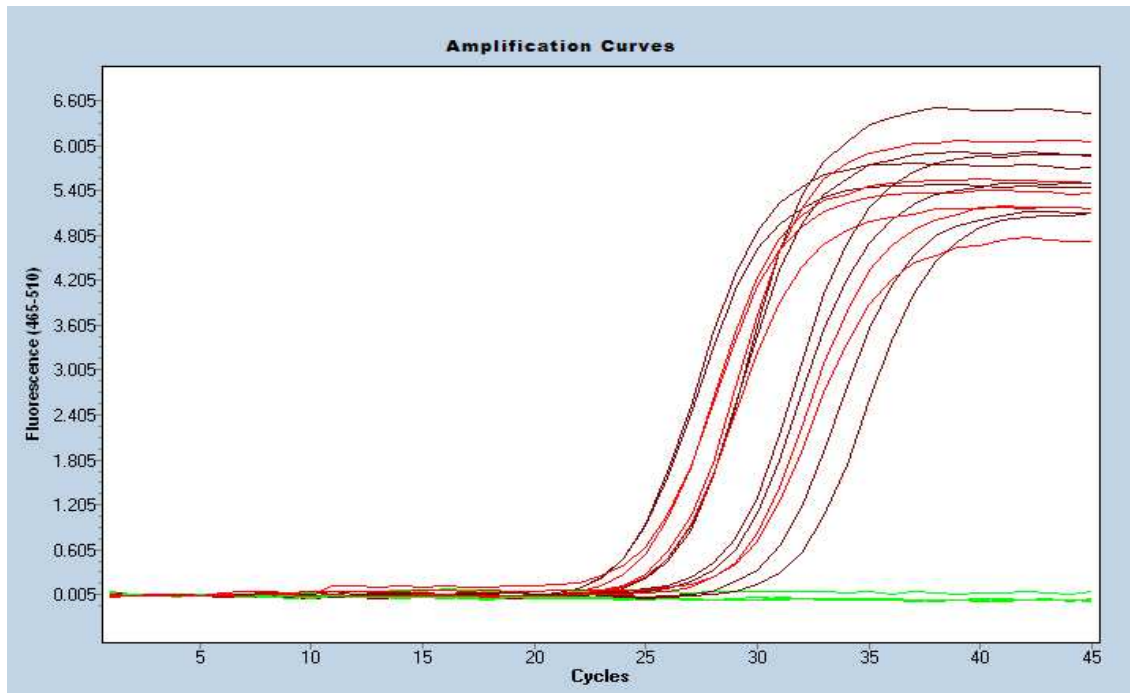


Abbildung 3.15: Signale der Proben zwischen den Kurven der Standardreihe im One-Step Verfahren

Verdünnung von 1:10 – 1:50 – 1:250 – 1:1250, Mastermix mit ESMI RNA Blutproben P03 E11 (Kontrolle), P03 F09 (moderat) und P03 D10 (schwer), als Primer diente SUS D1 V933-V934, Effizienz betrug 1,983; x-Achse entspricht abgelaufene PCR-Zyklen; y-Achse spiegelt Fluoreszenz-Signal wider; braune Kurven: Signale der Standardreihe; rote Kurven: Signale der Proben; neongüne Linien: Negativkontrollen

3.3.2.3 Keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen präataktischen MutationsträgerInnen und SCA3 PatientInnen mit schwerer Erkrankungsform in der qPCR mit SUSD1

Der von Schmitz-Hübsch et al., 2006 entwickelte SARA-Score (*Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*) gilt als Bewertung für die Einschätzung der Schwereform der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 und kann für die Evaluierung von Therapiemaßnahmen verwendet werden (Schmitz-Hübsch et al., 2006). Es werden in acht klinischen Tests die ataktischen-Symptome analysiert und mit Punkten bewertet. Je höher die Punktzahl, desto schwerer ist die Erkrankungsform (Silberbauer et al., 2023). Der INAS-Score (*Inventory of Non-Ataxia Signs*) wurde eingeführt, um nicht-ataktische Anzeichen und deren Schweregrad auf standardisierte Weise zu bestimmen. INAS besteht aus 30 Elementen, die sich auf zerebelläre okulomotorische und verschiedene nicht-ataktische Anzeichen (beispielsweise Ruhezitern, Spastik, Amyotrophie etc.) beziehen (Jacobi et al., 2013). Wie beim SARA-Score ist eine höhere Punktzahl ein Beleg für eine schwerere Erkrankungsform der SCA3. Nach der Etablierung von SUSD1 im *One-Step* Verfahren wurden RNA-Proben der ESMI-Studie von präataktischen SCA3 MutationsträgerInnen und schwer betroffenen SCA3 PatientInnen ausgewählt. Mittels qPCRs wurden die präataktischen ProbandInnen in Bezug zu schwer erkrankten PatientInnen analysiert. PatientInnen mit schwerer Form der SCA3 haben einen hohen SARA- und INAS-Score. Zum Beispiel haben diese PatientInnen eine Punktzahl von 26 beim SARA-Score und eine Punktzahl von 7,4 beim INAS-Score; dies ist der Mittelwert der ausgewählten schwer betroffenen SCA3-ProbandInnen in der qPCR mit SUSD1 (Tab. 3.11). Präataktische MutationsträgerInnen sind Personen, die aufgrund ihres *ATXN3* CAG-*Repeats* höchstwahrscheinlich in den nächsten Jahren bzw. Jahrzehnten Symptome der SCA3 Erkrankung entwickeln werden, aber bei denen die Krankheit bisher noch nicht ausgebrochen ist. Diese Kohorte, welche für die qPCR-Analysen gewählt wurde, hatte im Durchschnitt einen SARA-Score von 0,9 und einen INAS-Score von 0,8, was gesunden Personen gleicht (Tab. 3.11). Der Grund für die Auswahl der zwei Gruppen war, dass im RNA-Sequenzierungs-Datensatz SUSD1 bei PatientInnen mit schwerer Form der SCA3, welchen in der Baseline-Visite Blut abgenommen wurden, mit einem logFold Change von 0,324 und einem p-Wert von $2,21 e^{-4}$ im Netzwerk „Krebs, Hämatologische Erkrankung, Immunologische Erkrankung“ hochreguliert in Bezug auf

präataktischen SCA3 ProbandInnen analysiert wurde (Abb. 3.10C). Für die qPCR im *One-Step* Verfahren wurden jeweils zwölf Proben aus den ESMI RNA Blutproben ausgewählt (Tab 3.11). Die Entscheidung, welche Proben für die qPCR in Fragen kamen, wurde aufgrund von RNA-Qualität (RIN-Wert), Geschlecht, Alter, Geographie etc. getroffen. Dabei wurde sich bemüht, aus allen ESMI-Standorten Proben auszuwählen, um die demographische Verteilung der SCA3 ProbandInnen der ESMI-Kohorte in Europa widerzuspiegeln (Abb. 3.16). Es wurden pro Erkrankungsform je 50% Frauen gewählt, sodass jedes Geschlecht gleichermaßen vorhanden war. Das Durchschnittsalter am Tag der Blutentnahme lag bei den präataktischen ProbandInnen bei 34 Jahren und bei schwer-ataktisch erkrankten SCA3 PatientInnen bei 55 Jahren. Das gemeldete Erkrankungsalter, auch *Age at Onset* genannt, lag im Durchschnitt bei den ausgewählten schwer betroffenen SCA3 ProbandInnen bei 40 Jahren (Tab. 3.11). Dies entspricht dem der Forschung vorliegenden Erkrankungszeitpunkt von der dritten und fünften Lebensdekade. In den Anfängen des ESMI-Projekts wurde bei dem *Age at Onset* (AAO) nicht definiert, ob hiermit das klinische oder subjektive AAO gemeint ist, weshalb bei präataktischen SCA3 PatientInnen teils kein gemeldetes Erkrankungsalter und teils ein AAO angegeben ist. Später wurde bei ESMI festgelegt, dass es sich hier um das klinische *Age at Onset* handelt. Dies erklärt, warum bei den ausgesuchten RNA-Proben der präataktischen Kohorte ein gemeldetes Erkrankungsalter von 33 vorlag. Dieser Wert ergab sich durch die Angabe von zwei von insgesamt zwölf präataktischen MutationsträgerInnen. Der Mittelwert der *Repeat*-Längen von ATXN3 lag bei der untersuchten Kohorte der präataktischen Mutationsträger bei 23/68 und der schweren Ataxie bei 22/71 (Tab. 3.11). Dies zeigt, dass die durchschnittliche *Repeat*-Länge der gegenübergestellten ProbandInnen-Gruppen sehr ähnlich ist, was einen Vergleich zwischen den Erkrankungsformen ermöglicht. Bei der Auswahl der Proben wurde darauf geachtet, einen hohen RIN-Wert (RNA-Qualitätszahl) zu haben, denn dieser verspricht eine gute Qualität der RNA und hat eine Spanne von 0-10. Bei beiden Gruppen wurde ein RIN-Wert von über acht im Mittel erreicht (Tab. 3.12). Die ESMI-ProbandInnen sollten vor der Untersuchung fasten, damit alle Daten vergleichbar sind. Im Durchschnitt wurde bei den präataktischen PatientInnen eine Dauer des Fastens von 8 Stunden und bei den schwer betroffenen SCA3 PatientInnen von 7 Stunden erreicht (Tab. 3.12). Die kürzere Zeitdauer bei den Schwerkranken ist darauf zurückzuführen, dass diese häufig

Ergebnisse

mehr Medikamente einnehmen und generell einen schwächeren Gesundheitszustand aufweisen, was eine Abstinenz von Nahrung erschwert. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde zweimal durchgeführt, um die Aussage der Ergebnisse zu überprüfen; in Abbildung 3.17 sind die statistischen Auswertungen zu beiden qPCRS zu finden. Durch die deskriptive Statistik der zwei durchgeführten qPCRS mit SUSD1 wurde bei den präataktischen MutationsträgerInnen ein Median der SUSD1-Expression von 1,0211, für die 25. Perzentile von 0,7857 und für die 75. Perzentile von 1,27 berechnet. Für die PatientInnen mit schwerer Erkrankungsform wurde ein Median der SUSD1-Expression von 0,9527, 25. Perzentile von 0,791 und 75. Perzentile von 1,138 ermittelt. In beiden qPCRS wurde die Normalisierung auf die schwer erkrankten SCA3 PatientInnen durchgeführt, wodurch der Mittelwert dieser mit 1,0 berechnet wurde. Mit den Punkten bzw. Rechtecken sind die einzelnen untersuchten RNA-Proben dargestellt und zeigen somit deren Verteilung. Eine Signifikanz konnte keinem der beiden qPCRS erkannt werden; bei der qPCR SUSD1 Nr. 1 wurde ein p-Wert von 0,6369 und bei der qPCR SUSD1 Nr. 2 ein p-Wert von 0,9433 berechnet (siehe Abb. 3.17).

Tabelle 3.11: Demographische Informationen und statistische Auswertung zu den in der qPCR verwendeten Proben von präataktischen MutationsträgerInnen und schwer betroffenen SCA3 PatientInnen

Alle Daten wurden als Mittelwert beider durchgeführter qPCRS mit SUSD1 ermittelt

¹ Wert für das gemeldete Erkrankungsalter der präataktischen ProbandInnen ergibt sich, da zum Zeitpunkt der PatientInnen-Befragung innerhalb des ESMI-Projekts nicht geklärt war, ob mit der Angabe des gemeldeten Erkrankungsalters die subjektive Meinung der PatientInnen oder klinisch ermittelte Symptome (wie im SARA-Score) gemeint war; heute ist AAO die Angabe des Erkrankungsalters aufgrund klinischer Symptome

| Demographische Informationen | Präataktisch SCA3 | Schwere Ataxie SCA3 |
|---|--------------------------|----------------------------|
| Stichprobengröße (weiblich) | 12 (50%) | 12 (50%) |
| Alter (Jahre) | 39 (27-50) | 60 (43-76) |
| Alter am Tag der Probenentnahme (Jahre) | 34 | 55 |
| Gemeldetes Erkrankungsalter (Jahre) | 33 ¹ | 40 |

Ergebnisse

| | | |
|--------------------|-------|-------|
| SARA-Score | 0,9 | 26 |
| INAS-Score | 0,8 | 7,4 |
| Repeat-Länge ATXN3 | 23/68 | 22/71 |

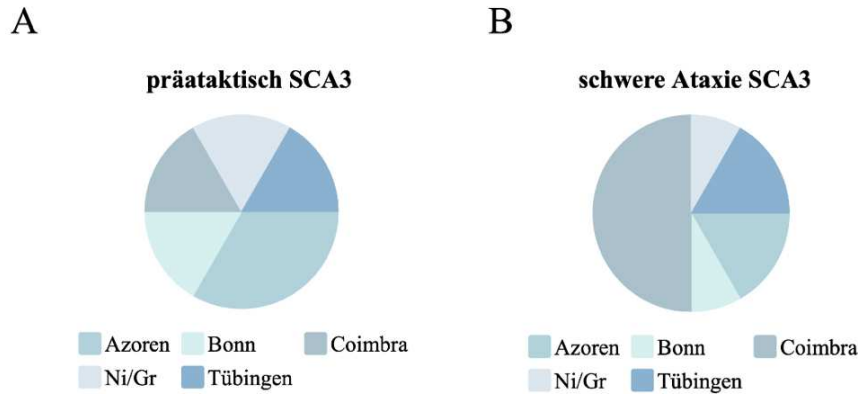


Abbildung 3.16: Demographische Verteilung der RNA-Proben des ESMI-Projektes in Form eines Kreisdiagrammes

A: Diagramm der Proben der präataktischen MutationsträgerInnen; die Anzahl der Proben von den Azoren ist doppelt so hoch wie die von Bonn; aber alle anderen Proben, also Coimbra, Ni/Gr und Tübingen haben die gleiche Anzahl der Proben wie Bonn

B: Diagramm der Proben der PatientInnen mit schwerer Form der SCA3; die Hälfte der Proben stammt aus Coimbra, der Rest ist ungefähr gleichmäßig auf die anderen ESMI-Zentren verteilt
Ni/Gr: Nijmegen/Groningen

Tabelle 3.12: Weitere Informationen für die Entscheidung der Auswahl der Proben und der Ergebnisse der qPCR

Alle Daten wurden als Mittelwert beider durchgeführter qPCRs mit SUSD1 ermittelt; die Ergebnisse wurden auf die SCA3 PatientInnen mit schwerer Form der Erkrankung normalisiert

| | Präataktisch SCA3 | Schwere Ataxie SCA3 |
|--|-------------------|---------------------|
| RIN-Wert (RNA-Qualitätszahl) | 8,0 | 8,4 |
| Stunden des Fastens vor Blutentnahme (Stunden) | 8 | 7 |
| Median der SUSD1-Expression | 1,0211 | 0,9527 |

| | | |
|-------------------------------------|--------|-------|
| 25. Perzentile der SUSD1-Expression | 0,7857 | 0,791 |
| 75. Perzentile der SUSD1-Expression | 1,27 | 1,138 |

A

B

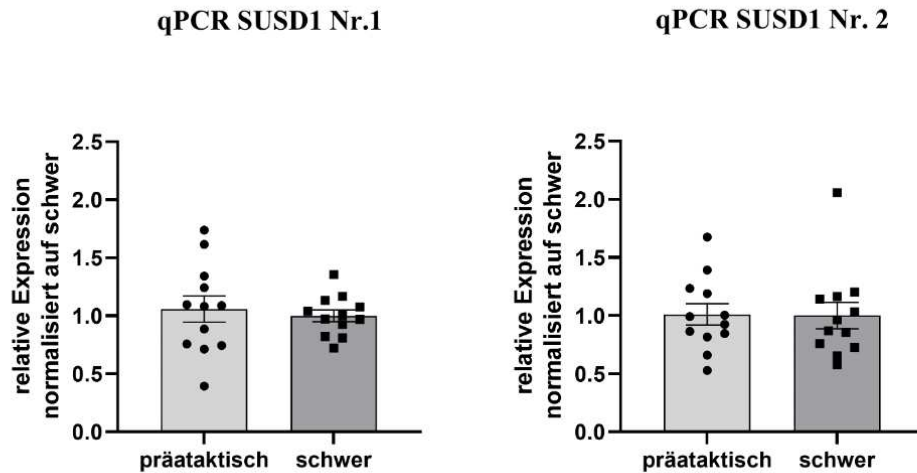


Abbildung 3.17: Vergleichende qPCR zwischen präataktischen MutationsträgerInnen und schwer betroffenen SCA3 PatientInnen mit den Primern SUSD1

qPCR wurde im Rahmen des One-Step Verfahrens durchgeführt; SUSD1 Primer V933-V934 wurden verwendet; SDHA diente hier als Housekeeping RNA-Expression; x-Achse: Säulen der präataktischen Mutationsträger und schwer erkrankten SCA3 PatientInnen; y-Achse: relative Expression, die auf die schwer betroffenen ProbandInnen normalisiert wurde; Kreis: Proben der präataktischen Kohorte; Quadrat: Proben der schwer erkrankten Kohorte

A: PCR-Effizienz von 1,908 bei SUSD1

B: PCR-Effizienz von 1,993 bei SUSD1

3.4 Teil C: Protein-Methoden in SCA3 Knock-In Mäusen

Es ist bekannt, dass bei der Pathogenese vieler neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Huntington oder den Spinocerebellären Ataxien (SCAs) Aggregate durch Polyglutamin-Proteine in Neuronen gebildet werden (van Waarde-Verhagen & Kampinga, 2017). ATNX3 interagiert mit mehr als 100 Proteinen, zu diesen gehören viele

Ergebnisse

molekulare Chaperone, welche in Zellen für die korrekte Faltung komplexer Proteine verantwortlich sind (H. L. Paulson et al., 2017). Deswegen verhindern diese die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen, wodurch viele schädliche Folgeereignisse gestoppt werden können. Bei der Akkumulation eines aggregierten PolyQ-Proteins – wie ATXN3 – kommt es zur Induktion der Autophagie, so dass fehlgefaltete und aggregierte Proteine abgebaut werden können (Lin et al., 2014). Deshalb ist es von großer Bedeutung, Chaperone im Kontext der SCA3-Erkrankung zu beleuchten. Um zu untersuchen, welche Chaperone und Hitzeschockproteine in der Aggregation des Erkrankungsproteins in der SCA3 eine entscheidende Rolle spielen, wurden diese in SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022), welche eine sehr starke Aggregation im Gehirn zeigen, mittels molekularbiologischer Methoden wie Filter Trap, Western Blot und Immunhistochemie validiert. Für die Nachweise wurden wildtypische (WT), heterozygote (HT; WT/304Q) und homozygote (HO; 304Q/304Q) Mäuse unterschiedlichen Alters von drei (3 M), zwölf (12 M) und achtzehn Monaten (18 M) gewählt. Durch den Western Blot können lösliche Proteine, welche durch Blotting auf eine Trägermembran übertragen werden, mittels Antikörperbindung nachgewiesen werden. Bei dieser molekularbiologischen Methode wurden die jeweils gleichaltrigen (3 M, 12 M und 18 M) homozygote, heterozygote und wildtypische Mäuse miteinander verglichen. Danach wurde mittels statistischer Verfahren analysiert, ob Signifikanzen zwischen den einzelnen Genotypen der Mäuse vorlagen, und in Form eines Säulendiagramms abgebildet. Bei der Methode des Filter Traps, bei dem ausschließlich 18-monatige homozygote und heterozygote SCA3 KI Mäuse mit Bezug zu gleichaltrigen Wildtypen verglichen wurde, wird die gemeinsame Akkumulation von Ataxin-3, dem Erkrankungsprotein der SCA3 und Chaperonen, untersucht. Anschließend wurde eine statistische Auswertung durchgeführt, bei der die relative Expression auf die wildtypischen Tiere normalisiert und die Signifikanz zwischen den einzelnen Proteinen berechnet wurde. Diese Auswertung wurde in Form vom vertikalen Säulendiagramm dargestellt. Gewebe- und zellspezifische Proteine und andere Strukturen können bei der Immunhistochemie mittels Antikörper sichtbar gemacht werden. Es wurden die SCA3-KI-Mäuse mit Wildtyp und homozygoten 304Q expandiertem murinen ATXN3 im Alter von 3, 12 und 18 Monaten verglichen. Vor allem die fünf Hirnregionen Cerebellum, Hippocampus, Nuclei cerebelli, Pons, Truncus encephali, bei welchen sich die

Hauptpathogenese der SCA3 abspielt, wurden mittels mikroskopischer Verfahren analysiert. Es wurden von den im Stratum ganglionare (Cerebellum) sitzenden Purkinje-Zellen, den GABAergen Neuronen des Cortex cerebelli, den Nuclei cerebelli (Tiefe Kleinhirnkerne), vom Pons und vom Gyrus Dentatus des Hippocampus mikroskopische Bilder aufgenommen. Somit sollten mit Hilfe der erwähnten Techniken sowohl die Expression von Chaperonen und Hitzeschockprotein im Erkrankungsverlauf als auch die Lokalisation und die Beteiligung während der Aggregation in der SCA3 Pathogenese untersucht werden.

3.4.1 Expressionsunterschiede innerhalb der Genotypen in den Western Blot Analysen

Beim Verfahren des Western Blots wurden SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) im Alter von 3, 12 und 18 Monaten verwendet. Bei den Proben handelte es sich um Lysate des gesamten Gehirns der Mäuse. Es wurden jeweils drei wildtypische, heterozygote und homozygote 304Q KI Mäuse gewählt. Es ist sowohl eine Aufnahme des Western Blots als auch die statistische Auswertung des Western Blots mit der Normalisierung auf ein Housekeeping Protein, welches bei jedem Western Blot zuletzt detektiert wurde, in den Abbildungen dargestellt. Bei den Housekeeping Proteinen wurden beispielweise GAPDH, Vinculin und β -Aktin verwendet.

3.4.1.1 Western Blot von Atxn3 mit den erwarteten Banden des nicht-expandierten Proteins, expandierten Proteins und der Aggregatbildung

Für die Bestätigung des Genotyps der verwendeten Gehirnproben wurde zuerst ein Western Blot durchgeführt, welcher mittels des Atxn3 Antikörpers (Klon 1H9) detektiert wurde. In Abbildung 3.18A ist der Western Blot mit Atxn3 und GAPDH als Ladekontrolle dargestellt. GAPDH konnte auf Höhe von 37 kDa nachgewiesen werden, welche eine gleichmäßige Beladung des Blottes zeigt (Abb. 3.18A). Bei der Detektion mittels des Atxn3 Antikörpers konnte bei allen drei Genotypen eine Bande bei ca. 25 kDa (siehe Einfachpfeil in Abb. 3.18A) und eine Bande bei ca. 45 kDa (siehe Sternchen bei

Ergebnisse

Abb. 3.18A) detektiert werden. Diese werden *light chain* (25 kDa) und *heavy chain* (45 kDa) genannt und sind dem Maus IGG zu zuordnen. Dies ist möglich, da hier der Antikörper ebenfalls aus der Maus stammt, und somit in Mausgewebe die Immunglobuline detektieren kann. Neben den beiden genannten Banden können je nach Genotyp verschiedene weitere Banden bei 37 kDa (siehe anti-Atxn3 Beschriftung in Abb. 3.18A), 150 kDa (siehe Doppelpfeil in Abb. 3.18A) und am Übergang zwischen Sammel- und Trenngel (siehe dicker weißer Pfeil in Abb. 3.18A) detektiert werden. Die Bande bei ca. 37 kDa kann sowohl bei wildtypischen Mäusen als auch bei heterozygoten 304Q KI Tieren, aber nicht bei homozygoten Tieren nachgewiesen werden. Bei dieser Bande könnte es sich um endogenes murines ATXN3 handeln. Zusätzlich kann in heterozygoten und homozygoten SCA3 Mäusen eine Bande bei ca. 150 kDa detektiert werden, welche nicht bei Wildtypen zu finden war. Somit kann in den wildtypischen Tieren nur das endogene ATXN3 bei 37 kDa, in homozygoten 304Q Mäusen nur das expandierte ATXN3 bei 150 kDa und bei heterozygoten Tieren beide ATXN3-Proteine bei 37 kDa und 150 kDa nachgewiesen werden. Dadurch bestätigte sich der Genotyp der gewählten Mäuse. Zusätzlich konnten in den heterozygoten und homozygoten Tieren höhermolekulare Atxn3-spezifische Proteine, wie beispielsweise Akkumulationen, im Bereich zwischen Sammel- und Trenngel nachgewiesen werden (Abb. 3.18A). Die statistische Analyse in Abbildung 3.18B zeigt, dass im endogenen ATXN3 eine Signifikanz von 0,0143 zwischen wildtypischen und homozygoten 304Q KI Tieren gefunden wurde. Bei der Bande des expandierten ATXN3 ist bei den heterozygoten SCA3 Mäusen eine stärkere Färbung (Abb. 3.18) zu sehen, was sich in der Statistik (Abb. 3.18B) mit signifikanten Veränderungen von 0,0437 zwischen homozygoten und heterozygoten Genotypen und von 0,0092 zwischen wildtypischen und heterozygoten Mäusen ausdrückt. Bei der Analyse der Banden, welche Aggregate darstellen können, wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen berechnet, jedoch ist ein deutlicher Anstieg der gelösten Proteine von wildtypischen zu heterozygoten zu homozygoten Tieren im Säulendiagramm dargestellt. Die relative Expression wurde bei allen Analysen auf GAPDH und anschließend auf die Wildtypen normalisiert (Abb. 3.18B).

Ergebnisse

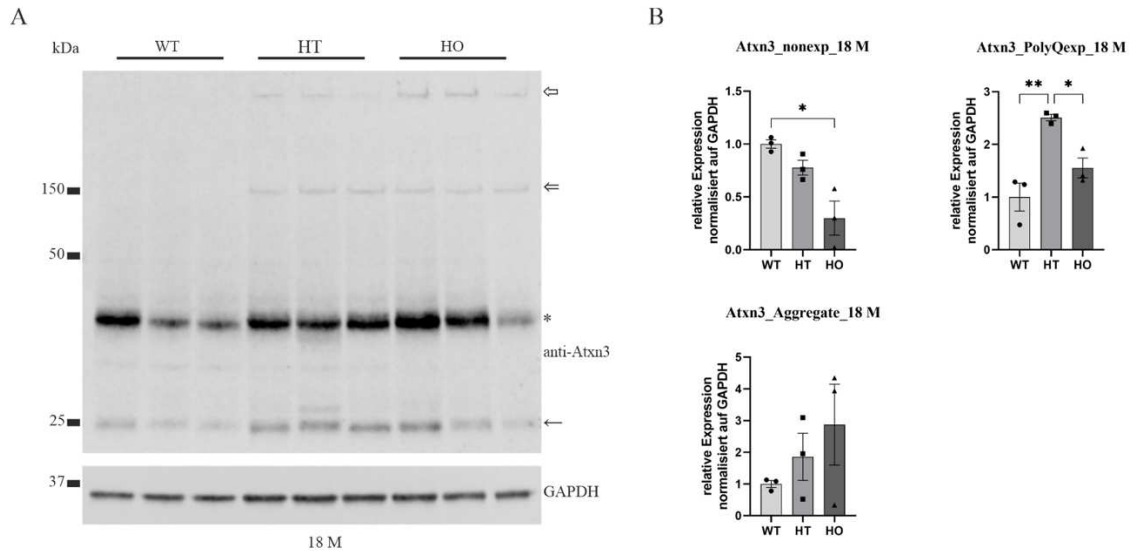


Abbildung 3.18: Western Blot von Atxn3 mit den erwarteten Banden für die Erkrankung SCA3

A: Western Blot von Atxn3 mit 18 M Mäusen und Housekeeping Protein GAPDH als Ladekontrolle; *: heavy chain; →: light chain; anti-Atxn3: nonexp Bande; ⇒: PolyQexp Bande; ⇔: Aggregat-Bande

B: statistische Auswertung des Western Blots mit 18 M Mäusen; relative Expression normalisiert auf GAPDH; Bei der Bande des nichtexpandierten Proteins wurde eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ zwischen WT und HO berechnet; Bei der Bande des expandierten Proteins wurde eine hohe Signifikanz von $p \leq 0,01$ zwischen WT und HT und eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ zwischen HT und HO gefunden; Bei der Bande der Aggregation wurde keine signifikante Veränderung berechnet

WT $n=3$; HT $n=3$; HO $n=3$; Nonexp: nicht-expandiertes Ataxin-3; PolyQexp: expandiertes Ataxin-3; *: Signifikanz von $p \leq 0,05$; **: hohe Signifikanz von $p \leq 0,01$; 18 M: 18 Monate; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.1.2 Geringere Expression von ACY3 bei dreimonatigen homozygoten Mäusen

Um die ACY3-Expression im Krankheitsverlauf zu bestimmen, wurden Western Blot Analysen mit 3, 12 und 18 Monate alten Mäusen durchgeführt (Abb. 3.19A, C, E). Die erwartete Bande für ACY3 bei einem Molekulargewicht von 35 kDa wurde bei allen drei Western Blots und allen Genotypen gefunden. Für die drei Western Blots wurde der

Ergebnisse

polyklonale ACY3-Antikörper ausgewählt. Der Western Blot mit dreimonatigen Mäusen ist in Abbildung 3.19A dargestellt; Vinculin mit 116 kDa als Ladekontrolle zeigt eine einigermaßen gleichmäßige Beladung des Gels mit Proteinen. Bei den homozygoten 304Q KI Mäusen (HO) weist ACY3 eine geringe Banden-Intensität in Bezug auf wildtypische Tiere (WT) und heterozygote SCA3 KI Mäuse (HT) auf. Die statistische Analyse in Abbildung 3.19B zeigt eine „relative Expression normalisiert auf Vinculin“ und bestätigt eine signifikante Reduktion von ACY3 in homozygoten 304Q Tieren auf WT von 0,0227 und auf HT von 0,0185. Zwischen wildtypischen und heterozygoten Tieren konnten keine Expressionsunterschiede von ACY3 festgestellt werden (Abb. 3.19B). In Abbildung 3.19C ist der Western Blot mit den Mäusen im Alter von 12 Monaten dargestellt; als Ladekontrolle dient GAPDH mit 37 kDa und weist eine einigermaßen gleiche Beladung des Gels mit Proteinen. Bei den zwölfmonatigen Mäusen ist im Western Blot kein deutlicher Expressionsunterschied zu sehen, was sich auch in der statistischen Analyse (Abb. 3.19D) widerspiegelt. Die relative Expression wurde auf das *Housekeeping* Protein GAPDH und anschließend auf die Wildtypen normalisiert. Dies zeigt sich auch im Western Blot der 18-monatigen Mäuse (Abb. 3.19E), bei dem β -Aktin als Ladekontrolle fungiert. Bei 42 kDa ist β -Aktin zu erwarten und auch hier zu sehen. Zudem wurden die Taschen des Gels mit den Proteinproben gleichmäßig beladen. In Abbildung 3.19F ist die statistische Analyse des Western Blots mit 18 Monate alten Mäusen dargestellt. Die Expressionen scheinen relativ regelmäßig zu sein, da die Säulen des Diagramms ungefähr auf gleicher Höhe sind. Die eine Probe als Dreieck in HO-Säule (Abb. 3.19F) ist wahrscheinlich die rechte Probe der homozygoten SCA3 Tiere (Abb. 23.19E); diese lässt die Säule vom homozygoten Genotyp höher erscheinen, was daran liegt, dass hier β -Aktin geringer ist und dadurch übermäßig stark berechnet ist.

Ergebnisse

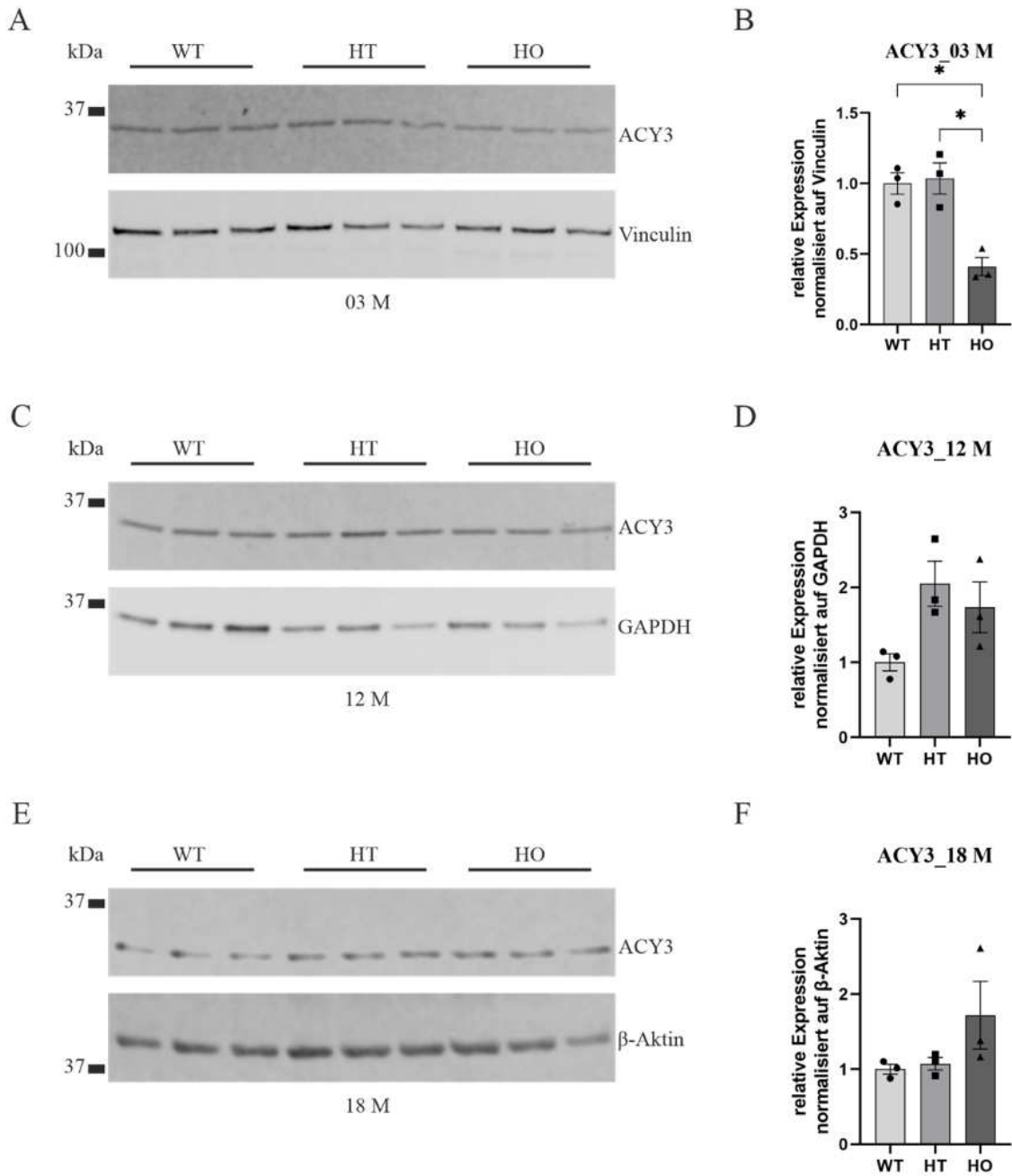


Abbildung 3.19: Western Blot von ACY3 mit signifikanten Expressionsunterschieden in den dreimonatigen Tieren

A: Western Blot von ACY3 mit Mäusen im Alter von 3 Monaten und Housekeeping Protein Vinculin als Ladekontrolle

B: statistische Auswertung des Western Blots mit dreimonatigen Mäusen; relative Expression normalisiert auf Vinculin; geringere Expression bei homozygoten Mäusen im Vergleich zu wildtypischen und heterozygoten Tieren, wodurch eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ zwischen WT und HO als auch zwischen HT und HO berechnet wurde

Ergebnisse

C: Western Blot von ACY3 mit zwölfmonatigen Mäusen und Housekeeping Protein GAPDH als Ladekontrolle

D: statistische Auswertung des Western Blots mit Mäusen von 12 Monaten; relative Expression normalisiert auf GAPDH; keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Genotypen gefunden

E: Western Blot von ACY3 mit Mäusen im Alter von 18 Monaten und Housekeeping Protein β -Aktin als Ladekontrolle

F: statistische Auswertung des Western Blots mit 18-monatigen Mäusen; relative Expression normalisiert auf β -Aktin; keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen wildtypischen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen gefunden

*WT n=3; HT n=3; HO n=3; *: Signifikanz von $p \leq 0,05$; 3 M: 3 Monate; 12 M: 12 Monate; 18 M: 18 Monate; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen*

3.4.1.3 Unerwartete Bande bei 25 kDa in allen Western Blots von CA9

Für die Bestimmung der Expression von CA9 im Verlauf der Krankheit SCA3 wurden Western Blot Analysen mit Mäusen im Alter von 3, 12, und 18 Monaten durchgeführt (Abb. 3.20A, C, E). Für die Western Blot Methode wurde der polyklonale rekombinante CA9-Antikörper ausgewählt. Das vorhergesagte Molekulargewicht von 50 kDa für CA9 wurde in allen drei Western Blots in allen Genotypen gefunden. Außerdem wurde eine weitere Bande in allen durchgeführten Western Blots bei ca. 25 kDa, welche bei allen drei Altersstufen deutlich weniger intensiv als die erwartete Bande gefärbt wurde, detektiert (siehe * in Abb. 3.20A, C, F). Eine Redetektion anderer Antikörper kann ausgeschlossen werden. Jedoch ist bisher nur eine proteinkodierende Isoform von CA9 bekannt (ensembl.org; zuletzt abgerufen am 24.08.23 um 16.30 Uhr). Der Western Blot mit den 3 Monate alten Mäusen ist in Abbildung 3.20A dargestellt und es ist das *Housekeeping* Protein Vinculin, welches die gleichmäßige Beladung in die Taschen des Western Blots beweist, als Ladekontrolle zu erkennen. Sowohl die Bande bei ca. 50 kDa als auch bei ca. 25 kDa zeigen unterschiedlich starke Expressionen innerhalb der Genotypen. Dies erklärt auch, dass für beide Banden keine signifikanten Veränderungen berechnet wurden. Bei der Auswertung wurde auf Vinculin und die entsprechenden

Ergebnisse

Wildtypen normalisiert. (Abb. 3.20B). In Abbildung 3.20C, dem Western Blot mit 12 Monate alten Mäusen, ist ein ähnliches Bild wie im Western Blot mit dreimonatigen Mäusen zu erkennen. Wieder gibt es einzelne Banden mit sehr starker und andere mit schwacher Expression innerhalb der einzelnen Genotypen, wodurch eine große Streuung entsteht. In diesem Western Blot diente GAPDH als Ladekontrolle und wurde in der statistischen Analyse für die Normalisierung der relativen Expression verwendet. In dieser konnte auch für die zwölfmonatigen Tiere keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Die starken Expressionsunterschiede innerhalb der wildtypischen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Tiere sind durch die Streuung dargestellt (Abb. 3.20D). Wie für den Western Blot mit 12 Monate alten Mäusen wurde auch für den Western Blot mit 18-monatigen Tieren GAPDH, das gleichmäßige Banden und somit eine gleichmäßige Beladung des Blottes zeigt, als Ladekontrolle gewählt. Im Western Blot (Abb. 3.20E) ist eine weitere sehr intensive Bande, markiert mit einem Einfachpfeil, zu sehen. Hier handelt es sich um eine Redetektion des *Housekeeping* Proteins GAPDH. Da auch in diesem Western Blot die CA9 spezifischen Banden unterschiedlich stark innerhalb der Genotypen exprimiert sind, konnte weder für die 50 noch für die 25 kDa Bande ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen wildtypischen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen berechnet werden (Abb. 3.20F). Die Auswertung erfolgte mittels Normalisierung auf GAPDH und die entsprechenden Wildtyp-Proben.

Ergebnisse

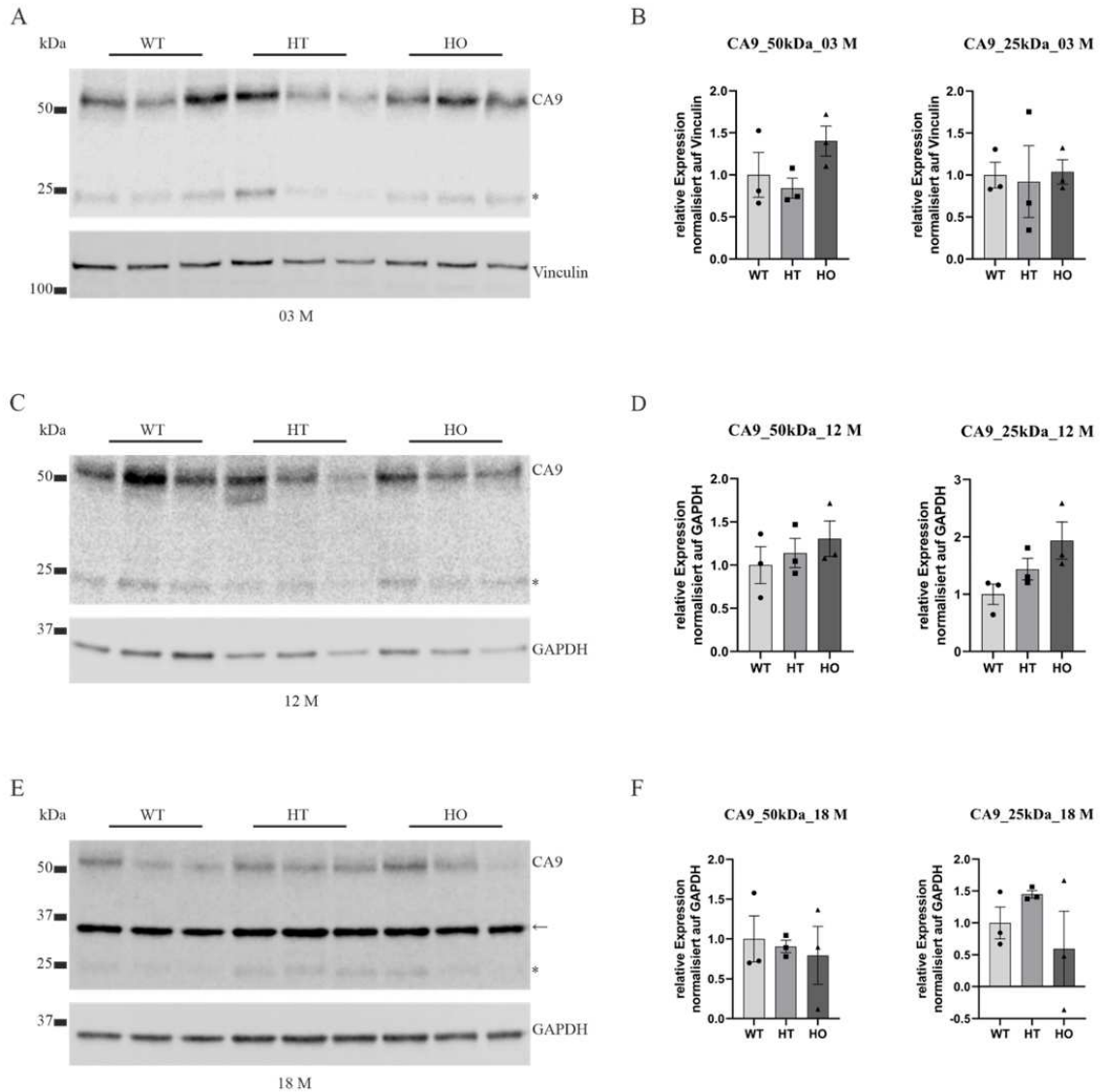


Abbildung 3.20: Western Blot von CA9 mit weiterer, unerwarteter Bande mit 25 kDa

A: Western Blot von CA9 mit 3 M Mäusen und Housekeeping Protein Vinculin als Ladekontrolle;

*: unerwartete Bande bei 25 kDa; erwartete Bande bei ca. 50 kDa

B: statistische Auswertung des Western Blots mit 3 M Mäusen; relative Expression normalisiert auf Vinculin; aufgrund der großen Streuung keine signifikanten Expressionsunterschiede innerhalb der Genotypen vorhanden

C: Western Blot von CA9 mit 12 M Mäusen und Housekeeping Protein GAPDH als Ladekontrolle; *: unerwartete Bande bei 25 kDa; erwartete Bande bei ca. 50 kDa

D: statistische Auswertung des Western Blots mit 12 M Mäusen; relative Expression normalisiert auf GAPDH; aufgrund der großen Streuung keine signifikanten Expressionsunterschiede innerhalb der Genotypen vorhanden

Ergebnisse

E: Western Blot von CA9 mit 18 M Mäusen und GAPDH als Ladekontrolle; →: markiert die Redetektion von GAPDH auf Höhe von 37 kDa

F: statistische Auswertung des Western Blots mit 18 M Mäusen; relative Expression normalisiert auf GAPDH; aufgrund der großen Streuung keine signifikanten Expressionsunterschiede innerhalb der Genotypen vorhanden

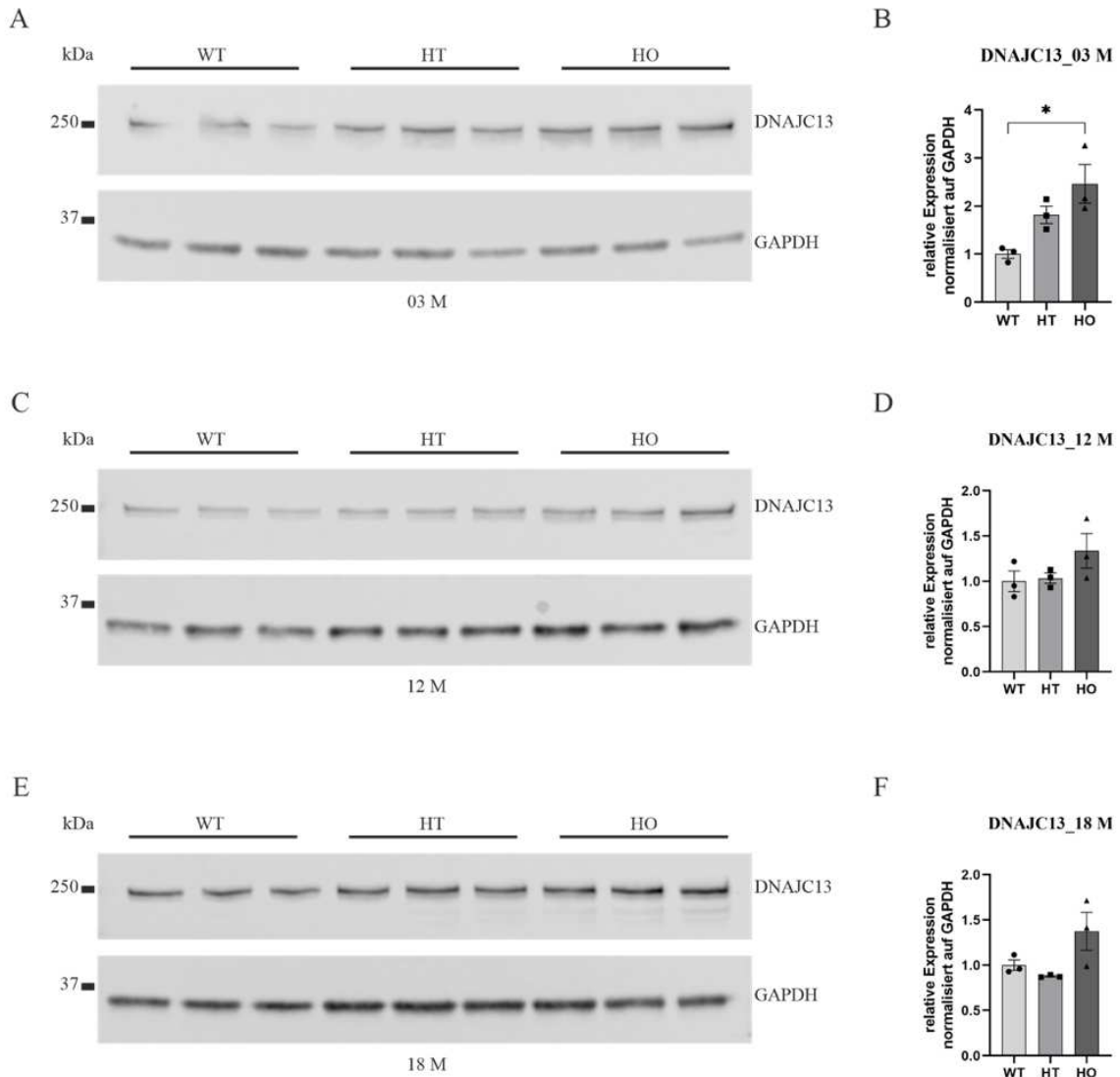
WT n=3; HT n=3; HO n=3; 3 M: 3 Monate; 12 M: 12 Monate; 18 M: 18 Monate; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.1.4 Expressionserhöhung der homozygoten SCA3 Mäuse im Western Blot von DNAJC13

Um die DNAJC13-Expression im Krankheitsverlauf von SCA3 zu bestimmen, wurden Western Blot Analysen mit Mäusen im Alter von 3, 12 und 18 Monaten durchgeführt (Abb. 3.21A, C, E). Es wurde ein rekombinant monoklonaler DNAJC13-Antikörper (Klon 11H13L5) gewählt. Die erwartete Bande für DNAJC13 wurde auf Höhe von 254 kDa in allen drei Western Blots und allen Genotypen detektiert. In den drei Western Blots wurde das *Housekeeping* Protein GAPDH gewählt, welches als Ladekontrolle diente. In Abb. 3.21A, C, E sind gleichmäßige Banden von GAPDH dargestellt, was für ein einheitliches Pipettieren der Proteinproben und somit gleiches Beladen der Taschen spricht. Für die statistischen Analysen wurde GAPDH für die Normalisierung verwendet (Abb. 3.21B, D, F). Bei den dreimonatigen homozygoten SCA3 KI Mäusen sind die detektierten Banden deutlich intensiver als die der wildtypischen Tiere (Abb. 3.21A). Dies zeigt sich auch in der statistischen Analyse (Abb. 3.21B). Ein signifikanter Expressionsunterschied von $p = 0,0289$ wurde zwischen wildtypischen und homozygoten 304Q Tieren berechnet, bei der die Expressionserhöhung auf Seiten der homozygoten Mäuse lag. Zwischen wildtypischen und heterozygoten bzw. heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Tieren konnten keine signifikanten Veränderungen gefunden werden. Der erwartete Effekt, dass die Expression bei den heterozygoten 304Q Mäuse halb so stark ist wie bei homozygoten Tieren, wurde durch die statistische Auswertung in Abbildung 3.21B bestätigt. In Abbildung 3.21C ist der Western Blot mit den 12 Monate alten Mäusen abgebildet. Bei diesem ist eine leicht aufsteigende Proteindetektion von

Ergebnisse

wildtypischen zu heterozygoten zu homozygoten 304Q Tieren zu erkennen, wobei die rechte Probe der homozygoten Maus deutlich stärker exprimiert ist. Diese sehr leichte Expressionssteigerung spiegelt sich in der statistischen Auswertung wider (Abb. 3.21D). Es konnten keine signifikanten Veränderungen analysiert werden, jedoch ist die stark exprimierte rechte Probe des homozygoten Tiers (HO) als Streuung in der HO-Säule zu sehen. Beim Western Blot (Abb. 3.21E) mit den ältesten Mäusen (18 M) ist es visuell schwierig, Expressions-Unterschiede innerhalb der Genotypen zu finden. Durch die statistische Berechnung (Abb. 3.21F) konnten keine signifikanten Expressionsveränderungen analysiert werden. Jedoch ist auch in den 18-monatigen Mäusen die Säule der homozygoten Mäuse höher; dies bedeutet, dass die Banden der homozygoten Tiere stärker exprimiert sind.



Ergebnisse

Abbildung 3.21: Western Blot von DNAJC13 mit signifikantem Expressionsunterschied in den dreimonatigen SCA3 Mäusen

A: Western Blot von DNAJC13 mit Mäusen im Alter von 3 Monaten und Housekeeping Protein GAPDH als Ladekontrolle; Banden der homozygoten Tiere sind deutlich intensiver gefärbt als die der anderen beiden Genotypen

B: statistische Auswertung des Western Blots mit dreimonatigen Mäusen; relative Expression normalisiert auf GAPDH; geringere Expression bei wildtypischen Mäusen im Vergleich homozygoten 304Q Tieren, wodurch eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ analysiert wurde

C: Western Blot von DNAJC13 mit zwölfmonatigen Mäusen und Housekeeping Protein GAPDH als Ladekontrolle; Banden der homozygoten Mäuse sind leicht intensiver in Bezug zu heterozygoten und wildtypischen Tieren

D: statistische Auswertung des Western Blots mit 12 Monate alten Mäusen; relative Expression normalisiert auf GAPDH; keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Genotypen gefunden

E: Western Blot von ACY3 mit Mäusen im Alter von 18 Monaten und Housekeeping Protein β -Aktin als Ladekontrolle

F: statistische Auswertung des Western Blots mit 18 Monate alten Mäusen; relative Expression normalisiert auf GAPDH; keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen wildtypischen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen gefunden

*WT n=3; HT n=3; HO n=3; *: Signifikanz von $p \leq 0,05$; 3 M: 3 Monate; 12 M: 12 Monate; 18 M: 18 Monate; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen*

3.4.1.5 Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den 12-monatigen Genotypen im Western Blot von HDJ2

Um die HDJ2-Expression im Krankheitsverlauf zu bestimmen, wurden Western Blot Analysen mit SCA3 KI Mäusen im Alter von 3, 12 und 18 Monate durchgeführt (Abb. 3.22A, C, E). Hierfür wurde ein monoklonaler HDJ2-Antikörper (Klon KA2A5.6) ausgesucht. Die erwartete Bande für HDJ2 bei einem Molekulargewicht von 45 kDa wurde bei allen drei Western Blots und allen Genotypen gefunden. In Abbildung 3.22A ist der Western Blot mit dreimonatigen Mäusen dargestellt; Vinculin als Ladekontrolle

Ergebnisse

zeigt eine einigermaßen gleichmäßige Beladung des Gels mit Proteinen. Zudem ist eine Redetektion von CA9 bei ca. 50 kDa zu erkennen (siehe Doppelpfeil in Abb. 3.22A). Es ist kaum möglich, Unterschiede in der Banden-Intensität der drei Genotypen auszumachen (Abb. 3.22A). Dies zeigt sich auch in der statistischen Auswertung (Abb. 3.22B) mit Normalisierung auf Vinculin und anschließend auf die entsprechenden Wildtyp-Proben, da hier alle Genotypen eine gleichmäßige Expression abbilden. Es konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen wildtypischen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen berechnet werden. In Abbildung 3.22C ist der Western Blot mit den zwölfmonatigen Mäusen zu erkennen; bei diesem Western Blot diente GAPDH als Ladekontrolle und auch hier ist die Beladung einigermaßen gleichmäßig. Die statistische Analyse (Abb. 3.22D) zeigt eine „relative Expression normalisiert auf GAPDH“ und bestätigt eine signifikante Reduktion von HDJ2 in heterozygoten 304Q Tieren (HT) auf wildtypische Tiere (WT) von $p = 0,0217$ und in homozygoten SCA3 KI Tieren (HO) auf HT von $0,0134$. Zwischen wildtypischen und homozygoten Tieren konnten Expressionsunterschiede von hoher Signifikanz mit $p = 0,0013$ berechnet werden (Abb. 3.22D). Im Western Blot mit den 18-monatigen Tieren (Abb. 3.22E) wurde β -Aktin als Ladekontrolle gewählt. HDJ2 weist bei diesem Mausalter keine Intensitätsunterschiede auf; dies spiegelt sich auch in der statistischen Auswertung (Abb. 3.23F) wider. Die relative Expression wurde auf das *Housekeeping* Protein β -Aktin und anschließend auf die Wildtypen normalisiert; hier wurden keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen gefunden.

Ergebnisse

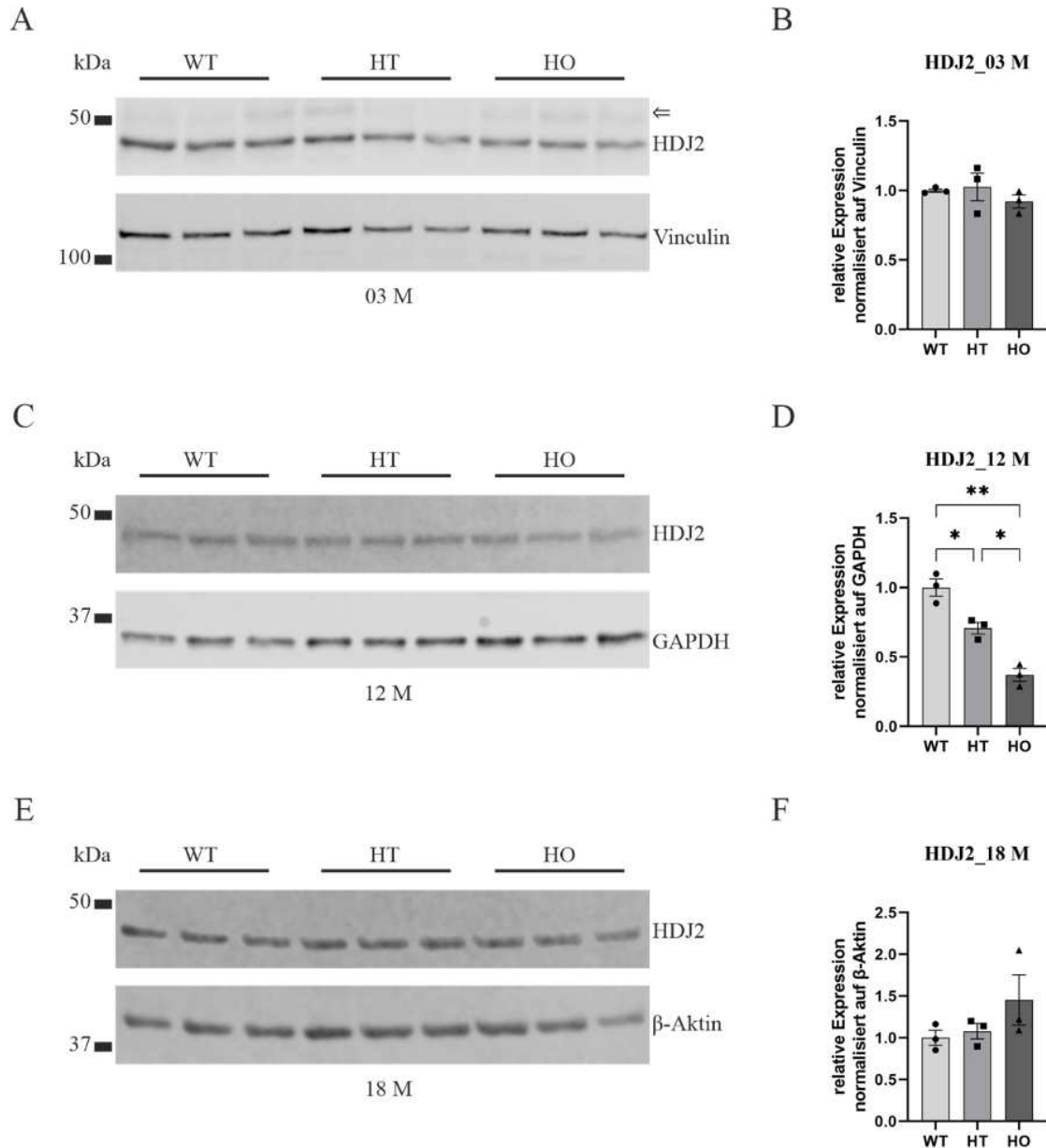


Abbildung 3.22: Western Blot von HDJ2 mit signifikanten Expressionsunterschieden in den 12-monatigen Mäusen

A: Western Blot mit Mäusen im Alter von 3 Monaten und Housekeeping Protein Vinculin als Ladekontrolle; \Rightarrow : markiert die Redetektion von CA9

B: statistische Auswertung des Western Blots mit dreimonatigen Mäusen; relative Expression normalisiert auf Vinculin

C: Western Blot mit 12-monatigen Mäusen und Housekeeping Protein GAPDH als Ladekontrolle

D: statistische Auswertung des Western Blots mit Mäusen im Alter von 12 Monaten; relative Expression normalisiert auf GAPDH; signifikante Expressionsunterschiede von $p \leq 0,05$

Ergebnisse

zwischen WT und HT, als auch HT und HO; hohe signifikanten Veränderungen bei WT und HO von $p \leq 0,01$

E: Western Blot mit Mäusen von 18 Monaten und Housekeeping Protein β -Aktin als Ladekontrolle

F: statistische Auswertung des Western Blots mit Mäusen im Alter von 18 Monaten; relative Expression normalisiert auf β -Aktin

WT n=3; HT n=3; HO n=3; *: Signifikanz von $p \leq 0,05$; **: hohe Signifikanz von $p \leq 0,01$; 3 M: 3 Monate; 12 M: 12 Monate; 18 M: 18 Monate; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.1.6 Keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen in der Proteinexpression von HSP105

Für die Bestimmung der Expression von HSP105 in der Krankheit SCA3 wurde eine Western Blot Analyse mit Mäusen im Alter von 18 Monaten durchgeführt (Abb. 3.23). Das vorhergesagte Molekulargewicht von 105 kDa für HSP105 wurde im Western Blot in allen Genotypen nachgewiesen. Es wurde ein monoklonaler HSP105-Antikörper (Klon EPR4576) gewählt. Als Ladekontrolle diente GAPDH; es sind gleichmäßige Banden von GAPDH in Abbildung 3.23A zu sehen, was für ein einheitliches Beladen des Western Blots spricht. Die Banden von HSP105 sind im Western Blot (Abb. 3.23A) schwach zu erkennen. Die statistische Auswertung (Abb. 3.23B) mit Normalisierung auf GAPDH und anschließend auf die Wildtypen zeigt, dass es keine signifikanten Veränderungen zwischen den Genotypen gibt, jedoch lässt sich ein leichter Expressionsabfall von wildtypischen zu heterozygoten zu homozygoten Mäusen feststellen.

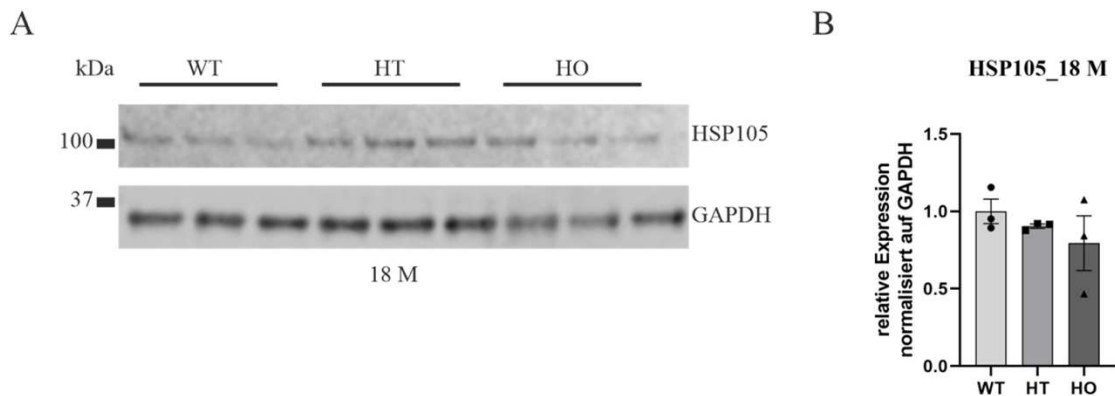


Abbildung 3.23: Western Blot von HSP105 mit 18 M Mäusen mit WT, HT, HO

A: Western Blot mit 18-monatigen Mäusen und Housekeeping Protein GAPDH als Ladekontrolle

B: statistische Auswertung des Western Blots mit 18 M Mäusen; relative Expression normalisiert auf GAPDH

WT n=3; HT n=3; HO n=3; 18 M: 18 Monate; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.1.7 Ansteigende Expressionserhöhung in 18-monatigen Mäusen im Western Blot von HSP27

Um die Expression von HSP27 im Krankheitsverlauf zu bestimmen, wurden Western Blot Analysen mit Mäusen im Alter von 3, 12 und 18 Monaten durchgeführt (Abb. 3.24A, C, E). Die erwartete Bande für HSP27 bei einem Molekulargewicht von 27 kDa wurde bei allen drei Western Blots und allen Genotypen gefunden. Für die Western Blot Methode wurde der monoklonale HSP27-Antikörper (Klon F-4) gewählt. Der Western Blot mit dreimonatigen Mäusen ist in Abbildung 3.24A zu erkennen; Vinculin mit 116 kDa als Ladekontrolle zeigt eine einigermaßen gleichmäßige Beladung des Gels mit Proteinen. Die Bande von HSP27 hat im Durchschnitt schwache Intensitäten, jedoch fällt die linke Probe der heterozygoten SCA3 KI Tiere mit ihrer starken Expression auf und die Banden der homozygoten 304Q Mäusen scheinen leicht stärker exprimiert zu sein als die Banden der heterozygoten SCA3 KI und wildtypischen Mäuse. Die statistische Auswertung (Abb. 3.24B) von HSP27 mit Normalisierung auf Vinculin und anschließend auf die entsprechenden Wildtyp-Proben zeigt keine signifikanten Expressionsunterschiede, jedoch eine leichte Expressionserhöhung von wildtypischen zu homozygoten Maus-Proteinproben. In Abbildung 3.24C ist der Western Blot mit 12 Monate alten Mäusen abgebildet, bei dem GAPDH mit 37 kDa als Ladekontrolle eingesetzt wurde. Die Banden von HSP27 weisen innerhalb der Genotypen unterschiedliche Intensitäten auf. Bei den wildtypischen Proben liegt dies wahrscheinlich an der Beladung des Western Blots, da auch die GAPDH-Banden der wildtypischen Tiere deutlich intensiver sind. Die relative Expression des Western Blots (Abb. 3.24D) mit zwölfmonatigen Mäusen, normalisiert auf GAPDH und anschließend auf die

Ergebnisse

wildtypischen Mäuse, zeigt keine signifikanten Expressionsunterschiede, aber hohe Ausreißer bei den wildtypischen Tieren; dies spiegelt sich auch in der statistischen Analyse in Abbildung 3.24C wider. In Abbildung 3.24E ist der Western Blot mit 18 Monate alten Mäusen dargestellt. Vinculin konnte auf Höhe von 116 kDa nachgewiesen werden, welche eine gleichmäßige Beladung des Blottes zeigt. HSP27 konnte auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts von 27 kDa detektiert werden, es zeigt sich eine Doppelbande bei der mittleren Probe der heterozygoten SCA3 KI Mäuse; könnte für eine Isoform von HSP27 sprechen (siehe Einfachpfeil in Abb. 3.24E). Anhand der statistischen Auswertung (Abb. 3.24F), bei welcher eine Normalisierung auf das *Housekeeping* Protein Vinculin und auf die Wildtypen vorgenommen wurde, wurden signifikante Expressionserhöhungen zwischen wildtypischen und heterozygoten 304Q Tieren von $p = 0,049$ und zwischen wildtypischen und homozygoten SCA3 KI Mäusen von $p = 0,0125$ gefunden. Die Expressionsunterschiede zwischen heterozygoten und homozygoten Tieren mit 304 Glutaminen wurden mit $p = 0,2789$ berechnet, wodurch keine signifikanten Veränderungen zwischen diesen beiden Genotypen im Alter von 18 Monaten vorliegen.

Ergebnisse

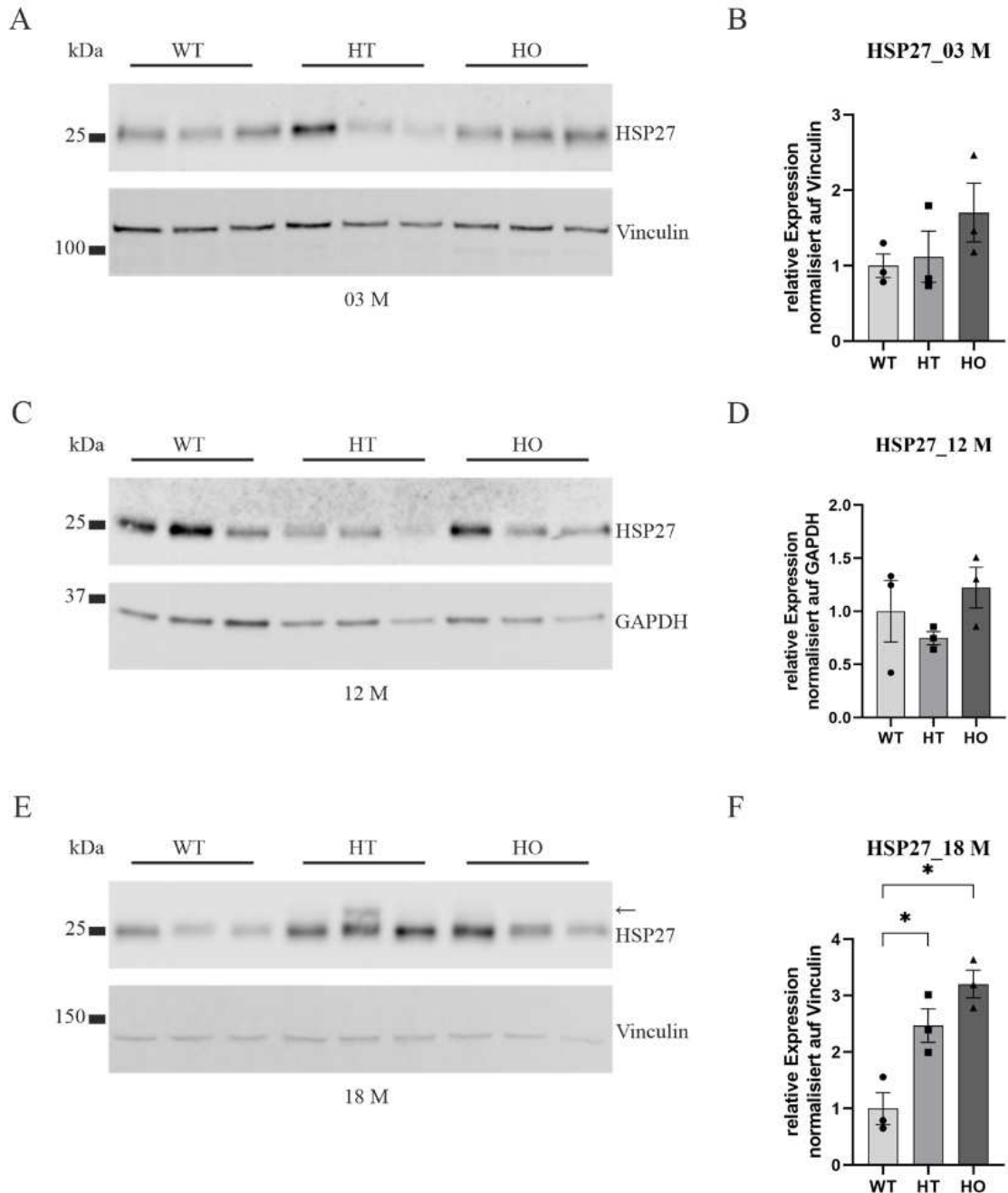


Abbildung 3.24: Western Blot von HSP27 mit signifikanten Expressionsunterschieden in den 18-monatigen Mäusen

A: Western Blot mit Mäusen im Alter von 3 Monaten und Housekeeping Protein Vinculin als Ladekontrolle

B: statistische Auswertung des Western Blots mit dreimonatigen Mäusen; relative Expression normalisiert auf Vinculin

C: Western Blot mit 12-monatigen Mäusen und Housekeeping Protein GAPDH als Ladekontrolle

Ergebnisse

D: statistische Auswertung des Western Blots mit Mäusen im Alter von 12 Monaten; relative Expression normalisiert auf GAPDH

E: Western Blot mit Mäusen von 18 Monaten und Housekeeping Protein Vinculin als Ladekontrolle

F: statistische Auswertung des Western Blots mit Mäusen im Alter von 18 Monaten; relative Expression normalisiert auf Vinculin; signifikante Expressionsunterschiede zwischen heterozygoten und wildtypischen 304Q Tieren und zwischen wildtypischen und homozygoten Tieren von jeweils $p \leq 0,05$

*WT n=3; HT n=3; HO n=3; *: Signifikanz von $p \leq 0,05$; 3 M: 3 Monate; 12 M: 12 Monate; 18 M: 18 Monate; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen*

3.4.1.8 Keine Expressionsunterschiede zwischen den drei Genotypen im Western Blot von HSPA2

Um die Expression von HSPA2 im Verlauf der Krankheit SCA3 zu bestimmen, wurden Western Blot Analysen mit 3-, 12-, und 18-monatigen Mäusen durchgeführt (Abb. 3.25A, C, E). Das vorhergesagte Molekulargewicht von 70 kDa für HSPA2, einem Hitzeschockprotein der HSP70 Familie, wurde in allen drei Western Blots in allen Genotypen nachgewiesen. Zur Analyse wurde ein monoklonaler HSPA2-Antikörper (Klon EPR4596) gewählt. Die *Housekeeping* Proteine GAPDH (Abb. 3.25A, C) und β -Aktin (Abb. 3.25E) dienten in den drei Western Blots als Ladekontrolle und zeigen eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Proteinen. Später wurden GAPDH (Abb. 3.25B, D) und β -Aktin (Abb. 3.25F) für die statistische Auswertung verwendet, um die relative Expression des Western Blots erst auf das entsprechende *Housekeeping* Protein und dann auf die entsprechenden Wildtypen zu normalisieren. In Abbildung 3.25A ist der Western Blot mit den 3 Monate alten Mäusen zu erkennen. HSPA2 wurde auf der Höhe von ca. 70 kDa detektiert und es sind kaum Intensitätsunterschiede bei den Banden zu sehen. Dies spiegelt sich auch in der statistischen Analyse wider, bei der keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen berechnet wurden. Wie bei den dreimonatigen Mäusen wurde die Bande von HSPA2 mit 12 Monate alten Mäusen (Abb. 3.25C) auch auf der erwarteten Höhe von ca. 70 kDa detektiert. Ferner sind hier

Ergebnisse

Unterschiede in der Banden-Intensität kaum zu sehen. In der statistischen Auswertung, die in Abbildung 3.25D zu sehen ist, sind die Säulen von wildtypischen und heterozygoten 304Q Tieren ungefähr auf gleicher Höhe; die vertikale Säule der homozygoten SCA3 KI Mäuse ist etwas höher, was für eine stärkere Expression in den 304Q/304Q Tieren spricht. Jedoch liegen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen vor. Der Western Blot mit den Mäusen von 18 Monaten (Abb. 3.25E) zeigt wie in den Western Blots mit den jüngeren Tieren (Abb. 3.25A, C) ebenfalls keine Unterschiede in der Expression zwischen wildtypischen, heterozygoten, homozygoten SCA3 KI Mäusen. In Abbildung 3.25F ist die statistische Auswertung dargestellt und zeigt anhand eines Säulendiagramms, dass – wie auch beim Western Blot mit 12 Monate alten Mäusen – eine leichte Expressionserhöhung bei homozygoten Mäusen mit 304 Glutaminen vorliegt, aber auch hier keine signifikanten Veränderungen berechnet wurden.

Ergebnisse

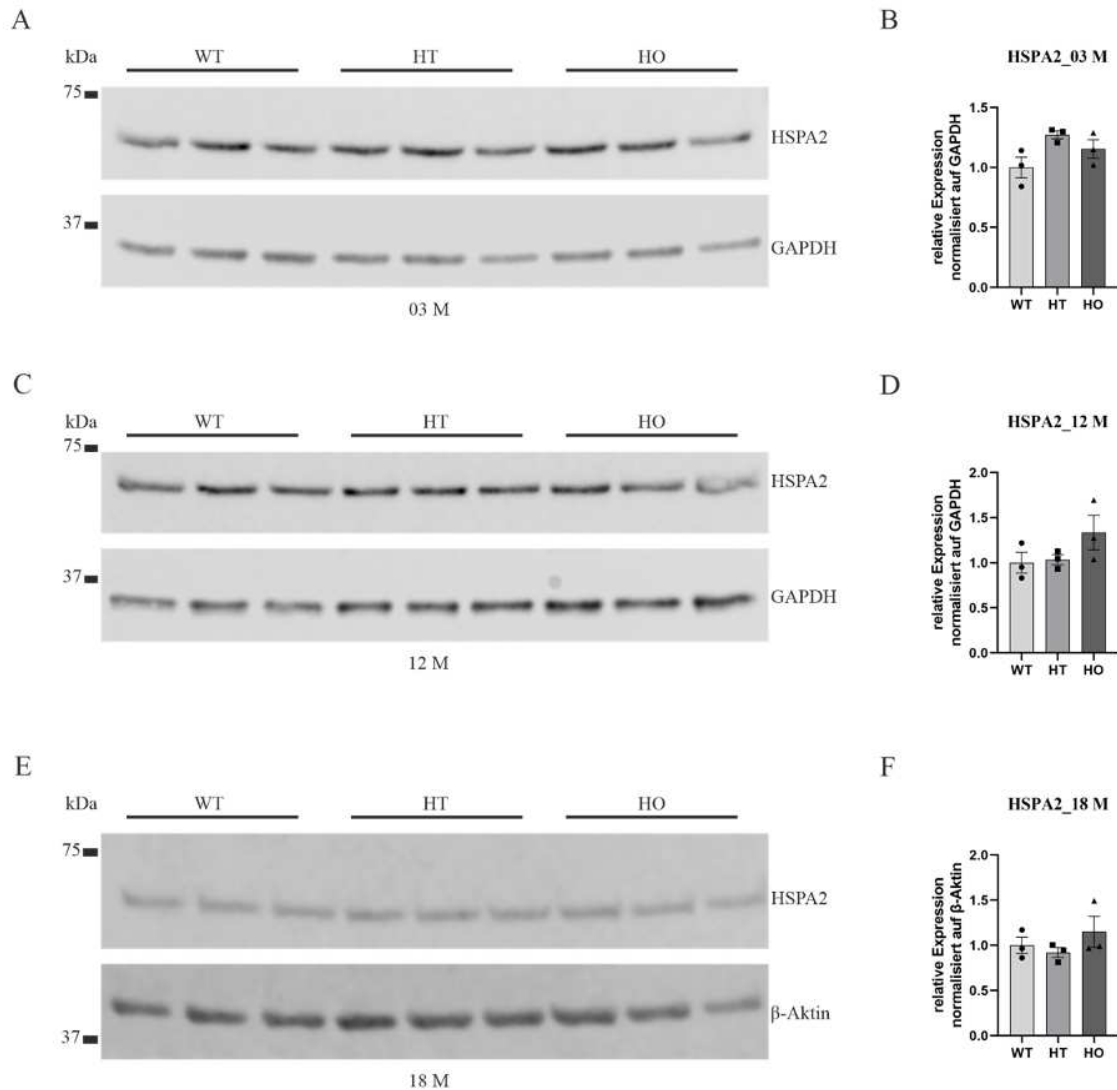


Abbildung 3.25: Western Blot von HSPA2 ohne signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen

A: Western Blot mit dreimonatigen Mäusen und Housekeeping Protein GAPDH als Ladekontrolle

B: statistische Auswertung des Western Blots mit 3 Monate alten Mäusen; relative Expression normalisiert auf GAPDH

C: Western Blot mit Mäusen im Alter von 12 Monaten und Housekeeping Protein GAPDH als Ladekontrolle

D: statistische Auswertung des Western Blots mit 12-monatigen Mäusen; relative Expression normalisiert auf GAPDH

E: Western Blot mit Mäusen von 18 Monaten und Housekeeping Protein β -Aktin als Ladekontrolle

F: statistische Auswertung des Western Blots mit 18 Monate alten Mäuse; relative Expression normalisiert auf β -Aktin

WT n=3; HT n=3; HO n=3; 3 M: 3 Monate; 12 M: 12 Monate; 18 M: 18 Monate; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.2 Aggregationsunterschiede innerhalb der 18-monatigen Genotypen mit dem Filter Trap Verfahren

Im kommenden Abschnitt sind die Filtertraps mit Proteinproben der SCA3 Knock In (KI) Mäuse mit 304 Glutaminen im Alter von 18 Monaten dargestellt (Haas et al., 2022). Bei den Proteinproben handelt es sich um Homogenate des ganzen Gehirns. Es wurden jeweils drei Wildtypen, heterozygote und homozygote 304Q KI Mäuse ausgesucht. Es ist bei jeder Abbildung in A die Aufnahme des Filter Traps, bei dem in der ersten Reihe der Wildtyp (WT), in zweiter Reihe die heterozygoten (HT) und in dritter Reihe die homozygoten (HO) SCA3 KI Mäuse zu sehen sind, präsentiert. In B ist die Statistik mit relativer Expression der drei Genotypen zu erkennen. Signifikante Veränderungen sind entsprechend der Grafiken mit Sternchen dargestellt.

3.4.2.1 Erhöhte ATXN3-Aggregationsrate zwischen Wildtyp und homozygoten SCA3 KI Mäusen und ubiquinierte ATXN3-positive Aggregate

Es ist bekannt, dass bei SCA3 eine ATXN3-Aggregation stattfindet, auch wenn die Rolle dieser Aggregation im pathologischen Mechanismus der SCA3 noch unklar ist (McLoughlin et al., 2020; H. L. Paulson et al., 2017). In folgender Abbildung 3.26 ist der Filter Trap, der mit einem Atxn3-Antikörper (Klon 1H9) gefärbt wurde, abgebildet. Im Filtertrap (Abb. 3.26A) ist zu erkennen, dass die Intensität der Antikörperfärbung in den wildtypischen und heterozygoten Mäusen deutlich schwächer ist als die Intensität in den homozygoten Tieren, was für eine stärkere Aggregation in den homozygoten SCA3 KI Mäusen spricht. Die statistische Analyse in Abbildung 3.26B zeigt eine signifikante

Ergebnisse

höhere Aggregationsrate zwischen WT und SCA3 KI HO Mäusen von $p = 0,0433$. Dies entspricht $p \leq 0,05$ mit *.

Da bereits bekannt ist, dass bei SCA3 die Aggregate des Erkrankungsproteins ubiquitiniert sind, wurde ein Filter Trap mit dem polyklonalen Ubiquitin-Antikörper durchgeführt, um zu sehen, ob eine höhere Aggregatbildung in den homozygoten SCA3 KI Mäusen vorliegt (Abb. 3.27). Wie die Abbildung 3.27A zeigt, konnten in jedem Genotyp unterschiedlich starke Banden mit einer starken Streuung nachgewiesen werden. Somit konnten auch in der statistischen Analyse (Abb. 3.27B) keine signifikanten Veränderungen zwischen den verschiedenen Genotypen der Tiere gefunden werden. Allerdings zeigen zwei der drei homozygoten 304Q Tiere eine stärkere Ubiquitinierung in Bezug zu wildtypischen Mäusen (Abb. 3.27A).

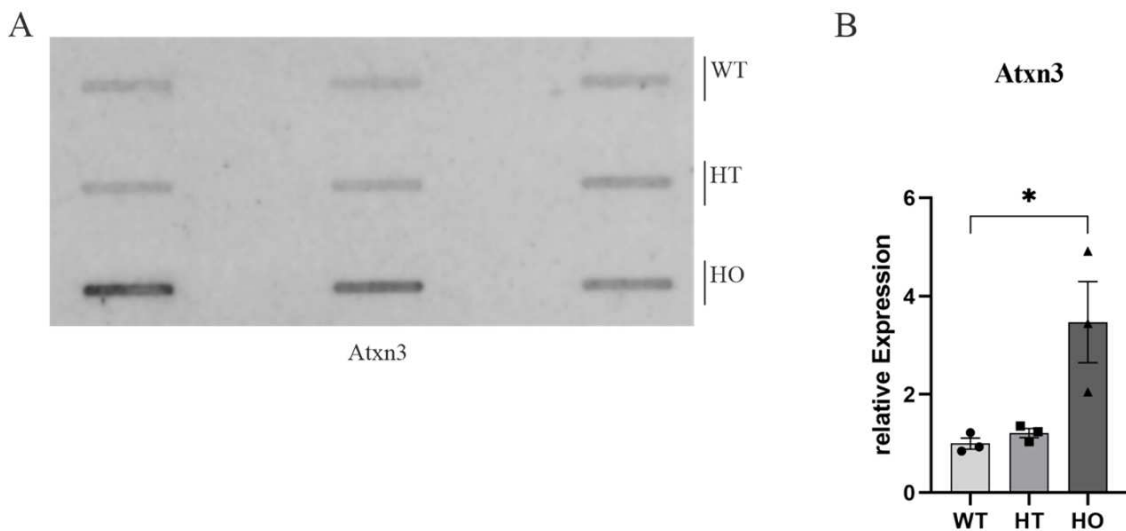


Abbildung 3.26: Beim *Atxn3* Filter Trap Signifikanz zwischen Wildtyp und homozygoten SCA3 KI Mäusen

A: Filter Trap von *Atxn3* mit jeweils drei Wildtypen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen; die drei Proben der homozygoten Tiere sind deutlich stärker gefärbt als bei den anderen zwei Genotypen

B: statistische Auswertung mit relativer Expression normalisiert auf die Wildtypen; zwischen den vertikalen Säulen von Wildtyp und homozygoten SCA3 Genotyp liegt eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ mit * vor.

WT $n=3$; HT $n=3$; HO $n=3$; *: $p \leq 0,05$; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

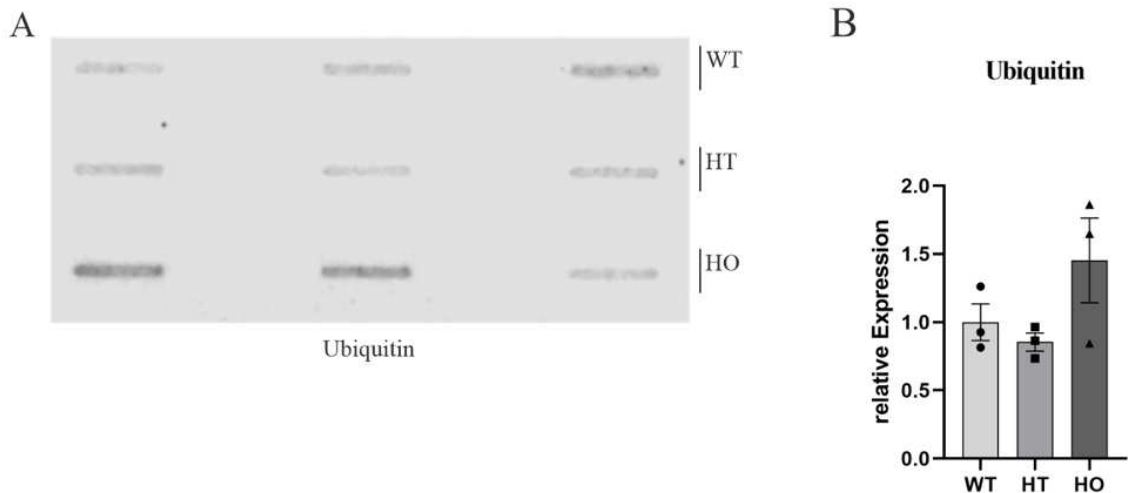


Abbildung 3.27: Keine Signifikanz im Filter Trap von Ubiquitin aufgrund der starken Streuung

A: Filter Trap von Ubiquitin mit jeweils drei Wildtypen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen; die 3 Proben zeigen keine erhöhte Färbung im Vergleich der Genotypen der Tiere

B: statistische Auswertung mit relativer Expression normalisiert auf die Wildtypen; es ist eine Streuung vor allem bei den Säulen der Wildtypen und homozygoten Tieren zu sehen, wodurch keine Signifikanz berechnet werden konnte

WT n=3; HT n=3; HO n=3; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.2.2 Signifikante Aggregationsbildung von ACY3 bei den homozygoten SCA3 Mäusen

Um zu überprüfen, ob sich bei ACY3 Aggregate bei 18-monatigen SCA3 KI Mäusen bilden, wurde ein Filter Trap mit diesem Alter von Tieren durchgeführt. Beim Filter, welcher mit einem polyklonalen ACY3-Antikörper gefärbt wurde, ist in Abbildung 3.28A ein deutlicher Unterschied in der Antikörperfärbung bei den homozygoten Tieren mit 304Q/304Q im Vergleich zu den heterozygoten SCA3 KI Mäusen zu sehen. Es scheint, dass die wildtypischen Mäuse etwas mehr ACY3-spezifische Aggregate aufweisen als die heterozygoten Tiere. Allerdings wird ersichtlich, dass die Bindung des Antikörpers an die vorhandenen Aggregate insgesamt sehr schwach war. Durch die

statistische Analyse wurde eine Signifikanz von $p = 0,019$ zwischen den homozygoten und heterozygoten Genotypen nachgewiesen (Abb. 3.28B).

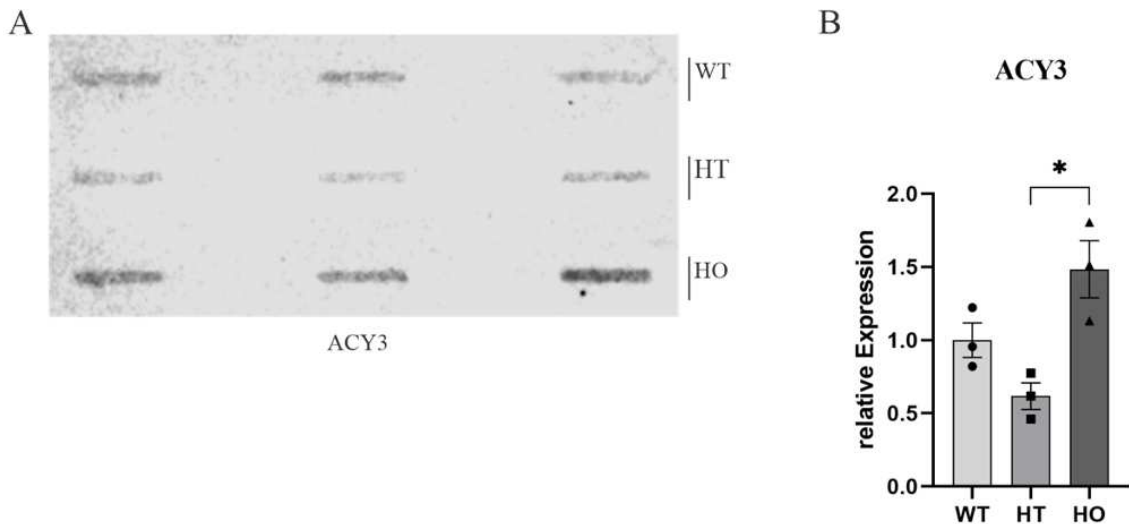


Abbildung 3.28: Erhöhte Aggregationsbildung bei homozygoten Tieren im Vergleich zu heterozygoten Mäusen im Filter Trap von ACY3

A: Filter Trap von ACY3 mit jeweils drei Wildtypen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen; die 3 Proben von homozygoten SCA3 KI Mäusen zeigen eine erhöhte Färbung im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen

B: statistische Auswertung mit relativer Expression normalisiert auf die Wildtypen; Signifikanz von $p \leq 0,05$ zwischen homozygoten und heterozygoten Genotyp

WT $n=3$; HT $n=3$; HO $n=3$; *: $p \leq 0,05$; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.2.3 Erhöhte Unterschiede in der Antikörperfärbung zwischen den einzelnen Genotypen beim Filter Trap mit CA9

Um herauszufinden, ob es zu einer Aggregationsbildung bei CA9 kommt, wurde ein Filter Trap mit 304Q Mäusen im Alter von 18 Monaten durchgeführt. Im abgebildeten Filter Trap (Abb. 3.29A), bei dem ein polyklonaler CA9-Antikörper verwendet wurde, sind deutliche Unterschiede in der Antikörperfärbung bei den heterozygoten und homozygoten 304Q KI Mäusen in Bezug auf Wildtyp-Tiere zu sehen. Die statistische Analyse zeigt deutliche Signifikanzen beim Vergleich zwischen den einzelnen Genotypen (Abb. 3.29B). Somit konnte eine Signifikanz zwischen Wildtyp (WT) und

Ergebnisse

heterozygoten 304Q KI Mäusen (HT) von $p = 0,0434$ als auch zwischen HT und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen (HO) von $p = 0,0176$ gefunden werden. Zudem liegt eine hohe Signifikanz von $p = 0,0022$ zwischen WT und HO KI Mäusen vor.

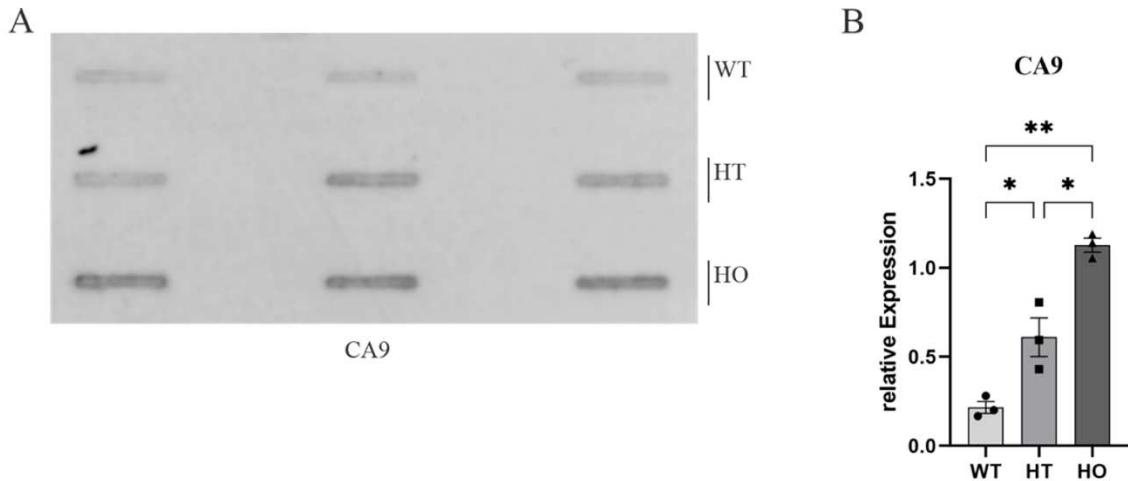


Abbildung 3.29: Hohe Aggregation bei homozygoten SCA3 KI Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen

A: Filter Trap von CA9 mit jeweils drei Wildtypen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen; die drei Proben zeigen eine erhöhte Färbung aufsteigend von Wildtypen zu heterozygoten zu homozygoten Tieren

B: statistische Auswertung mit relativer Expression normalisiert auf die Wildtypen; Signifikanz von $p \leq 0,05$ zwischen Wildtypen und heterozygoten Genotyp als auch zwischen heterozygoten Tieren und homozygoten SCA3 Mäusen; hohe Signifikanz von $p \leq 0,01$ zwischen Wildtypen und homozygoten 304Q KI Mäusen

WT $n=3$; HT $n=3$; HO $n=3$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.2.4 Keine signifikanten Veränderungen zwischen den Genotypen im Filter Trap von DNAJC13

Um die Aggregationsbildung von DNAJC13 in SCA3 KI Mäusen zu beobachten, wurde ein Filter Trap mit wildtypischen, heterozygoten und homozygoten 304Q Tieren im Alter von 18 Monaten durchgeführt. Beim Filter Trap (Abb. 3.30) mit dem DNAJC13-

Ergebnisse

Antikörper (Klon 11H13L5) wurden keine Unterschiede in der Aggregation zwischen der drei Genotypen festgestellt (Abb. 3.30A). Die ganz rechte Proteinprobe der homozygoten 304Q KI Maus ist deutlich intensiver gefärbt als bei den restlichen Proben vom selben Genotyp. Die statistische Analyse bestätigt die hohe Varianz der Proben in den unterschiedlichen Genotypen (Abb. 3.30B).

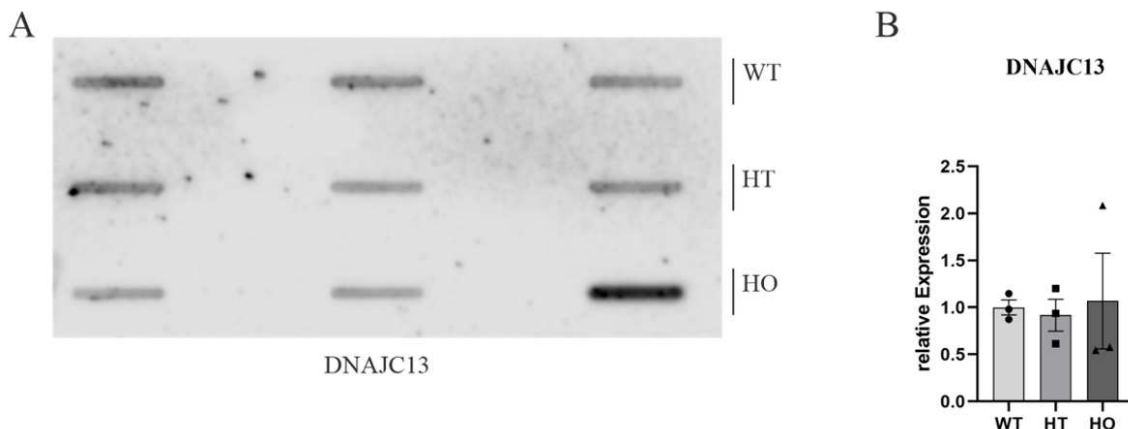


Abbildung 3.30: Filter Trap von DNAJC13 ohne signifikante Veränderungen zwischen den einzelnen Genotypen

A: Filter Trap von DNAJC13 mit jeweils drei Wildtypen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen; die drei Proben zeigen innerhalb der Genotypen deutliche Unterschiede in der Färbung

B: statistische Auswertung mit relativer Expression normalisiert auf die Wildtypen; es ist eine Streuung bei der Säule der homozygoten Tiere zu sehen; es wurden keine signifikanten Veränderungen berechnet

WT n=3; HT n=3; HO n=3; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.2.5 Leichte Erhöhung der Aggregationsmenge von wildtypischen zu homozygoten Mäusen im Filter Trap von HDJ2

Es wurde ein Filter Trap mit wildtypischen, heterozygoten und homozygoten 304Q Mäusen durchgeführt, um bei HDJ2 die Aggregationsbildung in SCA3 KI Mäusen in Bezug zu Kontrolltieren zu analysieren. In Abbildung 3.31 ist der Filter Trap mit dem HDJ2-Antikörper (Klon KA2A5.6) zu erkennen. Es sind kaum Unterschiede in der

Ergebnisse

Färbung zwischen den einzelnen Genotypen zu sehen, jedoch eine leicht stärkere Färbung bei den homozygoten SCA3 KI Tieren (Abb. 3.31A). Dies spiegelt sich in der statistischen Auswertung (Abb. 3.31B) wider; hier wurde eine Aggregationssteigerung von wildtypischen zu heterozygoten zu homozygoten Tieren analysiert. Dennoch wurden keine signifikanten Veränderungen berechnet.

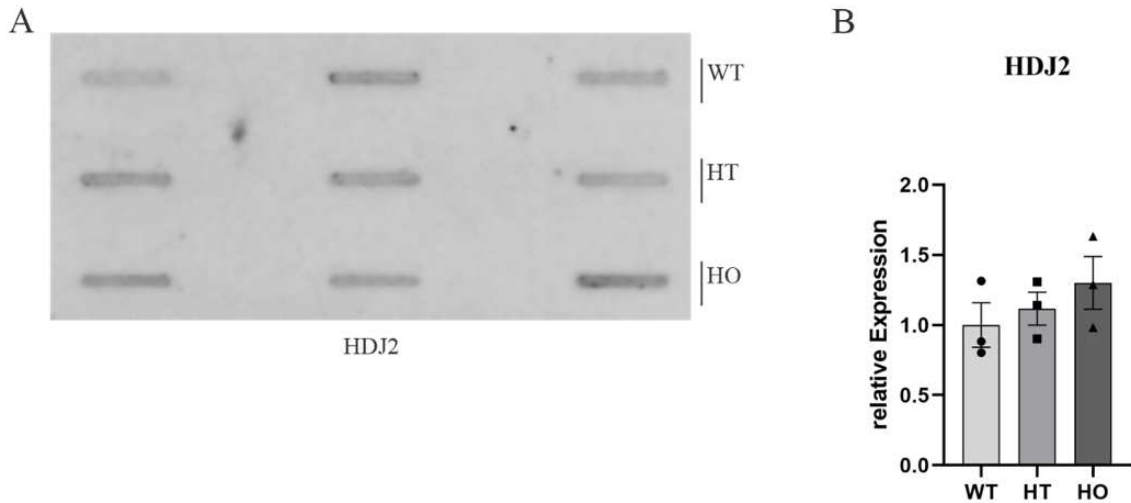


Abbildung 3.31: Filter Trap von HDJ2 ohne signifikante Veränderungen zwischen den einzelnen Genotypen

A: Filter Trap von HDJ2 mit jeweils drei Wildtypen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen; die Proben sind fast gleich gefärbt, aber bei den homozygoten Proben ist die Färbung etwas intensiver

B: statistische Auswertung mit relativer Expression normalisiert auf die Wildtypen; es wurden keine signifikanten Veränderungen berechnet

WT n=3; HT n=3; HO n=3; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.2.6 Signifikante Aggregationsbildung von homozygoten 304Q Tieren in Bezug zu Kontrolltieren im Filter Trap von HSP105

Um den vermehrten Einbau von HSP105 in ATXN3 Aggregaten in heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen zu analysieren, wurde ein Filter Trap mit 18-monatigen heterozygoten und homozygoten 304Q Tieren in Bezug zu wildtypischen Mäusen durchgeführt. Im Filter Trap mit dem HSP105-Antikörper (Klon EPR4576) sind die

Ergebnisse

Proben der drei Genotypen sehr schwach gefärbt, so dass diese kaum zu erkennen sind. Trotzdem sind die Proben von den Wildtypen bis zu den homozygoten Tieren mit 304Q aufsteigend gefärbt (Abb. 3.32A). In Abbildung 3.32B ist die statistische Auswertung mit Normalisierung auf die wildtypischen Proben dargestellt. Die stärkere Färbung der homozygoten SCA3 KI Mäuse in Abbildung 3.32A stellt sich in der Analyse als signifikante Aggregationsbildung mit $p = 0,0112$ in Bezug zu den Wildtypen dar. Die erwartete stärkere Aggregation der heterozygoten Tiere im Vergleich zu den wildtypischen Mäusen ist in der statistischen Auswertung ebenfalls zu sehen, jedoch ohne Signifikanz mit $p = 0,0654$ (Abb. 3.32B).

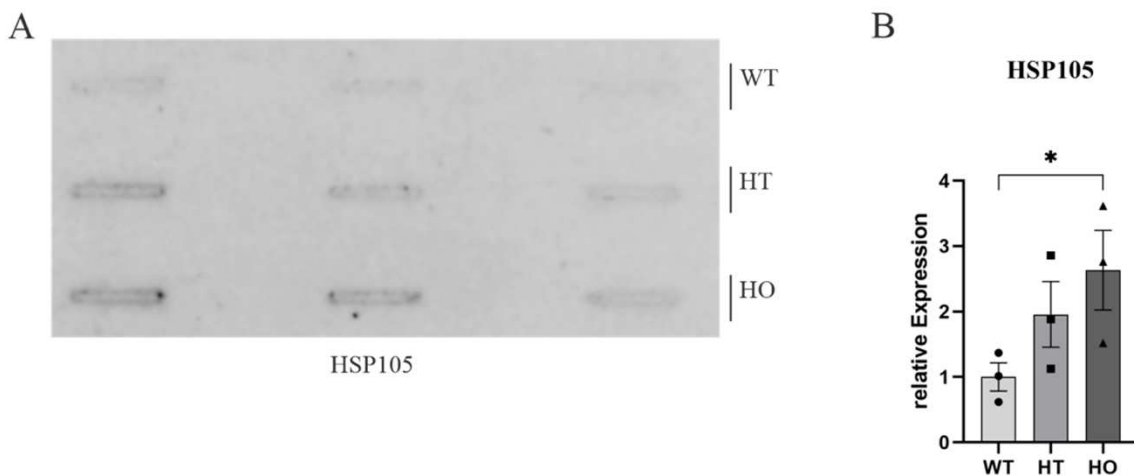


Abbildung 3.32: Filter Trap von HSP105 mit signifikanter Veränderung zwischen wildtypischen Mäusen und homozygoten 304Q Tieren

A: Filter Trap von HSP105 mit jeweils drei Wildtypen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen; die Proben sind schwach gefärbt, aber die schwache Färbung wird von wildtypischen über heterozygoten zu homozygoten Mäusen intensiver

B: statistische Auswertung mit relativer Expression normalisiert auf die Wildtypen; Signifikanz von $p \leq 0,05$ zwischen Wildtypen und homozygoten Mäusen

WT $n=3$; HT $n=3$; HO $n=3$; *: $p \leq 0,05$; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

3.4.2.7 Keine signifikanten Veränderungen zwischen den drei Genotypen im Filter Trap von HSP27

Um die Aggregationsbildung von HSP27 in SCA3 KI Mäusen zu beobachten, wurde ein Filter Trap mit wildtypischen, heterozygoten und homozygoten 304Q Tieren im Alter von 18 Monaten durchgeführt. Im Filter Trap (Abb. 3.33A) mit dem HSP27-Antikörper (Klon F-4) sind die neun Proben zu sehen; innerhalb der Genotypen sind die Proben unterschiedlich stark gefärbt. Vor allem bei den heterozygoten Tieren sind große Intensitätsunterschiede zu erkennen. In der statistischen Auswertung in Abbildung 3.33B sind die deutlichen Intensitätsfärbungen im Filter Trap anhand der Ausreißer (siehe Punkte, Quadrate und Dreiecke in Abb. 3.33B) auszumachen, weshalb keine signifikanten Veränderungen berechnet werden konnten.

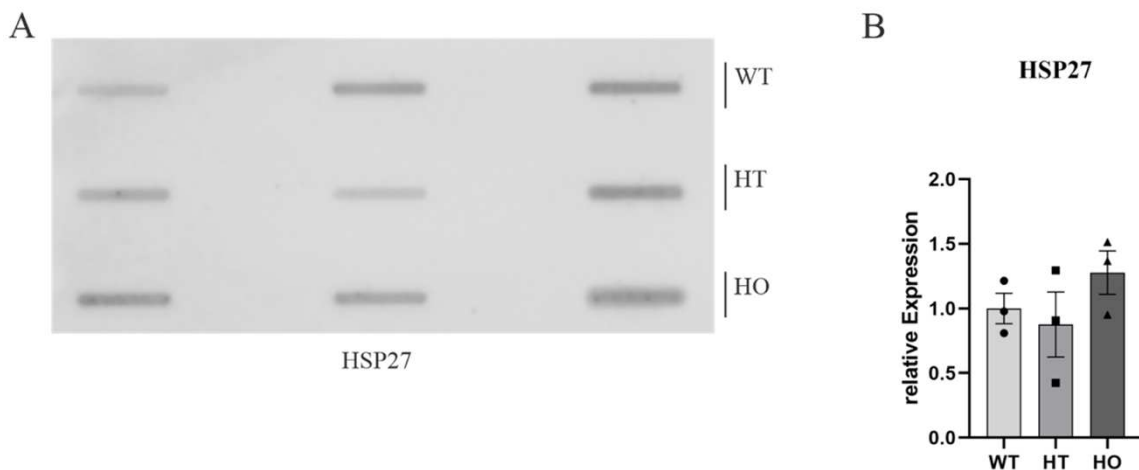


Abbildung 3.33: Filter Trap von HSP27 ohne signifikante Veränderungen zwischen den drei Genotypen

A: Filter Trap von HSP27 mit jeweils drei Wildtypen, heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen; die Proben sind innerhalb der Genotypen unterschiedlich stark gefärbt

B: statistische Auswertung mit relativer Expression normalisiert auf die Wildtypen

WT n=3; HT n=3; HO n=3; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen;

HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen

*WT n=3; HT n=3; HO n=3; **: $p \leq 0,01$; WT: Wildtyp; HT: heterozygote SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen; HO: homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen*

3.4.3 Immunhistochemische Färbungen als Beweis der Aggregation im Gehirn

Als dritten Proteinnachweis wurde die Immunhistochemie gewählt. Je nach Protein liegen die immunhistochemischen Färbungen mit 3, 12 und 18 Monate alten SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) vor. Es wurde für jedes Protein ein homozygoten 304Q KI Tier und ein Wildtyp-Tier im Sagittalschnitt ausgewählt. Vor allem die anatomischen Areale Cerebellum (Cb) mit Purkinje-Zellen (PZ) und Tiefen Kleinhirnkernen (NC), Gyrus Dentatus (GD) aus dem Hippocampus (Hc) und Pons wurden näher betrachtet. Dazu wurden Ausschnitte mit einem Maßstab von 20 μm (siehe schwarzer Balken) gewählt. Für die Region der Purkinje-Zellen im Cerebellum wurden die drei Schichten – Stratum granulosum, Stratum ganglionare und Stratum moleculare – analysiert und in den Abbildungen dargestellt. Zudem wurden Aufnahmen von den Tiefenkleinhirnkernen und Pons abgebildet. Für den Bereich des Gyrus Dentatus aus dem Hippocampus wurden teilweise Aufnahme mit dem ganzen Gyrus Dentatus als auch mit einem Ausschnitt gezeigt. Teilweise wurden Pfeile in die Abbildungen hinzugefügt, um bestimmte Muster zu zeigen. In jeder Abbildung wurde ein Maßstab von 20 μm verwendet.

3.4.3.1 Aggregate im Gehirn von homozygoter Maus bei Atxn3 Färbung

Für Atxn3 mit dem Antikörper 1H9 wurden Immunhistochemie-Nachweise mit drei-, 12- und 18-monatigen Mäuse durchgeführt, was in der untenstehenden Abbildung 3.35 zu sehen ist. Die Purkinje-Zellen (Cb_PZ), welche im Cortex cerebelli lokalisiert sind und zum GABAergen Neuronentyp gehören, sind in jeder Altersstufe und bei jedem Genotyp hell gefärbt. Die Zellstrukturen in den Schichten Stratum granulosum und Stratum moleculare sind etwas heller gefärbt als die Purkinje-Zellen in ihrer Schicht Stratum ganglionare. Bei der Färbung des homozygoten zwölfjährigen SCA3 Tieres sind wenige

Ergebnisse

Aggregate zu sehen (siehe Pfeile in Abb. 3.35 Cb_PZ HO 12M). Die Aggregation scheint im Alter zu zunehmen, da in der homozygoten SCA3 KI Maus im Alter von 18 Monaten etwas mehr Aggregate vorhanden sind (siehe Pfeile in Abb. 3.25 Cb_PZ HO 18M). In den wildtypischen Tieren jedes Alters und in der dreimonatigen homozygoten 304Q Maus liegen keine Aggregate vor. Die mit dem Alter zunehmende Aggregation liegt auch bei den im Mark des Cerebellums liegenden Nuclei cerebelli (Cb_NC), Kleinhirnkernen, vor und ist wie bei den Purkinje-Zellen zum ersten Mal bei den zwölfmonatigen homozygoten 304Q KI Mäusen und verstärkt bei dem 18 Monate alten Pendant dargestellt (siehe Pfeile in Abb. 3.35 Cb_NC HO 12M und HO 18M). Darüber hinaus sind die Kleinhirnkernkerne bei jedem Genotyp und jeder Altersstufe hellbraun gefärbt und heben sich vom blassen Hintergrund ab. Außerdem ist dem Pons, welcher ein Abschnitt des Hirnstamms ist und zum Zentralen Nervensystem gezählt wird, eine erhöhte Aggregation in den 18 Monate alten homozygoten SCA3 KI Mäusen zu erkennen, weshalb die eigentlichen Pons-Strukturen schwer erkennbar sind (siehe Pfeile in Abb. 3.35 Pons HO 18M). Auch im jüngeren homozygoten Tier von 12 Monaten (siehe Pfeile in Abb. 3.35 Pons HO 12M) ist eine anfängliche Aggregation zu finden, welche aber in der dreimonatigen homozygoten SCA3 Maus nicht vorhanden ist. In den Pons-Aufnahmen der wildtypischen Mäuse sind die Zellen sehr schwach gefärbt, während sie bei den homozygoten Tieren etwas stärker gefärbt sind. Der Gyrus dentatus, der aus zum Archicortex gehörenden, gezahnt aussehenden Gyri besteht und am medialen Rand des Hippocampus lokalisiert ist, sticht in dieser Abbildung (Hc_GD) am meisten hervor, denn die Aggregation ist schon in den dreimonatigen Mäusen zu erkennen und nimmt mit dem Alter zu, sodass in den zwölf- und 18-monatigen Mäusen nur noch Aggregate statt der eigentlichen Strukturen des Gyrus Dentatus zu finden sind (siehe Pfeile in Abb. 3.35 Hc_GD HO 3M, HO 12M, HO 18M). Außerdem ist die Färbung in den wildtypischen Tieren jedes Alters so schwach, dass kaum anatomische Strukturen zu erkennen sind. Es lässt sich festhalten, dass in allen genannten Gehirnarealen eine mit dem Alter zunehmende Aggregation stattfindet und diese vor allem im Gyrus Dentatus extrem stark vorhanden ist.

Ergebnisse

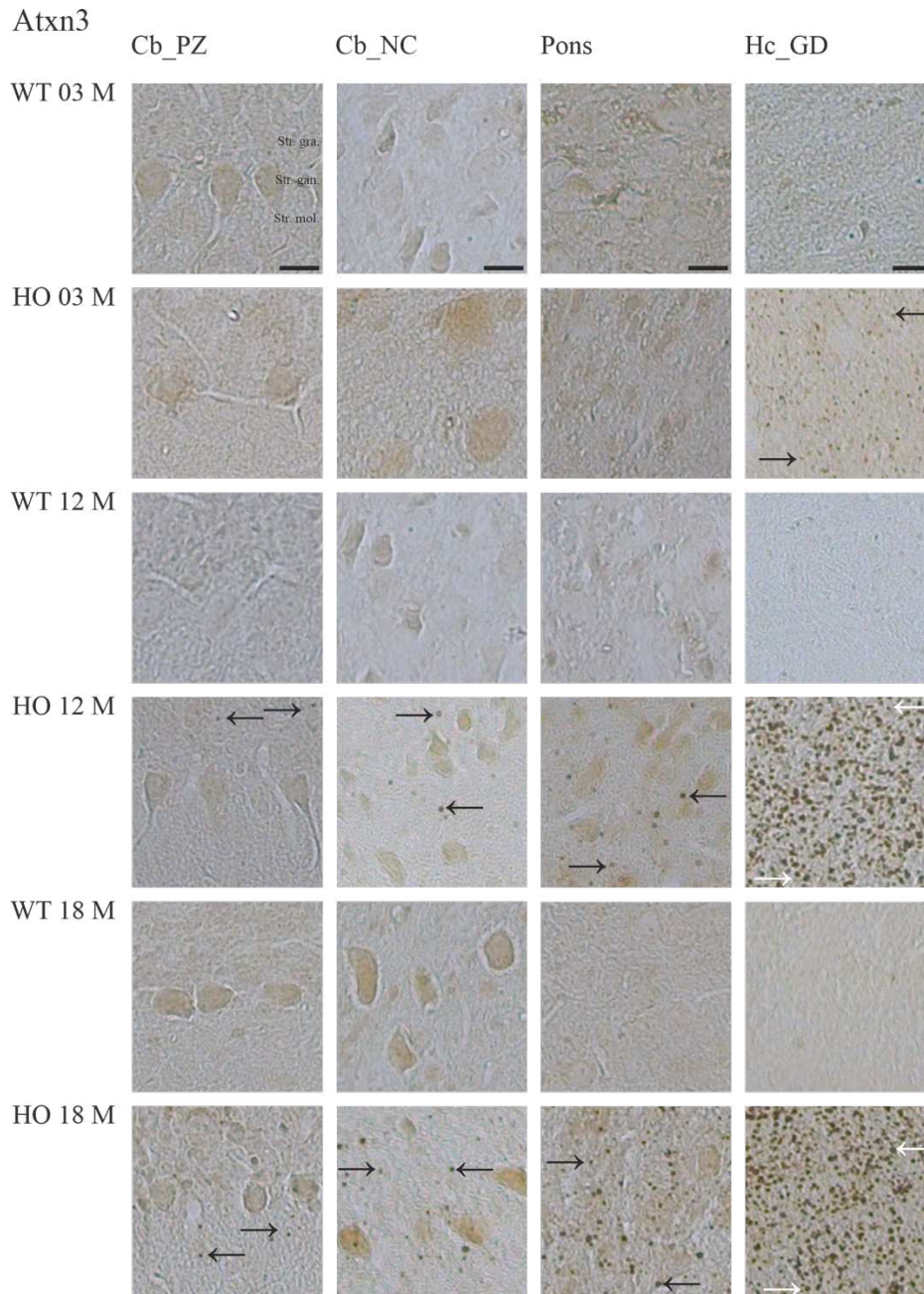


Abbildung 3.35: Aggregatbildung bei den homozygoten SCA3 KI Mäusen in der immunhistochemischen Färbung mit Atxn3

Immunhistochemische Färbung mit wildtypischen und homozygoten 304Q Mäusen im Alter von 3, 12 und 18 Monaten; in der Abbildung sind Aggregate in allen Aufnahmen der homozygoten Tiere im Alter von 12 und 18 Monaten zu sehen; im Gyrus Dentatus fängt die Aggregation schon im Alter von 3 Monaten an; die Aggregation nimmt mit dem Alter zu; generell ist die Färbung sehr schwach; →: Aggregate; Maßstab von 20 µm

WT n=1; HO n=1; 3M: 3 Monate; 12M: 12 Monate; 18M: 18 Monate; HO: homozygote SCA3 KI Maus; WT: wildtypische Maus; Cb_PZ: Purkinje-Zellen lokalisiert im Cerebellum; Cb_NC: Nuclei cerebelli lokalisiert im Cerebellum; Hc_GD: Gyrus Dentatus lokalisiert im Hippocampus

3.4.3.2 Aggregatbildung in Pons und Gyrus Dentatus der homozygoten 18-monatigen SCA3 KI Maus bei DNAJC13 Färbung

Mit dem Antikörper DNAJC13 der Firma Thermo Fisher Scientific, welcher rekombinant und monoklonal ist (Klon 11H13L5), wurden Sagittalschnitte von wildtypischen und homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen, welche ein Alter von 3, 12 und 18 Monaten haben, mittels Immunhistochemie gefärbt und die anatomischen Bereiche Cerebellum, Pons und Gyrus Dentatus des Hippocampus mikroskopisch betrachtet (Abb. 3.36). Generell sind die immunhistochemischen Aufnahmen mit DNAJC13 schwach gefärbt, wobei die Zellkerne stärker gefärbt sind als das Zytosol der Zellen. Aufgrund der schwachen Färbung wurden Etablierungsversuche mit den Verdünnungen von 1:4.000, 1:500 und 1:250 mit den Schnitten der ältesten Tiere vorgenommen und dann mit der Verdünnung von 1:250, da durch diese die Schnitte mehr gefärbt wurden, die immunhistochemische Methode durchgeführt. In den Bildern der Purkinje-Zellen mit den drei Schichten Stratum granulosum, Stratum ganglionare und Stratum molekulare ist zu erkennen, dass die Purkinje-Zellen eine dunkle Zellwand und Nucleus aufweisen, während das Zytosol nicht gefärbt ist. Dies ist in allen Altersstufen und Genotypen gleichermaßen zu sehen. Die Nuclei cerebelli sind bräunlich gefärbt und haben einen dunkleren Zellkern. Jedoch ist auffällig, dass die Färbung der Kleinhirnkerne bei der homozygoten Maus jedes Alters immer weniger stark ist im Vergleich zu den gleichaltrigen, wildtypischen Mäusen. In den Aufnahmen des Pons sind die Zellen kaum gefärbt, die Anzahl der Zellen sind bei den wildtypischen Mäusen immer geringer als bei den gleichaltrigen homozygoten 304Q KI Tieren. Außerdem sind Aggregate in Form von dunklen Punkten in der Pons-Aufnahme bei der homozygoten Maus von 18 Monaten zu sehen (siehe Pfeile in Abb. 3.36 Pons HO 18M). Die Aggregation präsentiert sich auch bei der homozygoten 18-monatigen Maus im Gyrus Dentatus des Hippocampus (siehe

Ergebnisse

Pfeile in Abb. 3.36 Hc_GD HO 18M). Auch hier scheinen die Gyrus Dentatus Aufnahmen der homozygoten Mäuse weniger gefärbt zu sein in Bezug zu den gleichaltrigen wildtypischen Mäusen.

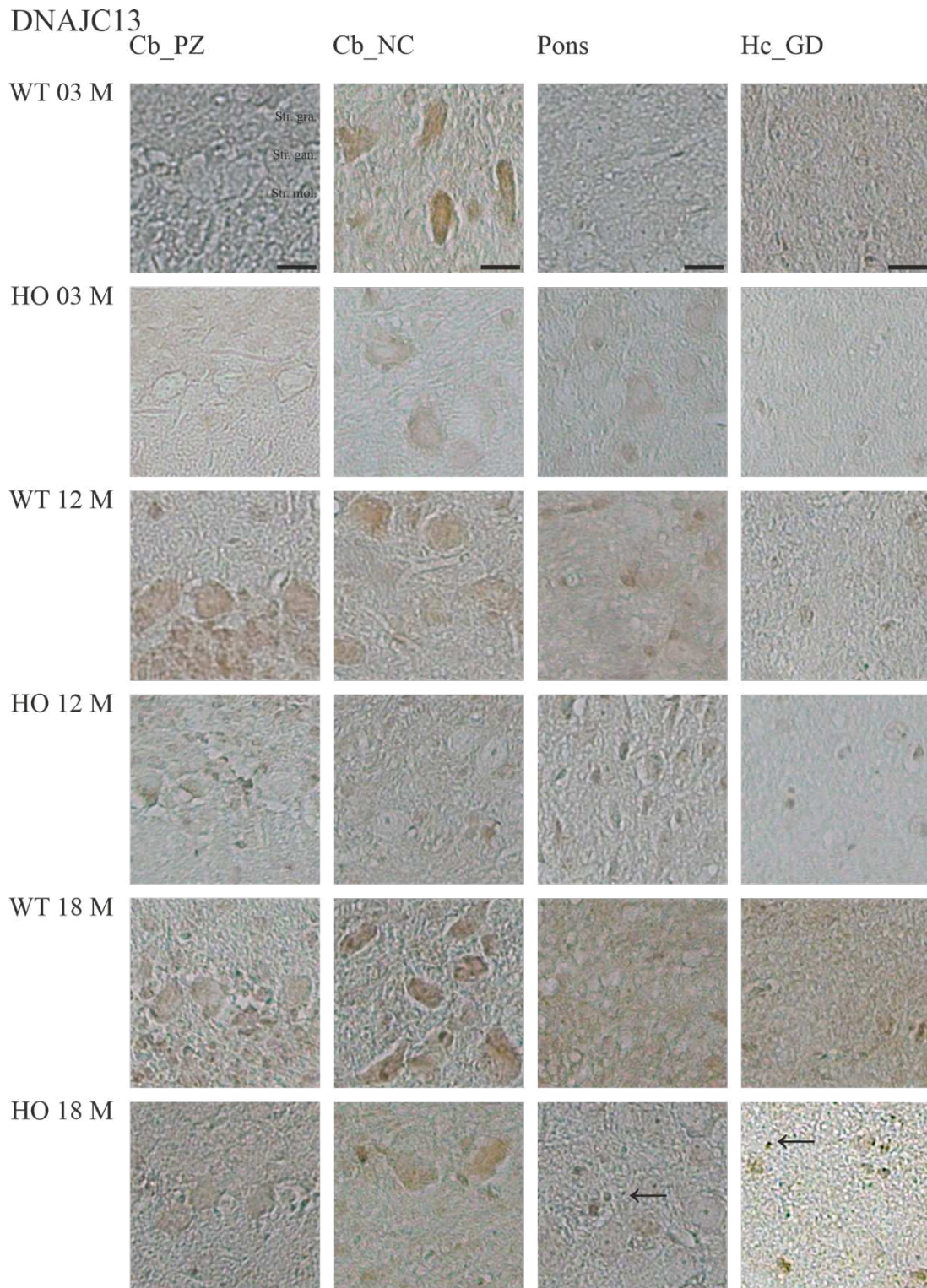


Abbildung 3.36: Aggregatbildung bei den homozygoten SCA3 KI Mäusen im Alter von 18 Monaten im Pons und Gyrus Dentatus in der immunhistochemischen Färbung mit DNAJC13

Immunhistochemische Färbung mit wildtypischen und homozygoten 304Q Mäusen im Alter von 3, 12 und 18 Monaten; in der Abbildung sind Aggregate in den Aufnahmen der Gehirnareale Pons und Gyrus Dentatus der homozygoten Tiere im Alter von 18 Monaten zu sehen; generell ist die Färbung sehr schwach und Zellstrukturen schwer erkennbar; →: Aggregate; Maßstab von 20 µm

WT n=1; HO n=1; 3M: 3 Monate; 12M: 12 Monate; 18M: 18 Monate; HO: homozygote SCA3 KI Maus; WT: wildtypische Maus; Cb_PZ: Purkinje-Zellen lokalisiert im Cerebellum; Cb_NC: Nuclei cerebelli lokalisiert im Cerebellum; Hc_GD: Gyrus Dentatus lokalisiert im Hippocampus

3.4.3.3 Aggregate in Nuclei cerebelli und Gyrus Dentatus bei homozygoten 304Q Mäusen bei HDJ2 Färbung

Mit dem HDJ2-Antikörper (Klon KA2A5.6) wurden immunhistochemische Färbungen mit 3, 12 und 18 Monate alten Mäusen durchgeführt (Abb. 3.37) und die Gehirnareale Cerebellum, Pons und Gyrus Dentatus wurden mit dem Mikroskop betrachtet. Die Aufnahmen sind mit einem Maßstab von 20 µm dargestellt. Die Purkinje-Zellen und die drei Schichten – Stratum granulosum, Stratum ganglionare, Stratum moleculare – bei der wildtypischen 3-monatigen Maus sind schwächer gefärbt als bei der homozygoten Maus im Alter von 3 Monaten. Das Zytosol der Purkinje-Zellen ist bei allen Genotypen und Altersstufen braun gefärbt. Im Stratum moleculare sind bei den homozygoten 304Q Tieren aufsteigend zum Alter einige Zellen dunkel gefärbt, dies zeigt sich nicht bei den wildtypischen Mäusen (Abb. 3.37 Cb_PZ). In Abbildung 3.37 Cb_NC sind die Nuclei cerebelli dargestellt, die generell bei den Wildtypen weniger stark gefärbt sind als bei den homozygoten 304Q Mäusen; je älter das Cerebellum und somit die Maus desto mehr Kleinhirnkerne sind zu finden. Zudem lassen sich Aggregate bei der homozygoten SCA3 KI Maus finden (siehe Pfeile in Abb.37 Cb_NC HO 18M). Im anatomischen Gehirnareal Pons (Abb. 3.37 Pons) ist bei allen Wildtypen keine spezifische Färbung der Zellen zu erkennen, jedoch sind die Zellen bei allen drei homozygoten Tieren mit 304 Glutaminen sehr deutlich gefärbt. Es lässt sich sogar ein Intensitätsunterschied in der Farbe zwischen Zellkern und Zytosol ausmachen (Abb. 3.37 Pons HO 3M, HO 12M, HO 18M). In den

Ergebnisse

beiden rechten Bildern der Abbildung 3.37 ist der Gyrus Dentatus abgebildet. Auf der linken Abbildung ist eine Übersichtsaufnahme des Hippocampus mit dem Gyrus Dentatus präsentiert. Die immunhistochemischen Färbungen sind bei den jüngeren Mäusen deutlich weniger intensiv als bei den älteren Tieren. Zudem ist bei den homozygoten 304Q Mäusen im Alter von 12 und 18 Monaten eine mit dem Alter zunehmende Aggregatbildung zu erkennen (siehe Pfeil in Abb. 3.37 Hc_GD HO 12M und HO 18M).

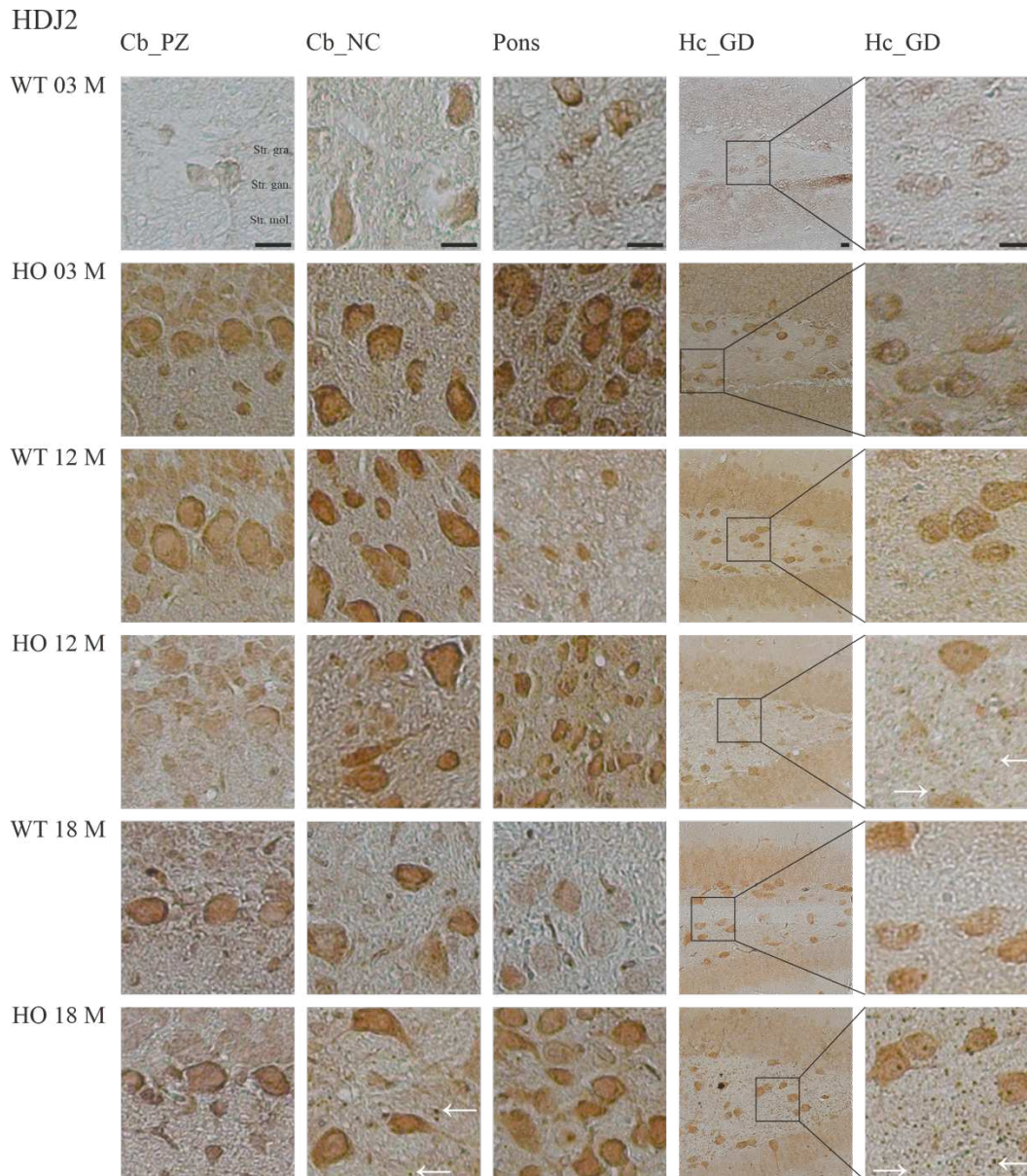


Abbildung 3.37: Aggregatbildung bei den homozygoten SCA3 KI Mäusen im Alter von 12 und 18 Monaten im Gyrus Dentatus in der immunhistochemischen Färbung mit HDJ2

Ergebnisse

Immunhistochemische Färbung mit wildtypischen und homozygoten 304Q Mäusen im Alter von 3, 12 und 18 Monaten; in der Abbildung sind Aggregate in den Aufnahmen des Gehirnareals Gyrus Dentatus der homozygoten Tiere im Alter von 12 und 18 Monaten zu sehen; →: Aggregate; Maßstab von 20 µm

WT n=1; HO n=1; 3M: 3 Monate; 12M: 12 Monate; 18M: 18 Monate; HO: homozygote SCA3 KI Maus; WT: wildtypische Maus; Cb_PZ: Purkinje-Zellen lokalisiert im Cerebellum; Cb_NC: Nuclei cerebelli lokalisiert im Cerebellum; Hc_GD: Gyrus Dentatus lokalisiert im Hippocampus

3.4.3.4 Intensivere HSP105 Färbung bei den Sagittalschnitten der homozygoten 304Q Tiere im Vergleich zu denen der Wildtypen

Mit dem rekombinanten Antikörper HSP105 (Klon EPR4576) wurden Sagittalschnitte von wildtypischen und homozygoten SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen im Alter von 12 und 18 Monaten mittels Immunhistochemie gefärbt und die anatomischen Areale Cerebellum, Pons und Gyrus Dentatus des Hippocampus mikroskopisch betrachtet (Abb. 3.38). Die Purkinje-Zellen sind bei allen Genotypen und Altersstufen gleichermaßen dunkel gefärbt (Abb. 3.38 Cb_PZ). Auch die Nuclei cerebelli weisen in der bräunlichen Färbung keine Unterschiede zwischen Wildtypen und homozygoten SCA3 KI Mäusen auf (Abb. 3.38 Cb_NC). In Abbildung 3.38 Pons ist zu erkennen, dass bei den 12-monatigen Mäusen die Zellen im Pons braun gefärbt und deutlich kleiner als bei den Tieren im Alter von 18 Monaten sind. Außerdem ist die Anzahl der Zellen im Pons beim 18-monatigen, homozygoten 304Q Tier deutlich höher als bei der gleichaltrigen wildtypischen Maus. In Abbildung 3.38 sind bei den zwei rechten Bildern Aufnahmen vom Gyrus Dentatus dargestellt; links befindet sich die Übersichtsaufnahme und rechts davon ist der vergrößerte Ausschnitt zu erkennen. Die Zellen im Gyrus Dentatus sind bei allen Genotypen und in jedem Alter schwach gefärbt. Genau wie im Cerebellum sind hier keine Unterschiede - außer dem zu Beginn beschriebenen Farbintensitätsunterschied zwischen Wildtypen und homozygoten SCA3 KI Mäusen – zwischen den Genotypen auszumachen (Abb. 3.38 Hc_GD).

Ergebnisse

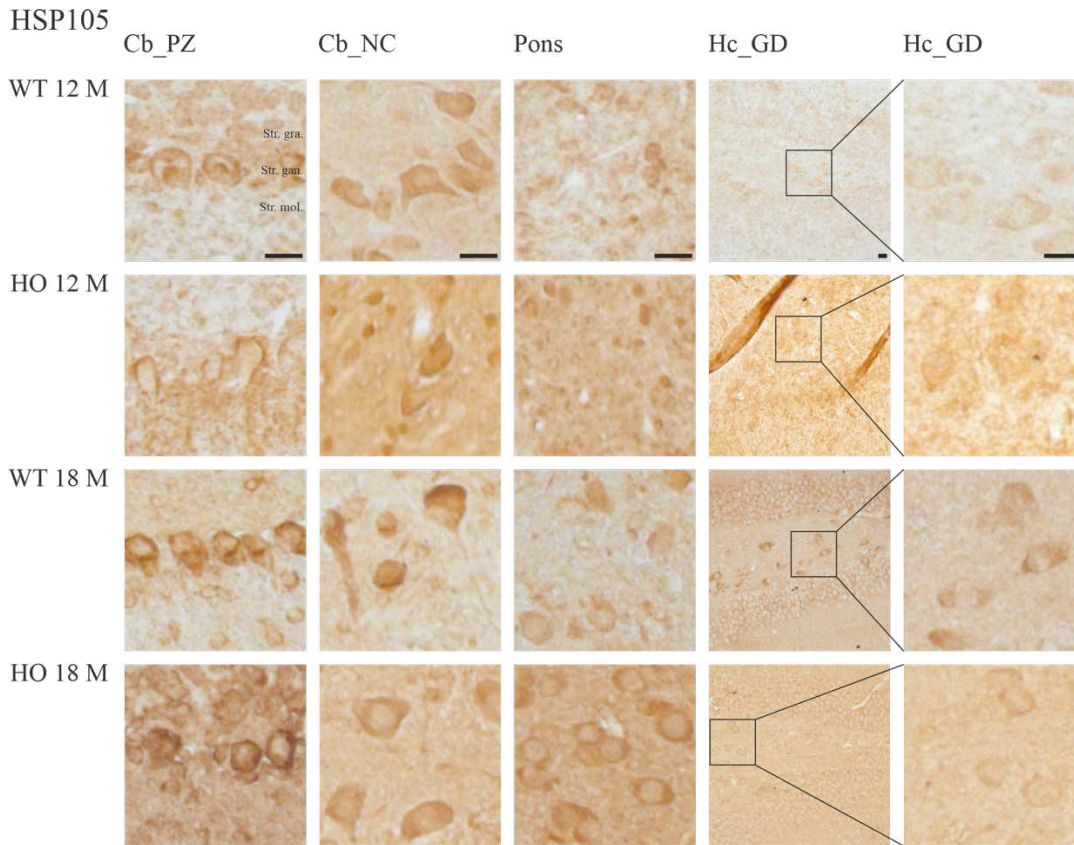


Abbildung 3.38: Intensivere Färbung der Gehirnschnitte der homozygoten SCA3 KI Mäuse in Bezug zu den Wildtypen in der immunhistochemischen Färbung mit HSP105

Immunhistochemische Färbung mit wildtypischen und homozygoten 304Q Mäusen im Alter von 12 und 18 Monaten; in der Abbildung sind keine Aggregate in den Aufnahmen der Gehirnareale zu sehen; die intensivere Färbung beider homozygoten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen ist auffallend; Maßstab von 20 μm

WT n=1; HO n=1; 12M: 12 Monate; 18M: 18 Monate; HO: homozygote SCA3 KI Maus; WT: wildtypische Maus; Cb_PZ: Purkinje-Zellen lokalisiert im Cerebellum; Cb_NC: Nuclei cerebelli lokalisiert im Cerebellum; Hc_GD: Gyrus Dentatus lokalisiert im Hippocampus

3.4.3.5 Veränderungen im Gewebe von homozygoten 304Q Tieren in Bezug zu Kontrollmäusen bei HSPA2 Färbung

Mit dem HSPA2-Antikörper (Klon EPR4596) wurden immunhistochemische Färbungen mit Mäusen im Alter von 3 und 18 Monaten durchgeführt (Abb. 3.39) und die

Ergebnisse

anatomischen Bereiche des Gehirns Cerebellum, Pons und Gyrus Dentatus wurden mit dem Mikroskop betrachtet. Die Aufnahmen sind mit einem Maßstab von 20 μm dargestellt. Die Purkinje-Zellen (Abb. 3.39 Cb_PZ) mit Ausnahme bei der homozygoten 304Q Maus im Alter von 3 Monaten sind kaum zu erkennen. Das Zytosol der Purkinje-Zellen der homozygoten dreimonatigen Maus (Abb. 3.39 Cb_PZ HO 3M) ist kaum gefärbt, während die Strukturen in den drei Schichten Stratum granulosum, Stratum ganglionare, Stratum moleculare bräunlich gefärbt sind. Dadurch erscheinen die Zellen als „hell erleuchtet“. Die Kleinhirnkerne (Abb. 3.39 Cb_NC) sind kaum gefärbt, wodurch auch diese im umliegenden bräunlichen Gewebe hell hervortreten. Bei den homozygoten SCA3 KI Tieren sind die Nuclei cerebelli deutlich größer und schärfer begrenzt und wirken heller im Vergleich zu den wildtypischen Mäusen. In Abbildung 3.39 ist das Gewebe in der Pons bei den homozygoten 304Q Tieren dunkelbraun gefärbt, während dieses bei den Wildtypen kaum gefärbt ist. Das Zytosol der Nuclei cerebelli ist bei beiden Genotypen kaum gefärbt, jedoch sind diese bei den homozygoten SCA3 KI Mäusen aufgrund des dunkleren Hintergrunds deutlich - in heller Form – zu erkennen. Der Gyrus Dentatus ist in den beiden rechten Aufnahmen (Abb. 3.39 Hc_GD) zu erkennen. Es wurde in der Übersichtsaufnahme jeweils ein Ausschnitt mit den drei Schichten des Gyrus Dentatus – Stratum plexiforme, Stratum granulosum und Stratum moleculare – ausgewählt und in der rechten Abbildung des Gyrus Dentatus dargestellt. Vor allem in Stratum granulosum und Stratum moleculare sind Unterschiede der Expression zwischen wildtypischen und homozygoten Mäusen im gleichen Alter zu erkennen.

Ergebnisse

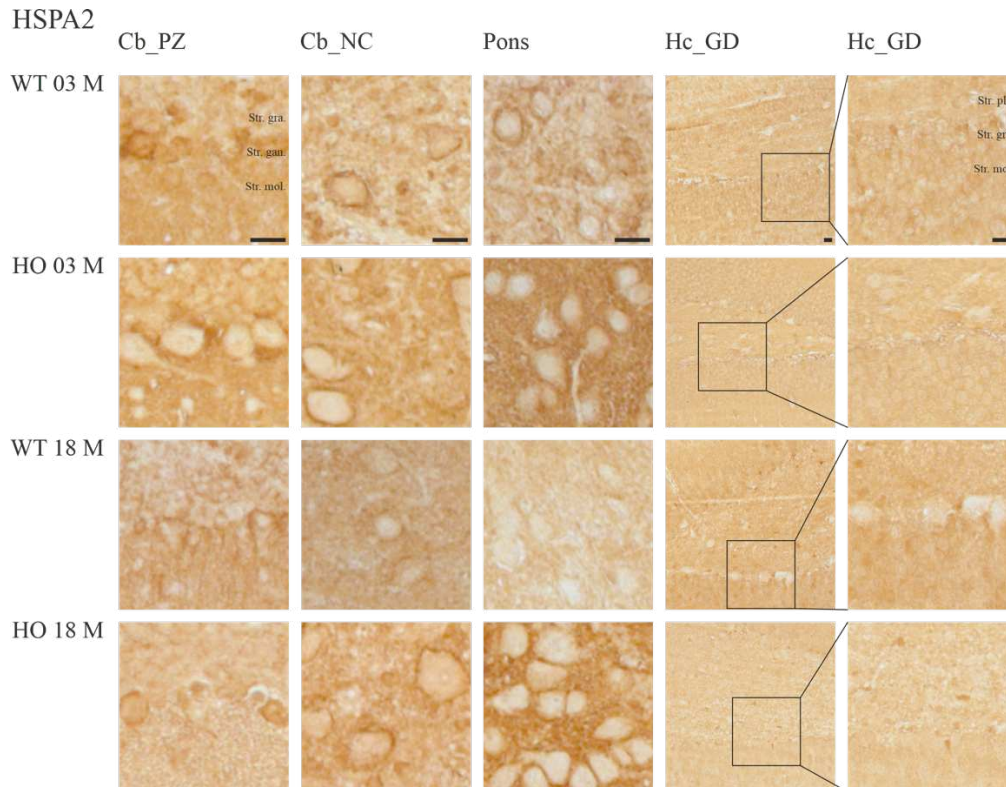


Abbildung 3.39: Veränderungen in homozygoten 304Q KI Gehirnschnitten im Vergleich zu denen der Wildtypen in der immunhistochemischen Färbung mit HSPA2

Immunhistochemische Färbung mit wildtypischen und homozygoten 304Q Mäusen im Alter von 3 und 18 Monaten; in der Abbildung sind keine Aggregate in den Aufnahmen der Gehirnareale zu sehen; die intensivere Färbung der Gehirnareale beider homozygoten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen ist auffallend; Veränderungen im Stratum moleculare und Stratum granulosum des Gyrus Dentatus bei den homozygoten SCA3 KI Tieren; Maßstab von 20 μm

WT n=1; HO n=1; 3M: 3 Monate; 18M: 18 Monate; HO: homozygote SCA3 KI Maus; WT: wildtypische Maus; Cb_PZ: Purkinje-Zellen lokalisiert im Cerebellum; Cb_NC: Nuclei cerebelli lokalisiert im Cerebellum; Hc_GD: Gyrus Dentatus lokalisiert im Hippocampus

4 Diskussion

Die neurodegenerative Erkrankung Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist in den meisten Populationen der häufigste Subtyp der autosomal dominant vererbten Spinozerebellären Ataxien und weist einen sehr variablen Phänotyp auf. Die SCA3 wird durch Polyglutamin-Wiederholungen kodierenden CAG-Trinukleotid-Wiederholungsexpansionen im *Ataxin-3-(ATXN3)* Gen verursacht (Schöls et al., 2004). Zwischen der dritten und fünften Lebensdekade beginnen in der Regel die ersten Krankheitssymptome (Klockgether et al., 2019). Der Erkrankungsbeginn als auch die Progredienz der SCA3 werden vor allem durch die Anzahl der *CAG-Repeats* im *ATXN3*-Gen bestimmt (van de Warrenburg et al., 2002). Die CAG-Wiederholungen zwischen ca. 60-87 *Repeats* liegen bei SCA3 betroffenen Personen vor und sind instabiler als nicht-pathologische Wiederholungslängen von 12 bis ca. 44 auf dem *ATXN3*-Gen (Maciel et al., 1995; H. Paulson, 2018; Schöls et al., 2004). Die *Repeats* zeigen das Phänomen der klinischen Antizipation, also der Verlängerung der CAG-Wiederholungen bei Übertragung auf die nächste Generation. Dadurch ist mit einer Verschlimmerung des Krankheitsverlaufs in einer Familie zur nächsten Generation zu rechnen (Klockgether et al., 2019; H. Paulson, 2018). Außerdem kann es in einer Familie mit SCA3-Erkrankten zur Homozygotie – Mutation beider Allele des *ATXN3*-Gens – kommen. Bei dieser extrem seltenen Form der Erkrankung kommt es zu einem früheren Beginn und einer schwereren Form der Krankheitssymptome (D. R. Carvalho et al., 2008). Durch die expandierten CAG-Wiederholungen im *ATXN3*-Gen kommt es zur Protein-Aggregation des Erkrankungsproteins. Die Aggregation ist vor allem im Cerebellum, Pons und Hippocampus zu finden, wodurch eine Neurodegeneration ausgelöst wird (Bettencourt & Lima, 2011). Die klinischen Symptome beruhen auf einem ausgeprägten Nervenzelluntergang im Bereich des Cerebellums (Yamada et al., 2001). Momentan existiert keine kurative Therapie für die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (McLoughlin et al., 2020). Für Therapieansätze werden große Stichproben und potenzielle Biomarker benötigt (Lima & Raposo, 2018). Dies konnte durch das multizentrische europäische ESMI-Projekt umgesetzt werden; denn durch dieses wird für die Forschung an SCA3 eine große europäische Kohorte von SCA3 PatientInnen, MutationsträgerInnen und KontrollprobandInnen zur Verfügung gestellt

(<https://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi/>, zuletzt abgerufen am 19.08.23; 19.02 Uhr). Biomarker gelten als Indikator für biologische und pathologische Prozesse und spielen eine große Rolle für klinische Studien (Biomarkers Definitions Working Group et al., 2001). Es gibt zwar schon potenzielle Biomarker für Forschung der Spinozerebellären Ataxie Typ 3, jedoch muss weiter geforscht werden, um das Ziel der kausalen Therapie dieser Erkrankung zu erreichen. Möglicherweise sind unterschiedliche Biomarker je nach Anwendung – Therapie oder Progression – oder eine Kombination von verschiedenen Biomarkern nötig. Hierfür können *cross-sectional* Bestimmungen als auch longitudinale Biomarker-Analysen durchgeführt werden, um Biomarker zur Forschung zu gewinnen. Bei longitudinalen Biomarkern können Veränderungen dieser molekularen Marker mit dem Krankheitsverlauf besser eingeschätzt werden. Darüber hinaus sind Hitzeschockproteine, welche Schlüsselregulatoren der ordnungsgemäßen Faltung, dem rechtzeitigen Abbau von Proteinen in allen Zellkompartimenten als auch der Proteinaggregation (Kampinga & Bergink, 2016; Sajjad et al., 2010) sind, in der Forschung zu neurodegenerativen Erkrankungen interessant, denn Hitzeschockprotein-assoziierte Medikamente könnten eine große Bedeutung bei der Behandlung von SCA3 PatientInnen haben (Sajjad et al., 2010). Deshalb war es das Ziel dieser Doktorarbeit, longitudinale Biomarker mit Hilfe hoch-sensitiver Methoden zu generieren und zu validieren. Der Fokus lag auf dem Pathogeneseprozess im Gehirn der verschiedener Tier-Modelle der SCA3 und im Blut von ESMI-ProbandInnen sowie auf dem Versuch diesen in Bezug zum longitudinalen Verlauf von potenziellen Biomarkern zu bringen. SCA3 gehört zu den Polyglutamin-Erkrankungen, bei welchen mehrere Mechanismen – wie zum Beispiel Gewinn der toxischen Funktion des expandierten Proteins – zur Neurodegeneration und zum Fortschreiten der Krankheit beitragen. Hierfür trägt der erweiterte Polyglutamin (PolyQ)-Trakt bei; denn durch diesen kommt es zur Aggregationsbildung. Darüber hinaus interagiert und sequestriert dieser Trakt mehrere Proteine mit deren zellulären Funktionen. Deshalb entstehen durch das mutierte Protein – bei SCA3 ATXN3 – verschiedene Beeinträchtigungen, welche in Kombination zu einer Kaskade von Ereignissen führen, wodurch die Neurodegeneration und der Zelltod ihr Gipfel sind (Nóbrega et al., 2015). SCA3 als PolyQ-Erkrankung ist durch Bildung von Proteinaggregaten, welche andere Proteine und zelluläre Komponenten wie

Transkriptionsfaktoren, molekulare Chaperone und Komponenten zellulärer Clearance-Mechanismen umfassen, in Neuronen gekennzeichnet (Nóbrega et al., 2018). Nach und nach werden die pathologischen Aggregate unlöslich, wodurch sie zur Dysregulation und Beeinträchtigung vieler zellulärer Mechanismen beitragen. Daher kommt es zur Dysregulation der Calciumhomöostase, Ubiquitin-Protease-Funktionsstörung, mitochondriale Dysfunktion, axonale Beeinträchtigung, anomale Protein-Interaktion, proteolytische Spaltung, posttranslationalen Modifikationsänderungen, Beeinträchtigung der Autophagie und zu weiteren Mechanismen, die zur Neurodegeneration und zum Zelltod beisteuern (Levine & Kroemer, 2019).

Hitzeschockproteine (HSP) regulieren die ordnungsgemäße Faltung, den rechtzeitigen Abbau von Proteinen in allen Zellkompartimenten und die Proteinaggregation (Kampinga & Bergink, 2016; Sajjad et al., 2010). Hitzeschockproteine sind in den Vordergrund der Forschung für neurodegenerativ Erkrankungen gerückt, denn ein erfolgreicher Einsatz von Hitzeschockprotein-assoziierten Medikamenten könnte eine große Rolle bei der Behandlung von PatientInnen spielen (Sajjad et al., 2010). Beispielhaft kann hier die Forschung zu Hitzeschockprotein 90 genannt werden, denn viele Erkrankungen wie Krebs, neurodegenerative Erkrankungen und Stoffwechselerkrankungen werden durch Proteinfehlfaltung verursacht und somit wurden Medikamente, welche Hitzeschockprotein 90 hemmen, als potenzielle Ziele für die Behandlungen untersucht. Dipeptidomycin G ist ein Hitzeschockprotein 90 Inhibitor, dient als Krebsmedikament und könnte für andere Erkrankungen wie die neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen (Wickramaratne & Wickner, 2023). Hitzeschockproteine, welche bei zellulärem Stress ihre Expression erhöhen, agieren bis zu einem gewissen Grad als molekulare Chaperone, welche sich an der korrekten Faltung und Biogenese von zellulären Proteinen beteiligen und Fehlfaltungen und Aggregationen von Proteinen, die zur Aggregation tendieren, verhindern (Hayes & Dice, 1996). Die meisten neurodegenerativen Erkrankungen weisen fehlgefaltete Proteine auf und es scheint so, als ob die veränderten HSP-Spiegel eine Neuroprotektion ausüben. Diese Vermutung geht aus zahlreichen Zell- und Tier-Modellen hervor (Sajjad et al., 2010). Es ist bekannt, dass HSP-Expressionsniveaus einiger Hitzeschockproteine in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen – Morbus Alzheimer, Morbus Huntington, Morbus Parkinson – sinken,

was an der Sequestrierung in Proteinaggregaten liegen könnte (Muchowski & Wacker, 2005). Hitzeschockproteine gelten somit als vielversprechende Wirkstoffziele zur Modulation der Neurodegeneration aufgrund von Proteinfehlfaltung und Proteinaggregation (Sajjad et al., 2010). Deshalb wurden in dieser Dissertation mehrere Hitzeschockproteine – DNAJC13, HDJ2, HSP105, HSP27 und HSPA2 – näher betrachtet, welche in mehreren Studien in SCA3 oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen als mögliche Biomarker gelten oder an der Aggregationsbildung beteiligt sind.

DNAJC13 (*DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13*) ist ein Mitglied der Hitzeschockprotein Familie 40 und eine Komponente des am endosomal-lysosomal-retrograden Wegs beteiligten Retromerkomplexes (Girard et al., 2005; Seaman & Freeman, 2014). In dieser Doktorarbeit wurde DNAJC13 in den RNA-Sequenzierungsdaten der bioinformatischen Analyse nicht signifikant exprimiert nachgewiesen, jedoch wurde lösliches DNAJC13 in der Western Blot Analyse signifikant erhöht bei homozygoten 304Q Tieren im Alter von 3 Monaten in Bezug zu gleichaltrigen wildtypischen Mäusen gefunden. Im Alter von 12 und 18 Monaten war die Expression der homozygoten SCA3 KI Mäusen zwar höher als die der Wildtypen, jedoch ohne Signifikanz; dies spricht für eine Erhöhung der Expression von DNAJC13 bei 304Q Tieren im jungen Alter im Vergleich zu gleichaltrigen wildtypischen Mäusen. In Haas et al., 2022 wurde bewiesen, dass bereits eine geringe Zahl an Aggregaten in dreimonatigen SCA3 KI Mäusen vorliegt (Haas et al., 2022) und somit könnte DNAJC13 eher zu Beginn der Aggregatbildung versuchen, dem entgegenzuwirken, damit die ersten Aggregate nicht entstehen. Wenn es aber dann zu einer größeren Anzahl an Aggregaten bei den älteren 304Q Mäusen kommt (Haas et al., 2022), scheint DNAJC13 bei der größeren Anzahl an Aggregaten keine Rolle mehr zu spielen. Vielleicht war die Analyse der Blut RNA-Sequenzierung nicht die richtige Methode, da eventuell die Regulation auf Protein-Ebene liegen könnte. In der Pathogenese von Morbus Parkinson wurden DNAJC13-Mutationen gefunden, somit gilt DNAJC13 als potenzielle Quelle für Risikovarianten und seltene kausale Mutationen (Appel-Cresswell et al., 2014; Gustavsson et al., 2015). Außerdem wird DNAJC13 auch PARK21 (*Parkinsons disease 21*) genannt. In einer Studie von Vilariño-Güell et al., 2014 wurde eine einzige Variante in dem *DNAJC13* Gen – p.N855S – nachgewiesen, welche eine späte Parkinson-Erkrankung verursachen könnte, und diese

wurde nachweislich mit Morbus Parkinson in Familien mit unter anderem niederländischem, deutschem, russischem und kanadischem Ursprung gefunden (Vilariño-Güell et al., 2014). Ein Jahr später wurde in einer weiteren Studie zu DNAJC13 in Verbindung zu Parkinson berichtet, dass es andere seltene *DNAJC13* Varianten – p.R1516H, p.E1740Q, p.L2170W – mit verringertem oder erhöhtem Risiko für die Entwicklung von Morbus Parkinson gebe; dies bezog sich vor allem auf die Populationen in Kanada, Norwegen und dem Kaukasus (Gustavsson et al., 2015). Die Hypothese, dass DNAJC13 in Verbindung mit Parkinson gebracht werden kann, wurde durch eine Studie von Ross et al., 2016 unterstützt. Jedoch wurde gezeigt, dass dies wahrscheinlich nur für eine kleine Kohorte von Parkinson-Erkrankten eine Rolle spielen werde (Ross et al., 2016). Aufgrund der inkonsistenten und teilweise negativen Ergebnisse von Saini et al., 2021 und früherer Studien zu DNAJC13 muss die Frage gestellt werden, ob dieses Gen überhaupt eine Relevanz zur Pathogenese von Morbus Parkinson hat (Saini et al., 2021). Da gezeigt werden konnte, dass PatientInnen mit erhöhten Trinukleotid-Wiederholungen in SCA-Genen – wie *ATXN3* – selten zusätzlich an Parkinsonismus leiden können (Park et al., 2015), könnte DNAJC13 ein potenzieller longitudinaler Biomarker für SCA3 sein. In der immunhistochemischen Färbung mit einem DNAJC13-Antikörper konnte eine leichte Aggregation in den Gehirnarealen Pons und Gyrus Dentatus bei der homozygoten SCA3 KI Maus im Alter von 18 Monaten validiert werden, währenddessen bei der gleichaltrigen wildtypischen Maus keine Aggregation vorlag. Jedoch wurden im Filter Trap der 18-monatigen 304Q Tiere keine Aggregate nachgewiesen, welche für DNAJC13 positiv waren. Zum derzeitigen Stand gibt es keine Studien, die eine Co-Aggregation von DNAJC13 und dem jeweiligen Erkrankungsprotein in neurodegenerativen Erkrankungen berichten; jedoch könnte DNAJC13 in älteren Mäusen akkumulieren, was in zukünftigen Studien untersucht werden sollte.

Wie DNAJC13 gehört HDJ2, auch DNAJA1 (*DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1*) genannt, zu der Hitzeschockprotein-Familie 40 (Qiu et al., 2006). Die Runterregulation von HDJ2 induziert den Kernexport, die Ubiquitylation und den Abbau von falsch gefalteten mutp53 (Mutante des Tumor Proteins 53), jedoch verhindert eine Überexpression von HDJ2 den Abbau von mutp53 (Parrales et al., 2016). HDJ2 wurde in der bioinformatischen Analyse der SCA3 RNA-Sequenzierungsdaten nicht signifikant reguliert gefunden; im Western Blot bei 12-monatigen homozygoten SCA3 KI Mäusen

jedoch wurde HDJ2 hoch signifikant runterreguliert in Bezug zu wildtypischen Tieren nachgewiesen. Zudem wurde eine signifikante Expressionsreduktion von HDJ2 bei den heterozygoten 304Q Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen, als auch bei den homozygoten SCA3 KI Tieren in Bezug zu den heterozygoten 304Q Mäusen gefunden. Warum die Wildtypen eine hohe Expression haben als die SCA3 KI Mäuse könnte eventuell damit zu erklären sein, dass HDJ2 im gesunden Zustand in vielen Zellen im Gehirn exprimiert ist, was sich in der Auswertung via Tabula Muris zeigt (Abb. 4.1). Bei Tabula Muris werden Daten verwendet, die einen direkten und kontrollierten Vergleich der Genexpression in Zelltypen, die zwischen Geweben geteilt werden, ermöglichen. In Abbildung 4.1 ist die Expression von HDJ2 in den nicht-myeloiden Zellen des gesunden Gehirns abgebildet. Es ist zu erkennen, dass alle untersuchten Zellen eine hohe Expression aufweisen, aber vor allem in den Neuronen und Endothelzellen ist etwas mehr exprimiert (<https://tabula-muris.ds.czbiohub.org>, zuletzt abgerufen am 08.09.2023 um 11.05 Uhr).

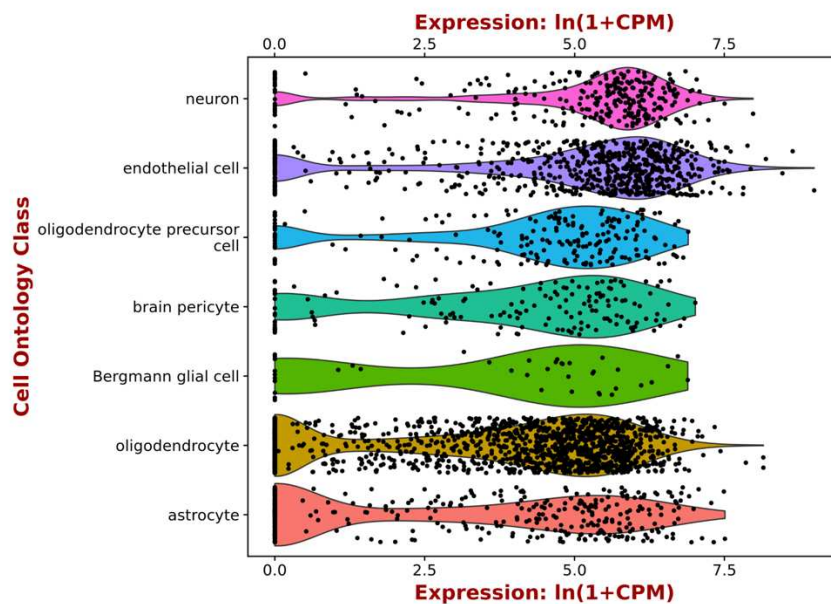


Abbildung 4.1: Expression von HDJ2 in Zellen des gesunden Gehirns (aus Tabula Muris)

Auf der x-Achse ist die Expression in $\ln(1+CPM)$ abgebildet, während die Zellontologie auf der y-Achse beschrieben ist; bei den Zellen handelt es sich um Neuronen, Endothelzellen, Oligodendrozyoten-Vorläuferzellen, Gehirnperizyten, Bergmann-Gliazellen, Oligodendrozyten und Astrozyten; im Durchschnitt ist der Balken der Neurone am stärksten exprimiert

HDJ2 wurde in den Gehirnen von SCA7-Maus-Modellen in frühen Krankheitsstadien in Bezug zu gleichaltrigen Wildtypen hochreguliert und in SCA7-Maus-Modellen mit höherem Alter in Bezug zu wildtypischen Tieren des gleichen Alters runterreguliert gefunden. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein Phänomen der Histon-Hypoacetylierung, bei dem eine anfänglich starke Hitzeschock-Reaktion bei Polyglutamin-erkrankten Mäusen im Laufe des Alters zunehmend beeinträchtigt wird. Die Histon-Hypoacetylierung führt mit der Zeit zu einer Abnahme der Hitzeschock-Gentranskription (Labbadia et al., 2011; Scholefield et al., 2014). Eine Studie von Evert et al., 2006 beweist, dass das erweiterte ATXN3 fehlerhaft die Transkription über seine katalytische Stelle aktiviert (Evert, Araujo, et al., 2006). Zudem wurde in SCA7-PatientInnen-Zelllinien in Bezug zu Kontrolllinien HDJ2 unterschiedlich exprimiert; diese Veränderungen entsprachen denen der SCA7-Maus-Modellen (Chou et al., 2010). Bei SCA7-PatientInnen-Neuroblastozellen wurde eine runterregulierte Expression von HDJ2 in einer Studie von Burman et al., 2021 beobachtet. Es wurde ein Modell mit frühem Entwicklungsstadium entworfen, welches daraufhin deutet, dass der Rückgang von HDJ2 ein inhärenter Defekt sein könnte, der bestimmte Zellpopulationen für eine Degeneration prädisponieren könnte (Burman et al., 2021). Für Morbus Alzheimer ist Stress ein Risikofaktor. In der Studie von Shan et al., 2016 wurden die Chaperonspiegel in Gehirnen von Alzheimer-Mäusen ohne Stress mit denen mit chronischem restriktivem Stress verglichen. Der Chaperonspiegel im Gehirn von Alzheimer-Mäusen im mittleren Alter war relativ niedrig, jedoch bei Alzheimer-Tieren, die chronischem restriktivem Stress ausgesetzt waren, war die Expression der Chaperone viel geringer, vor allem für HDJ2. Eine Herunterregulierung von HDJ2 ließ das transfizierte fremde Tau in 293 Zellen ansteigen (Shan et al., 2016). Eine zusätzlich gefundene Fehlregulation von menschlichem HDJ2 im Gehirn von PatientInnen mit Morbus Alzheimer lässt darauf schließen, dass HDJ2 an der Ätiologie von Alzheimer beteiligt sein könnte. Jedoch benötigt es weitere Studien, um den genauen Zeitpunkt, an dem HDJ2 an der Progression von Morbus Alzheimer beteiligt ist, zu identifizieren; dies könnte eine Möglichkeit für die Entwicklung einer kausalen Therapie sein (Tadic et al., 2022). Somit könnte HDJ2 auch für die SCA3 als potenzieller longitudinaler Biomarker, der vor allem im Gehirn zu finden ist, in der Zukunft eine Rolle spielen. Zur Untersuchung der Aggregationsbildung wurden für HDJ2 eine immunhistochemische Färbung und ein Filter Trap durchgeführt. In der

immunhistochemischen Färbung mit dem HDJ2-Antikörper wurden Aggregate, welche positiv für HDJ2 waren, in den homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304Q gefunden. In der 12-monatigen homozygoten SCA3 KI Maus war im Gyrus Dentatus des Hippocampus eine leichte Co-Aggregation zu sehen, die in der homozygoten 304Q Maus von 18 Monaten sehr viel stärker ausgeprägt war; somit nimmt die Aggregation im Gyrus Dentatus mit dem Alter zu. Auch in der Aufnahme der Nuclei cerebelli war eine geringe Akkumulation im homozygoten 18-monatigen SCA3 KI Tier zu erkennen. Mit der Methode des Filter Traps konnten gegenteilig, aber jedenfalls keine signifikanten Veränderungen innerhalb der Genotypen der SCA3 KI Mäuse im Alter von 18 Monaten analysiert werden, jedoch ließ sich eine Tendenz der Aggregationsbildung in den homozygoten 304Q Tieren in Bezug zu Wildtypen erahnen. Es ist bekannt, dass HDJ2 bei mehreren Polyglutamin-Erkrankungen – wie SCA1, SCA3, Morbus Huntington, Morbus Alzheimer und spinobulbäre Muskelatrophie – mit Aggregaten kolokalisiert (Cummings et al., 1998; Giffard et al., 2004; Jana et al., 2000; Schmidt et al., 2002; Stenoien et al., 1999; Waelter et al., 2001). Chai et al., 1999 führte Versuche zur Erforschung der SCA3-Erkrankung durch, um zu überprüfen, ob spezifische Hitzeschockproteine zu Aggregaten kolokalisieren. Die Überexpression von HDJ2 unterdrückte in Zell-Modellen die Aggregatbildung durch ATXN3. Mit einer deletierten Form von HDJ2, welcher die N-terminale J-Domäne fehlt – HDJ2 (del9–107) –, konnte die Aggregation sogar noch wirksamer unterdrückt werden als mit HDJ2 in voller Länge (Chai et al., 1999). Auch Studien zu Morbus Huntington belegen, dass die Überexpression von HDJ2 die Aggregatbildung in Zell- und Maus-Modellen unterdrückt und dadurch die Toxizität verringert wird (Jana et al., 2000). Antikörper gegen HDJ2 zeigten in immunhistochemischen Färbungen von Huntington-Mäusen eine Co-Lokalisierung mit nuklearen Einschlüssen, welche durch den Anti-Huntingtin-Antikörper im Hippocampus, Striatum und Kortex nachgewiesen wurden (Hay et al., 2004). Die Nachweise im Hippocampus der genannten Studie bestätigen die immunhistochemischen Ergebnisse dieser Dissertation, bei welcher eine Aggregatbildung im Gyrus Dentatus durch Färbung mit HDJ2 zu erkennen war. In einer Studie von Giffard et al., 2004 konnte nachgewiesen werden, dass HDJ2 *in vitro* Neuronen schützt und dies in Zusammenhang mit einer verringerten Proteinaggregation steht. HDJ2 verhindert die

Aggregationsbildung selbst, jedoch kann HDJ2 nur mit HSP70 zusammen die Proteinfaltung erleichtern (Giffard et al., 2004).

Wie die vorher genannten Proteine DNAJC13 und HDJ2 gehört auch HSP105 (*heat shock protein family H (Hsp110) member 1*) zu den Hitzeschockproteinen und ist ein Mitglied der Hsp70-Familie; zudem kann HSP105 in Kooperation mit Hsp70 und Hsp40 Amyloid und vorgeformte Aggregate aufspalten (Shorter, 2011). In dieser Dissertation wurde HSP105 in der bioinformatischen Analyse bei SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) im Alter von 12 Monaten in Bezug zu gleichaltrigen Wildtypen runterreguliert gefunden. In der Western Blot Analyse konnte eine leichte Runterregulation der Protein-Expression von HSP105 von homozygoten und heterozygoten 304Q Tieren im Vergleich zu wildtypischen Mäusen festgestellt werden, jedoch waren diese Expressionsunterschiede nicht signifikant. Die Analyse mittels Tabula Muris zeigte, dass HSP105 in den Zellen des gesunden Gehirns exprimiert ist; vor allem in den Neuronen war die Expression am höchsten (<https://tabula-muris.ds.czbiohub.org>, zuletzt abgerufen am 08.09.2023 um 11.17 Uhr). Im Gehirn von PatientInnen mit Morbus Alzheimer sammelt sich pathologisches Tau an, wodurch es zum neuronalen Verlust, zur synaptischen Dysfunktion und zum kognitiven Verfall kommt. Ein Histondeacetylase 6-Inhibitor, CKD-504, verändert das Tau-Interaktom, um pathologisches Tau nicht nur in Gehirnen von Alzheimer-Tiermodellen abzubauen, die sowohl Amyloid-Plaques als auch neurofibrilläre Knäuel enthalten, sondern auch in von PatientInnen mit Morbus Alzheimer stammenden Gehirnorganoiden. Acetyliertes Tau rekrutiert unter anderem wie HSP105, HSP70 und HSP40. Durch diesen Komplex mit anderen Ligasen kommt es zum Abbau von pathologischem Tau über den proteasomalen Weg (Choi et al., 2020). Somit könnte auch HSP105 eine Rolle im Aggregationsprozess von SCA3 spielen und eventuell als longitudinaler Biomarker dienen, jedoch bedarf es hier weitere Forschung. Bei HSP105 konnte in der immunhistochemischen Färbung keine Co-Aggregationsbildung in den homozygoten SCA3 KI Mäusen beobachtet werden, jedoch war die deutlich intensivere Färbung in den homozygoten 304Q Tieren in Bezug zu den entsprechenden Wildtypen auffällig. Dennoch konnte mit der Methode des Filter Traps eine signifikante Veränderung zwischen homozygoten SCA3 KI Mäusen und wildtypischen Tieren statistisch beobachtet werden, bei der die homozygoten 304Q Mäusen eine deutliche Aggregation aufwiesen. Um die Aggregation in

neurodegenerativen Krankheits-assoziierten Polypeptiden zu verhindern, ist HSP105 bedeutend, was in *in vitro* Studien und *in vivo* Tier-Modellen belegt werden konnte. Zu diesen neurodegenerativen Erkrankungen zählen unter anderem Morbus Huntington, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und amyotrophe Lateralsklerose (Kuo et al., 2013; Song et al., 2013; Wentink et al., 2020). Die Huntingtin-Aggregation und der damit verbundene neurodegenerative Phänotyp wird durch das HSP105 Homolog Hsc70Cb in *Drosophila melanogaster* verhindert (Zhang et al., 2010). Daher könnte Hsp110, ein starker Aggregationssuppressor, zusammen mit der Beobachtung seiner dosisabhängigen genetischen Interaktion mit Huntington-Fliegen auch ein wirksamer Suppressor der durch mutiertes PolyQ induzierten Neurodegeneration sein. Auch eine Überexpression von HSP105 mildert die Proteinaggregation und Neurodegeneration für Morbus Parkinson amyotrophe Lateralsklerose, was in Maus-Modellen nachgewiesen wurde (Nagy et al., 2016; Taguchi et al., 2019). Darüber hinaus konnte für die Deletion von HSP105 Homologen in Mäusen und *Drosophila* eine verstärkte Amyloidbildung von Alzheimer-assoziiertem A β 1-42 bzw. expandiertem Polyglutaminprotein zurückzuführende Neurodegeneration nachgewiesen werden (Eroglu et al., 2010; Kuo et al., 2013). Studien zeigten, dass eine Überexpression von HSP105 in verschiedenen biologischen Systemen die Bildung toxischer fehlgefalteter Proteinkonformere verringerte (Kuo et al., 2013; Nagy et al., 2016; Song et al., 2013; Taguchi et al., 2019; Zhang et al., 2010). *In vitro* Experimente von Yakubu und Morano, 2021 wiesen nach, dass der C-terminale IDR von HSP105 in der Lage ist, die Aggregat- und Amyloidbildung in Abwesenheit von HSP40 und HSP70 zu unterdrücken (Yakubu & Morano, 2021). HSP105 könnte somit eine Relevanz für die kausale Therapie haben und sollte dementsprechend weiter untersucht werden.

Auch die gerade genannte Hitzeschockprotein Familie 70 sollte in Bezug zur Forschung von therapeutischen Medikamenten und dem Verständnis der Pathogenese von SCA3 nicht außer Acht gelassen werden. Zu dieser Familie gehört das untersuchte HSPA2 (*Heat shock protein family A (Hsp70) member 2*), welches eine Rolle beim Chaperon-System als auch bei der Proteinfaltung spielt und eine Beteiligung an vielen Zellprozessen hat, wie zum Beispiel die synaptische Übertragung, Autophagie, Zelltodsignalisierung und weitere (Stetler et al., 2010). In der bioinformatischen Auswertung dieser Doktorarbeit wurde HSPA2 im Cerebellum sowohl von SCA3 KI Mäusen im Alter von 12 Monaten

(Haas et al., 2022) als auch von SCA3 PatientInnen differentiell exprimiert gefunden; hier beteiligte sich HSPA2 an der Signalisierung der Huntington Erkrankung in der *Pathway*-Analyse mittels IPA. Außerdem wurde HSPA2 im BAG2-Signalweg gefunden und ist an der Pathogenese mehrerer neurodegenerativer Erkrankungen, wie auch der SCA3, beteiligt. In der Western Blot Analyse zeigte HSPA2 jedoch keine signifikanten Veränderungen zwischen den Genotypen der untersuchten Tiermodelle, und zwar unabhängig vom Alter der Tiere. In einer Studie von Petyuk et al., 2018 wurden zwei separate Serien (KRONOSII und RUSH) untersucht, um die Proteine in Netzwerken (Co-Expressions-Netzwerke, kausale prädiktive Netzwerke, resultierende prädiktive Netzwerkmodelle) zu analysieren. Später wurden die Ergebnisse in zwei verschiedenen Zelllinien ausgewertet. HSPA2 wurde in beiden Zelllinien als Haupttreiber der Amyloid- und β -Spiegel ausgemacht und war hochreguliert. Dies führte wiederum zu einem Anstieg der Amyloid- β 40- und Amyloid- β 42-Spiegel in APP-Mutantenzellen und zu einem signifikanten Anstieg von Mikrotubuli-assoziiertem Protein Tau und phosphoryliertem Tau in einer modifizierten Neurogliomlinie. HSPA2 scheint ein spezifischer Schlüsselregulator für Prozesse im Spätstadium von Morbus Alzheimer zu sein. Deshalb ist es wichtig, die Veränderungen der Gen- und Proteinexpressionen zu untersuchen, um die Pathogenese von Alzheimer im Spätstadium zu verstehen (Petyuk et al., 2018). In einer weiteren Studie wurde HSPA2 basierend auf den Datensätzen aus der NCBI-GEO-Datenbank in Alzheimer-Proben in Bezug zu Kontrollen signifikant hochreguliert gefunden. Die Kombination von drei Genen – *HSPA1A*, *HSPA2* und *HSPA8* – stellte eine gute Diagnose von Morbus Alzheimer anhand der *Receiver Operating Characteristic* Kurve dar. Somit gelten die drei HSP als potenzielle molekulare Biomarker für die Prognose der HSP70-Familie bei der Alzheimer-Krankheit und zeigen eine neue Perspektive der Diagnostik und Therapie für Morbus Alzheimer (Dong et al., 2022). Dieses Kapitel zeigt, dass die untersuchten Proteine potenzielle longitudinale Biomarker darstellen, jedoch benötigt es für die Zukunft weitere Untersuchungen. Hierzu zählt beispielsweise eine Studie auf Zellkultur-Ebene. In dieser Doktorarbeit wurde HSPA2 im Filter Trap in den homozygoten 18-monatigen SCA3 KI Mäusen in Bezug zu den heterozygoten 304Q Tieren und zu den Wildtypen hoch signifikant exprimiert gefunden. In der immunhistochemischen Färbung dagegen wurde keine Co-Aggregationsbildung entdeckt, jedoch eine intensivere Färbung der

homozygoten 304Q Mäusen als die der wildtypischen Tiere. Somit zeigen sich sowohl auf Western Blot- und Immunhistochemie-Ebene, dass das lösliche HSPA2 im Pathogeneseprozess der SCA3 hochreguliert, nicht aber während der Aggregatbildung in die ATXN3-spezifischen Aggregate eingeschlossen wird. Zudem fielen die Veränderungen im Stratum moleculare und Stratum granulosum im Gyrus Dentatus in den homozygoten SCA3 KI Mäusen auf. Dieses Ergebnis könnte eine wichtige Rolle spielen, da bekannt ist, dass HSPA2 im Gyrus Dentatus generell exprimiert wird (Vydra et al., 2009). Morbus Alzheimer ist vor allem durch die Bildung von A β -Plaques und Tau-Protein-Aggregaten gekennzeichnet (Zheng et al., 2019). Insbesondere die Hitzeschockprotein-Familie 70, zu der HSPA2 gehört, ist bedeutend für diesen Prozess, da sie Proteinfehlfaltungen, Tau-Spiegel und Toxizität bei der Alzheimer-Erkrankung reguliert (Campanella et al., 2018). Zudem kolokalisiert HSP70 die A β -Plaques und spielt eine Rolle an der neuroprotektiven Reaktion zur Unterdrückung der A β -Aggregation (Hoshino et al., 2011; Kakimura et al., 2002; Magrané et al., 2004). Darüber hinaus ist bekannt, dass HSP70 die Löslichkeit und die Bindung von Tau-Mikrotubuli fördert und die Bildung neurofibrillärer Knäuel verhindert (Dou et al., 2003). Weitere Studien von neurodegenerativen Erkrankungen speziell zu HSPA2 sind zum aktuellen Zeitpunkt nicht vorhanden. Dies verdeutlicht, dass das lösliche HSPA2 weiter untersucht werden muss, da HSPA2 im Aggregationsprozess eventuell eine Rolle spielen könnte.

Das letzte untersuchte Hitzeschockprotein in dieser Dissertation ist HSP27 (*heat shock protein family B (small) member 1*), das in verschiedenen Zelltypen und Geweben in bestimmten Stadien der Entwicklung und Differenzierung exprimiert (Garrido, 2002). Aufgrund der Expression von HSP27 wird das Überleben von Säugetierzellen gesteigert, welche vielen zytotoxischen Wirkstoffen ausgesetzt sind (Landry et al., 1989). HSP27 zeigte in der bioinformatischen Analyse eine runterregulierte Expression bei SCA3 KI Mäusen (Haas et al., 2022) im Alter von 12 Monaten in Bezug zu gleichaltrigen Wildtypen. Dieses Phänomen bestätigte sich in den Blut-Sequenzierungsdaten der schwer betroffenen SCA3 PatientInnen, welche ebenfalls im Vergleich zu präataktischen MutationsträgerInnen runterreguliert analysiert wurde. Im Western Blot wurden die homozygoten 304Q Tiere im Alter von 18 Monaten im Vergleich zu wildtypischen Mäusen im gleichen Alter jedoch signifikant hochreguliert gefunden. Auch die heterozygoten Mäuse mit 304 Glutaminen wurden in Bezug auf die gleichaltrigen

Wildtypen signifikant hochreguliert exprimiert. Der Proteinspiegel von HSP27 sinkt dramatisch in Gegenwart von expandiertem ATXN3 im Vergleich zu Zellen ohne mutiertem ATXN3 in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen (W. H. Chang et al., 2005; Wen et al., 2003). HSP27 unterdrückt mit anderen Hitzeschockproteinen die PolyQ-Toxizität (Chai et al., 1999; Wyttenbach et al., 2002). Darüber hinaus ist bekannt, dass HSP27 im neuronalen Gewebe einiger anderer neurodegenerativer Erkrankungen hochreguliert ist. Zu diesen Erkrankungen neben SCA3 gehören unter anderem Morbus Parkinson, amyotrophe Lateralsklerose und die Creutzfeld-Jacob-Krankheit (W. H. Chang et al., 2005; Renkawek et al., 1992, 1999; Vleminckx et al., 2002). Es muss davon ausgegangen werden, dass die Rolle von HSP27 bei der Pathogenese von SCA3 komplexer sein könnte als angenommen und eventuell eine veränderte Fähigkeit mutierter ATXN3 exprimierender Zellen widerspiegelt, um eine entsprechende Stressreaktion auszuüben. HSP27 muss auf mehreren Zellwegen untersucht werden, um die Auswirkungen von HSP27 für den Schutz vor Neurodegeneration zu verstehen, wodurch HSP27 bedeutend für die Entwicklung kausaler Therapien sein könnte (Hsieh et al., 2005) und dadurch als Biomarker in Betracht kommt. In einer Studie von Abisambra et al., 2010 wurde die Rolle von HSPA2 im Mechanismus der Entstehung von Morbus Alzheimer untersucht (Abisambra et al., 2010). Tau - eine Proteinuntereinheit und entscheidendes Kennzeichen der Alzheimer-Erkrankung - ist bedeutend für die Aufklärung der Progression von Morbus Alzheimer (Mandelkow & Mandelkow, 2012). Das phosphorylierte HSP27 und Wildtyp-HSP27 konnten *in vitro* Tau-Aggregate binden und somit diese Aggregation verhindern. Jedoch war nur Wildtyp-HSP27 in der Lage, Tau aus dem Gehirn zu entfernen und so vor Funktionsdefiziten zu schützen. Die simuliert-phosphorylierte Form von HSP27 stabilisierte Tau im Gehirn. Dies bedeutet, dass HSP27 möglicherweise zwischen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Zuständen wechseln kann, um abnormale Tau-Proteine zu entfernen (Abisambra et al., 2010; Beretta & Shala, 2022). Es ist bekannt, dass kleine Hitzeschockproteine mit Aggregationsgefährdeten assoziierten Proteinen mit neurodegenerativen Erkrankungen interagieren und deshalb ihre Aggregation verhindert werden kann (Lindner et al., 1997; Rajaraman et al., 2001). Im Filter Trap mit HSP27 wurde keine signifikante Veränderung zwischen SCA3 KI Mäusen im Alter von 18 Monaten und gleichaltrigen Wildtypen gefunden. In SCA3-Hirngewebe und in Fibroblasten von SCA3-PatientInnen wurde

HSP27 mit einer erhöhten Expression nachgewiesen, was für eine frühe Stressreaktion zur langfristigen Verhinderung der Aggregation und Toxizität *in vivo* stehen kann. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Fibroblasten ähnlich wie neuronale Zellen auf mutierte Proteine reagieren, und könnten somit für zukünftige Studien verwendet werden (W. H. Chang et al., 2005; Zijlstra et al., 2010). HSP27 wurde im Gehirn von PatientInnen mit neurodegenerativen Erkrankungen – wie zum Beispiel SCA3 – hochreguliert gefunden (W. H. Chang et al., 2005; Evert et al., 2003). Auch der HSP27-Spiegel in Fibroblasten war bei den SCA3-PatientInnen deutlich höher als bei den KontrollprobandInnen (Zijlstra et al., 2010). Dies könnte auf eine konservierte, gewebeunabhängige Stressreaktion hinweisen, welche vor einer nachweisbaren Aggregationsbildung zustande kommt (W. H. Chang et al., 2005). Jedoch konnte keine Korrelation der HSP27-Werte mit dem *Age at Onset* herausgefunden werden (Zijlstra et al., 2010). In einer Huntington-Studie mit Ratten-Modellen verbesserte das hochregulierte HSP27 die striatale Degeneration (Perrin et al., 2007), jedoch konnten Zourlidou et al., 2007 nachweisen, dass sich diese Überexpression als Schutz des Krankheitsverlaufs von Mäusen mit Morbus Huntington als unwirksam erwies. (Zourlidou et al., 2007). In einer Studie von Bonavita et al., 2023 konnte in HSP27 hochregulierten Zellen die Sekretion beider Formen von Huntingtin nachgewiesen werden. Da die Sekretion im expandierten Protein viel mehr war als bei den Wildtypischen, kann dies darauf hindeuten, dass HSP27 aggregationsfähige Mutanten von Huntingtin bevorzugt sekretiert (Bonavita et al., 2023). Diese Ergebnisse passen somit zur Vermutung, dass HSP27 aufgrund seiner Disaggregationsaktivität die Aggregationsneigung von krankheitsassoziierten expandierten Proteinen verringert. Beispielhaft können hier Huntingtin (Morbus Huntington), α -Synuclein (Morbus Parkinson) und SOD1 (Morbus Parkinson) genannt werden (An et al., 2009; Mogk et al., 2018; Muranova et al., 2019; Vendredy et al., 2020; Wyttenbach et al., 2002; Zourlidou et al., 2004).

Neben den Hitzeschockproteinen wurden weitere Proteine und Chaperone untersucht, zu diesen gehört auch ACY3 (Aminoacylase 3), welches Acetylcystein und N-acetylierte aromatische Aminosäuren deacetyliert und in Maus-Modellen am häufigsten in Niere, Leber, Herz und Gehirn gefunden wurde (Pushkin et al., 2004). In der bioinformatischen Analyse wurde ACY3 unter anderem in den Sequenzierungsdaten der SCA3 KI Mäuse (Haas et al., 2022) im Alter von zwei Monaten im Vergleich zu gleichaltrigen

wildtypischen Tieren hochreguliert gefunden. Bei der Western Blot Analyse hingegen waren die Wildtypen in Bezug zu homozygoten SCA3 KI Mäusen hochreguliert, ebenso die heterozygoten 304Q Tiere im Vergleich zu den homozygoten Mäusen. Zudem wurde in der Dissertation mittels *Ingenuity Pathway Analysis* im Cerebellum der zwölfmonatigen transgenen YAC84Q Mäuse ACY3 hochreguliert in Bezug zu gleichaltrigen wildtypischen Tieren analysiert. Auch im Cerebellum der jüngeren transgenen Mäuse im Alter von 2 Monaten wurde eine erhöhte Expression von ACY3 in Bezug zu Wildtypen gefunden. In der Studie von Ramani et al., 2017 wurde ACY3 als potentieller Biomarker, mit welchem spezifisch der Krankheitsverlauf von SCA3 verfolgt werden kann, entdeckt. Auf Proteinebene wurde im Hirnstamm der SCA3-Erkrankten ACY3 hochreguliert analysiert. Zudem baut ACY3 enzymatisch N-Acetylaspartat ab, welches als ein häufig verwendeter Marker in der Magnetresonanztomographie gilt (Ramani et al., 2017). Dieser Marker ist in verschiedenen Subtypen der SCA und bei Morbus Huntington vermindert (Lopes et al., 2013). Eine erhöhte Expression von ACY3 in Oligodendrozyten (Nordengen et al., 2015) kann zu einem frühen Rückgang des N-Acetylaspartat bei SCA3 beitragen, wodurch sich N-Acetylaspartat als bildgebender Biomarker darstellen könnte, der eventuell auch bei präataktischen MutationsträgerInnen funktionieren würde. Zudem ist der ACY3-Proteinspiegel von SCA3-Hirnstamm-Proben in Bezug zu Hirnstamm-Proben von Morbus Alzheimer PatientInnen erhöht, was ein weiteres Zeichen für die Vorhersagekraft der SCA3 Erkrankung ist (Ramani et al., 2017). Auch bei Huntington-Chorea ist ACY3 in Maus-Modellen hochreguliert. Jedoch zeigt der RNA-Expressionsspiegel von ACY3 mit der Methode der quantitativen Echtzeit-PCR erst bei 12 und 24 Monate alten YAC128Q Tieren eine hohe Signifikanz. ACY3 könnte somit die Krankheitsmechanismen von Morbus Huntington aufklären, was eine große Bedeutung für das Verständnis der Pathologie von Morbus Huntington hätte (Becanovic et al., 2010). Somit könnte ACY3 ein möglicher longitudinaler Biomarker für neurodegenerative Erkrankungen wie SCA3 oder Huntington-Chorea sein. Dennoch fehlen hier unter anderem Versuche auf Zell-Ebene. Mit der Methode des Filter Traps wurde eine signifikante Veränderung zwischen heterozygoten und homozygoten SCA3 KI Mäusen mit 304Q nachgewiesen, was dafür spricht, dass ACY3 in Aggregaten bei den 304Q/304Q Tieren vermehrt eingebaut wird und somit am Aggregationsprozess beteiligt ist. Bisher gibt es keine Studien, welche belegen, dass ACY3 in der ATXN3 Aggregation

partizipiert ist. Dies müsste in der Zukunft mit Blick auf die Ergebnisse dieser Dissertation weiter untersucht werden.

Ein weiteres Protein, das in dieser Doktorarbeit untersucht wurde und wie ACY3 noch weiterer Forschung als möglicher Biomarker und in Hinblick auf Aggregation bedarf, ist CA9 (Carbonsäureanhydrase 9). Dieses ist ein pH-regulierendes Transmembranprotein und katalysiert zur Aufrechterhaltung der intrazellulären pH-Homöostase die reversible Hydratation von Kohlendioxid (Hilvo et al., 2008). In der bioinformatischen Auswertung dieser Dissertation wurde CA9 in den SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) sowohl im Alter von 2 als auch von 12 Monaten runterreguliert in Bezug zu den entsprechenden gleichaltrigen Wildtypen gefunden. Im Netzwerk der zweimonatigen SCA3 KI Mäuse wurde CA9 mit ATXN3 in Verbindung analysiert. Bei dem Datensatz der SCA3 PatientInnen, bei denen *post-mortem* das Cerebellum für *Ingenuity Pathway Analysis* untersucht wurde, wurde CA9 hochreguliert in Bezug zu Kontrollpersonen ermittelt. CA9 wurde in einer Studie zur Alzheimer Erkrankung exprimiert gefunden und könnte somit auch als Biomarker für Morbus Alzheimer gelten (B. Wang et al., 2022). Aktuell gibt es zu CA9 keine weiteren Studien im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen. Dies gestaltet sich ebenso bei der Aggregationsbildung. Hier gibt es aktuell keine Studien zu neurodegenerativen Erkrankungen. Dennoch deuten die Daten dieser Dissertation darauf hin, dass CA9 vermehrt in ATXN3 Aggregaten eingebaut wird. Denn mit der Methode des Filter Traps wurden signifikante Veränderungen zwischen wildtypischen und heterozygoten als auch zwischen heterozygoten und homozygoten 304Q Mäusen und eine hohe Signifikanz zwischen wildtypischen und homozygoten SCA3 KI Tieren nachgewiesen. Es müsste in Zukunft die Aggregation mittels Immunhistochemie im Zeitverlauf in SCA3 Maus-Modellen untersucht werden, um weitere Erkenntnisse zu erlangen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die untersuchten Hitzeschockproteine potenzielle longitudinale Biomarker sind und eine Rolle im Aggregationsprozess spielen. Ferner sind ACY3 und CA9 wahrscheinlich in ATXN3 Aggregaten eingebaut. Zukünftig müssen die möglichen Biomarker im Hinblick auf den Pathogeneseprozess von SCA3 und/oder eine kausale Therapie validiert werden.

In der Dissertation wurden OTOF, SUSD1 und SFT2D2, welche in Nicole Vasilenkos Masterarbeit in longitudinalen humanen Blutproben bei RNA-Sequenzierungen und bioinformatischen Analysen exprimiert waren, als mögliche longitudinale Biomarker untersucht. OTOF (Otoferlin) wirkt bei der Membranfusion und in endozytischen, sekretorischen und lysosomalen Wegen mit (Roux et al., 2006) und wurde in der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) – bioinformatischen Analyse – in den Blut-RNA-Sequenzierungsdaten hochreguliert gefunden. Anhand des SARA-Scores (Schmitz-Hübsch et al., 2006) werden SCA3 PatientInnen je nach Schwere der Erkrankung in verschiedene Gruppen aufgeteilt, wodurch sich die Einteilung in mild, moderat und schwer ergibt. Zudem werden die SCA3 MutationsträgerInnen mit einem SARA Score $\leq 2,5$ in die präataktische Gruppe zugeordnet. Bei der bioinformatischen Auswertung von OTOF wurde dieses in präataktischen ProbandInnen hochreguliert gefunden im Vergleich zu mild betroffenen SCA3 PatientInnen. Dies spricht für einen potenziellen Blut-basierten Biomarker für die Unterscheidung zwischen präataktischen Personen und SCA3 Erkrankten mit milder Form. Bisher gibt es keine Literatur mit OTOF im Bezug zur Spinozerebellären Ataxie Typ3, jedoch wurde OTOF in einer Studie von Wu et al., 2021 mit MPTP-behandelte Fledermäusen, welche als neuartiges Tiermodell für die Parkinson-Krankheit gelten, runterreguliert gefunden. Diese Fledermäuse zeigten verschiedene Symptome wie Stimm-, Hör-, Orientierungs- und Bewegungsstörungen, welche mit den Symptomen der menschlichen Parkinson-Krankheit übereinstimmen. Der Hörverlust konnte teils auf eine verminderte Expression von OTOF im unteren Colliculus zurückgeführt werden (W. J. Wu et al., 2021). Das heißt, bei Tiermodellen für Morbus Parkinson haben die MPTP-behandelten Fledermäuse eine runterregulierte OTOF-Expression und bei der bioinformatischen Analyse der Blut-Sequenzierungen weisen die mild betroffenen SCA3 PatientInnen eine geringere Expression von OTOF in Bezug zu präataktischen MutationsträgerInnen auf. OTOF ist ein kugelförmiges Protein (Jumper et al., 2021; Omasits et al., 2014), welches durch seine C-terminale Domäne an der Vesikelmembran und bzw. oder Plasmamembran verankert ist und deren N-terminalen Ca^{2+} -empfindlichen C2-Domänen sich im Zytosol befinden, und kann aufgrund der C2-Domänen durch die Ca^{2+} -Bindungs- und Phospholipid-bindenden Aktivitäten bei der Membranfusion und bei endozytischen, sekretorischen und lysosomalen Wegen mitwirken (Leclère & Dulon, 2023). Otoferlin gilt somit als Calcium-Sensor

(Ramakrishnan et al., 2014). Es ist wichtig zu erwähnen, dass kalziumabhängige Calpain-Proteasen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von SCA3 spielen. Wenn somit die intrazelluläre Calciumhomöostase reguliert und der ATXN3-Spaltungsweg manipuliert werden kann, könnten Fortschritte in Ansätzen zur kausalen Therapie gemacht werden (Hübener et al., 2013). Zudem ist bekannt, dass OTOF in Oligodendrozyten im Gehirn exprimiert ist (<https://tabula-muris.ds.czbiohub.org>, zuletzt abgerufen am 24.09.2023 um 12.58 Uhr). Dies ist wichtig, denn bei SCA3 sterben Oligodendrozyten noch vor den Neuronen, was daran liegt, dass Oligodendrozyten eine integrale Rolle in myelinreichen Strukturen der weißen Substanz spielen (Kang et al., 2014; Rüb et al., 2008). Die weiße Substanz im Hirnstamm ist nämlich ein frühes Krankheitszeichen bei der SCA3 (Guimarães et al., 2013; Kang et al., 2014). Die Beweise einer Oligodendrozyten-Dysfunktion bei einer SCA3 Erkrankung werden vor allem durch Studien mit Maus-Modellen im Spätstadium – wie YAC84Q Mäuse oder SCA3 KI Mäuse mit 304Q – bekräftigt (Costa et al., 2020; Haas et al., 2022; Ramani et al., 2017; Schuster et al., 2022; Toonen et al., 2018). Nicht nur bei SCA3 wurden Veränderungen in der weißen Substanz ausgemacht, sondern auch bei anderen PolyQ-Erkrankungen. Bei Huntington-Maus-Modellen mit 250Q wurden frühe Myelinisationsdefekte gefunden, die wahrscheinlich durch eine veränderte Oligodendrozyten-Differenzierung zustande kam. Darüber hinaus entstehen durch das überexprimierte Huntingtin Verhaltensdefizite in Oligodendrozyten und eine erhöhte Demyelinisierung bei den Mäusen (Jin et al., 2015). Diese Studie bekräftigt die Hypothese, dass es aufgrund der Expression von expandiertem ATXN3 in Oligodendrozyten zur Beeinträchtigung der korrekten Myelinisierung und zu neuronalen Zellschäden kommen kann (Haas et al., 2022; Jin et al., 2015). Diese Hypothese könnte einen häufigen Mechanismus darstellen, welcher zu neurodegenerativen Erkrankungen wie SCA3, Morbus Huntington und Morbus Parkinson führen könnte (Hentrich et al., 2020). Deshalb ist OTOF, welches in Oligodendrozyten exprimiert ist, in Hinblick auf die SCA3 Pathogenese interessant und wurde deshalb in dieser Dissertation als möglicher longitudinaler Biomarker untersucht. Das in Oligodendrozyten exprimierte Otoferlin könnte somit ein Gehirn-basierte Biomarker sein. Denn OTOF konnte in der bioinformatischen Analyse auch in Sequenzierungsdaten im Cerebellum von zwölfmonatigen transgenen Mäusen (YAC84Q, (Cemal et al., 2002)) in Bezug zu gleichaltrigen wildtypischen Tieren überexprimiert gefunden werden. Zudem konnte

durch die Analyse auf dem GTEx Portal berechnet werden, in welchen Geweben OTOF am meisten exprimiert ist, und dabei ergab sich, dass im Gehirn, insbesondere im Hippocampus, Hypothalamus und in den Basalganglien die stärkste Expression vorliegt (<https://www.gtexportal.org/home/gene/OTOF>, zuletzt abgerufen am 08.09.2023 um 11.11 Uhr). Dies ist von Bedeutung, denn in YAC84Q Mäusen wurden eine Degeneration der Zellen und nukleäre Einschlüsse in Pons, Cerebellum, Nuclei cerebelli, Hippocampus, Gyrus Dentatus und Substantia nigra nachgewiesen (Cemal et al., 2002). Dies legt nahe, dass zukünftige Studien unter anderem in immunhistochemischen Schnitten mit SCA3 KI 304Q oder YAC84Q Mäusen zu OTOF forschen könnten.

Neben OTOF wurde auch SUSD1 (*sushi domain containing 1*), welches ebenfalls in Nicole Vasilenko Masterarbeit differentiell exprimiert gefunden wurde und wie OTOF an Signalwegen mit Calcium beteiligt ist (Clark et al., 2003), in dieser Doktorarbeit untersucht. SUSD1 – gesteuert durch DNA-Methylierung – ist sowohl für die Entwicklung einer epigenetischen Signatur erforderlich als auch bei venösen Thromboembolien beteiligt (Tang et al., 2013). Es ist bekannt, dass SUSD1, welches an verschiedenen zellulären Funktionen und Signalwegen wie der Calciumionenbindung beteiligt ist (Clark et al., 2003), in neurokognitiven Behinderungen ein potentielles Krankheitsgen sein könnte (Nilsson et al., 2017). Eines der Krankheitssymptome bei der SCA3 ist die Ataxie, welche aufgrund des neuronalen Verlustes im Cerebellum und weiteren motorischen Kontrollregionen auftritt. Anhand eines humanen Protein-Protein-Interaktionsnetzwerkes von Ataxie assoziierten Proteinen konnte mittels *Gene Ontology* ein Netzwerk gebildet werden, das aufzeigt, dass Ataxie verursachende Gene gemeinsame molekulare Wege teilen könnten (Lim et al., 2006). Diese scheinen an der mitochondrialen Dysfunktion, am zytoskeletalen Transport, an der Genomstabilität und an der Calciumhomöostase beteiligt zu sein (Takahashi et al., 2010). Dies könnte mit SUSD1 in Korrelation stehen, welches an der Calciumionenbildung beteiligt ist (Clark et al., 2003). Im GTEx Portal wurde SUSD1 mit einer Genexpression von 10,71 TPM (*transcripts per million*) im Vollblut von gesunden ProbandInnen gefunden (<https://www.gtexportal.org/home/gene/SUSD1>, zuletzt abgerufen am 24.09.2023 um 14.36 Uhr). In Blut-basierten Sequenzierungsdaten wurde SUSD1 in dieser Dissertation bei präataktischen Personen in Bezug zu mild betroffenen SCA3 PatientInnen hochreguliert analysiert, genauso auch bei schwer Erkrankten in Bezug zu präataktischen

MutationsträgerInnen. Bei präataktischen ProbandInnen in Bezug zu Kontrollpersonen wurde SUSD1 mit runterregulierter Expression ausgemacht. Mit der qPCR, bei welcher zehn präataktische Personen mit zehn schwer Erkrankten verglichen wurden, konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede berechnet werden. In einer Studie von Glavan et al., 2021, bei welcher mit der Methode der quantitativen Echtzeit-PCR gearbeitet wurde, wurden bei Suizid gefährdeten Personen Genexpressionsänderungen von SUSD1 identifiziert, die im Zusammenhang mit einer regionsspezifischen dysregulierten Manifestation genetischer und epigenetischer Mechanismen und neurologischen Entwicklungsstörungen stehen (Glavan et al., 2021). Darüber hinaus wurden potenzielle plasmabasierte Biomarker, welche für die Darstellung der molekularen Vielfalt in Zusammenhang mit Morbus Alzheimer bedeutend wären und wodurch ein besseres Verfolgen der Pathogenese von Alzheimer und eine Entwicklung von kurativen Therapien möglich wäre, nachgewiesen. Zu diesen vielversprechendsten Biomarker gehört unter anderem SUSD1, welches eine Unterscheidung zwischen Morbus Alzheimer und Lewy-Körper-Demenz am stärksten leisten konnte. Außerdem konnten mehrere Proteine – wie auch SUSD1 – leicht kognitiv beeinträchtigte Alzheimer-PatientInnen von Kontrollpersonen unterscheiden, da jene Proteine zwischen diesen beiden Gruppen signifikante Expressionsunterschiede aufwiesen (Bellomo et al., 2023). Aber auch als Biomarker im Gehirn könnte SUSD1 möglicherweise eine Rolle spielen, da in der bioinformatischen Analyse im Cerebellum die zweimonatigen YAC84Q Mäuse in Bezug zu gleichaltrigen wildtypischen Mäusen hochreguliert exprimiert wurden und im Datensatz der SCA3 PatientInnen SUSD1 in Bezug zu Kontrollpersonen eine Runterregulation zeigt. Zudem zeigen die Daten im GTEx Portal, dass SUSD1 im Gehirn von Kontrollpersonen exprimiert ist (<https://www.gtexportal.org/home/gene/SUSD1>, zuletzt abgerufen am 24.09.2023 um 14.36 Uhr); somit könnten zukünftige Versuche mit Maus- oder *post-mortem* PatientInnen-Gehirngewebe Sinn machen, um mehr über SUSD1 und dessen Beziehung zu SCA3 zu erfahren.

Neben SUSD1 und OTOF wurde auch SFT2D2 mittels bioinformatischer Analyse und quantitativer Echtzeit-PCR untersucht. SFT2D2 (*SFT2 domain containing 2*) ist ein Vesikeltransporter von Multipassmembranen und in humanen Gehirnregionen von PatientInnen mit Schizophrenie erhöht exprimiert. SFT2D2 wird vor allem in immunbezogenen Zellen, wie den Mikroglia im Zentralen Nervensystem (ZNS) und

dendritischen Zellen im Peripheren Nervensystem (PNS) exprimiert (Liu et al., 2022). Die Daten zeigen, dass zwischen der Pathogenese von SCA3 und dem oxidativen Stress eine enge Korrelation vorliegt und die Hemmung von oxidativem Stress ein Ziel für die Entwicklung von Therapeutika der Anit-PolyQ-Aggregation sein könnte (K. H. Chang et al., 2014; Y. L. Wu et al., 2018; Yu et al., 2009). Bei SCA3-PatientInnen und SCA3-Mäusen wurden erhöhte proinflammatorische Zytokine, reaktive Astrozyten und aktivierte Mikroglia im Gehirnbereich Pons nachgewiesen (Duarte-Neves et al., 2015; Evert et al., 2001; Evert, Schelhaas, et al., 2006). In Studien mit Maus- und Fliegen-Modellen wurden aberrante Immunreaktionen gefunden, zudem ist bekannt, dass auch bei Morbus Huntington Entzündungen und eine mikrogliale Aktivierung zur Neurotoxizität bei dieser Erkrankung führen (Hsiao et al., 2013; Hübener et al., 2012; Palpagama et al., 2019; Shin et al., 2005; Snijder et al., 2016). Jedoch gibt es eine aktuelle Studie von Campos et al., 2022, welche beweist, dass Mikroglia keine wichtigen Faktoren für die Progression von SCA3 sind. Dennoch könnte SFT2D2, welches in Astrozyten exprimiert, relevant sein (<https://tabula-muris.ds.czbiohub.org>, zuletzt abgerufen am 29.10.2023 um 11.04 Uhr). SFT2D2 wurde in der bioinformatischen Auswertung in keinen Blut-basierten Sequenzierungen gefunden, aber im präfrontalen Cortex von zweimonatigen YAC84Q Mäusen (Cemal et al., 2002) wurde SFT2D2 hochreguliert in Bezug zu zwölfmonatigen transgenen Mäusen analysiert. SFT2D2 gilt als potenzieller Blut-basierter Parkinson-Biomarker für die Erkrankung und ist ein möglicher Faktor, der die Entwicklung von Morbus Parkinson beeinflussen könnte (Yao et al., 2022). Zudem ist SFT2D2 bei Parkinson PatientInnen in Bezug zu Kontrollpersonen runterreguliert (Yao et al., 2022) und ähnelt somit SFT2D2, welches in *Ingenuity Pathway Analysis* bei älteren YAC84Q Mäusen weniger reguliert ist als bei jüngeren transgenen Mäusen. Zwar konnte in der bioinformatischen Auswertung SFT2D2 nicht in Blut-Sequenzierungsdaten signifikant exprimiert gefunden werden, jedoch könnte die qPCR mit SFT2D2 Primern und Blut-RNA-Proben aus der ESMI-Studie Aufschluss geben. Jedoch müsste hierfür SFT2D2 im *One-Step* Verfahren noch etabliert werden. Somit müssen in Zukunft weitere Versuche mit SFT2D2 als möglicher Biomarker durchgeführt werden. Hierfür bieten sich potenzielle Forschungen zu SFT2D2 auf Protein- oder Zell-Ebene und weitere Versuche mit quantitativen Echtzeit-PCRs auf RNA-Ebene an.

In der Publikation von Raposo et al., 2023 wurde eine *cross-sectional* RNA-Sequenzierung mit 60 Vollblut-Proben von ESMI-ProbandInnen durchgeführt. LTBP4, SAFB2 und SFSWAP zeigten signifikant-veränderte Expressionen bei präataktischen MutationsträgerInnen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen, wodurch diese mit einer Wahrscheinlichkeit von 79% ($p = 0,002$) eine hohe kombinierte Fähigkeit haben, das präataktische Stadium von Kontrollen zu unterscheiden, wodurch diese „präataktisch“ klassifizieren können (Raposo et al., 2023). Aus diesem Grund sollten diese Gene jetzt auch longitudinal in einer größeren ESMI-Kohorte (über 270 ProbandInnen) weiterverfolgt werden. SFSWAP (*Spicing factor SWAP*) reguliert die RNA-Verarbeitung, das Spleißen und die Transkript-Verlängerung mit und gilt als RS-Domäne enthaltendes Protein (Twyffels et al., 2011). Bei Raposo et al., 2023 war SFSWAP bei präataktischen ProbandInnen in Bezug zu Kontrollpersonen signifikant erhöht, jedoch gab es keine signifikante Korrelation zwischen dem Expressionsniveau von SFSWAP und dem SARA-Score (Raposo et al., 2023). In dieser Dissertation wurde SFSWAP in den longitudinalen Sequenzierungen von *Ingenuity Pathway Analysis* nicht signifikant hoch- oder runterreguliert gefunden. Jedoch ist SFSWAP im Hinblick auf SCA3 interessant und sollte in weiteren Studien beispielsweise auf RNA-Ebene mit ESMI-Proben untersucht werden. SAFB2 (*scaffold attachment factor B2*) reguliert die Transkription und mRNA-Verarbeitung, zelluläre Reaktion auf Stress und DNA-Reparatur (Norman et al., 2016). In der Studie von Raposo et al., 2023 wurde SAFB2 bei den präataktischen SCA3-MutationsträgerInnen in Bezug zu Kontrollpersonen signifikant hochreguliert gefunden. Es wurde keine signifikanten Korrelationen zwischen den Expressionsniveaus von SAFB2 und dem SARA-Score nachgewiesen. Darüber hinaus zeigten SCA3-PatientInnen mit einem früheren Erkrankungsalter erhöhte Expressionsniveaus von SAFB2. Des Weiteren konnte ein Anstieg des SAFB2-Spiegels von den SCA3-PatientInnen bei den folgenden Sitzungen – Follow Up – im Vergleich zu den ersten Sitzungen – Baseline – nachgewiesen werden; dies zeigte sich bei den präataktischen MutationsträgerInnen jedoch nicht. Die SAFB-Familie gilt als potenzieller Modifikator der DNA-Reparatur und Raposo et al., 2023 stellte die Hypothese auf, dass die Ergebnisse der Forschung zu SAFB2 mit einer Hemmung der DNA-Reparatur verbunden sein könnten. Dies würde eine Zunahme der somatischen Expansion in Blutzellen und eventuell im Cerebellum implizieren (Raposo et al., 2023). Aufgrund

dieser *cross-sectionalen* Forschung wurde SAFB2 in der Doktorarbeit bioinformatisch anhand von RNA-Sequenzierungsdaten ausgewertet. SAFB2 wurde bei den SCA3 PatientInnen, bei denen *post-mortem* Cerebellum als Gewebe für RNA-Sequenzierung genommen wurde, hochreguliert in Bezug zu Kontrollpersonen nachgewiesen; dies bekräftigt die Ergebnisse von Raposo et al., 2023. Auch in der Forschung potenzieller Biomarker für die Alzheimer-Diagnose wurde SAFB2 als potenzieller Biomarker entdeckt. In der Studie von Wang und Wang 2020 wurden mehrere Gewebe wie Hippocampus, Gyrus temporalis, Gyrus frontalis und das Vollblut verwendet und mittels bioinformatischer Analysen die Funktionen der differentiell exprimierten Gene näher betrachtet. Hierbei viel SAFB2 auf, SAFB2 könnte also ein potenzieller Biomarker von Morbus Alzheimer sein (Y. Wang & Wang, 2020). Des Weiteren wurde LTBP4 (*latent transforming growth factor beta binding protein 4*), welches TGF β bindet und dieses in der extrazellulären Matrix sequestriert, um seine Verfügbarkeit für den TGF β -Rezeptor zu modulieren (Su & Urban, 2021), bei präataktischen MutationsträgerInnen signifikant runterreguliert in Bezug zu Kontrollpersonen gefunden (Raposo et al., 2023). In dieser Doktorarbeit ergaben die bioinformatischen Analysen eine runterregulierte Expression von LTBP4 im *post-mortem* Cerebellum der SCA3 PatientInnen im Vergleich zu gesunden ProbandInnen, was mit den Ergebnissen von Raposo et al., 2023 übereinstimmt. In einer Studie von Kato et al., 2021 wurde Candesartan untersucht, welches das Fortschreiten der Arteriopathie bei der zerebralen autosomal-rezessiven Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie verhindert. Aufgrund einer Arteriopathie führt die zerebrale Kleingefäßerkrankung zu Demenz und Gangstörungen. Jedoch wurde durch Candesartan die Genexpression von LTBP4, welches aufgrund der verringerten Aktivität von HTRA1 akkumuliert, nur leicht geschwächt (Kato et al., 2021). Candesartan – ein nicht-peptid-Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist – hemmt die Bindung von Angiotensin II an den AT1 Rezeptor selektiv. Das Medikament kann während der Absorption in seine aktiven Metaboliten umgewandelt werden und ist stark an Eiweiß mit kleinem Verteilungsvolumen gebunden. Die Halbwertszeit von Candesartan beträgt neun Stunden. Das Arzneimittel ist zur Anwendung bei Herzinsuffizienz zugelassen, jedoch scheint das Medikament weiteren Nutzen zu bieten, der noch untersucht werden muss (Easthope & Jarvis, 2002; Ripley et al., 2006).

Diskussion

Zusammenfassend wurden mehrere potenzielle Biomarker bezüglich SCA3-Pathogenese und bzw. oder kurative Therapie gefunden, jedoch bedarf es weiterer Forschung zu diesen Biomarker-Kandidaten, da sie in dieser Dissertation noch nicht auf jeder Ebene untersucht werden konnten. Somit müssen zukünftig weitere Versuche unternommen werden, um den Einfluss dieser Biomarker-Kandidaten auf die Pathogenese der SCA3 zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) wird autosomal-dominant vererbt und gilt als seltene Erkrankung. Der Pathomechanismus dieser Polyglutamin-Erkrankung beruht auf einer erhöhten Anzahl der CAG-Wiederholungen auf dem *Ataxin-3* Gen, wodurch es zu fehlerhaften Faltungen und Akkumulationen des Ataxin-3 Proteins kommt. Aktuell existiert keine kurative Therapie, weshalb nur eine symptomatische Behandlung angeboten werden kann. Um die Pathogenese besser zu verstehen und die Medikamenten-Entwicklung voran zu treiben, sind Biomarker von Nöten. Solche Biomarker sollten Unterschiede im Erkrankungszustand von PatientInnen und von präataktischen MutationsträgerInnen auf gesunde Kontrollen aufzeigen. Hitzeschockproteine, welche die Faltung von Adenosin-5'-triphosphat regulierten Zyklen der Proteinbindung und -freisetzung fördern und weil durch die Bindung nichtnativer Proteine eine Blockade der Aggregation und Umkehrung fehlgefalteter Zustände entsteht, sind aktuell von großem Interesse bei der Forschung zu neurodegenerativen Erkrankungen, da beispielsweise bei Morbus Huntington, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer in *post-mortem* Gehirnproben Proteinaggregate gefunden wurden. Ein Hitzeschockprotein-assoziiertes Medikament könnte somit eine wesentliche Rolle bei der Behandlung von neurodegenerativ erkrankten PatientInnen spielen. Außerdem gibt es die Hypothese, dass bestimmte Hitzeschockproteine durch Aktivitätssteigerung oder Expressionsveränderung bei der Verzögerung des Ausbruchs von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sein könnten. Da SCA3 zu den seltenen Erkrankungen gehört, ist es schwierig, eine adäquate Kohortenstärke abzubilden. Deshalb wurde das ESMI-Projekt – *European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative* – ins Leben gerufen, welches als eine multizentrische europäische Studie angelegt wurde.

In dieser Arbeit sollten mögliche longitudinale Biomarker validiert werden, die bisher unter anderem in *cross-sectional* Studien und bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen gefunden wurden. Zu den untersuchten Proteinen gehören: OTOF, SUSD1, SFT2D2, ACY3, CA9, LTBP4, SAFB2, SFSWAP, DNAJC13, HDJ2, HSP27, HSPA2, HSP105. Diese wurden zuerst alle mittels bioinformatischer Auswertung untersucht. Hierfür dienten RNA-Sequenzierungsdatensätze des ESMI-Projekts, eine Studie mit SCA3 KI Mäusen mit 304 Glutaminen und einer Studie mit SCA3 YAC84Q

Zusammenfassung

Mäusen als Grundlage. Darüber hinaus wurden mehrere mögliche Biomarker auf RNA- und Protein-Ebene validiert. Dafür wurde für OTOF, SUSD1 und SFT2D2 die quantitative Echtzeit-PCR zur Detektion von RNA-Expressionsunterschieden und für ACY3, CA9, DNAJC13, HDJ2, HSP27, HSPA2 und HSP105 verschiedene Protein-biochemische Verfahren einschließlich Western Blot, Filter Trap und Immunhistochemie ausgewählt. Zusätzlich wurde untersucht, welche Hitzeschockproteine bei dem Aggregationsprozess in SCA3 Mausgehirnen in Bezug zu Kontrolltieren beteiligt sind. Teilweise konnte diese Promotion signifikante Expressionsunterschiede aufzeigen bzw. weitere Hitzeschockproteine identifizieren, welche in dem Aggregationsprozess beteiligt sind, was den Schluss zulässt, dass neue Biomarker für die Pathogenese der Krankheit und bzw. oder für kurative Therapieansätze eine Rolle spielen. Jedoch wurden in dieser Doktorarbeit die Kandidaten-Biomarker nicht ausreichend beleuchtet, sodass weitere Versuche notwendig sind. Hier würden sich weitere Versuche auf Zell-Ebene oder auf RNA-Ebene mit ESMI-ProbandInnen anbieten.

6 Literaturverzeichnis

- Abisambra, J. F., Blair, L. J., Hill, S. E., et al. Phosphorylation dynamics regulate Hsp27-mediated rescue of neuronal plasticity deficits in tau transgenic mice. *J. Neurosci.* 2010;30(46):15374–15382. doi:10.1523/JNEUROSCI.3155-10.2010
- Albrecht, M., Hoffmann, D., Evert, B. O., et al. Structural modeling of ataxin-3 reveals distant homology to adaptins. *Proteins.* 2002;50(2):355–370. doi:10.1002/prot.10280
- An, J. J., Lee, Y. P., Kim, D. W., et al. Transduced HSP27 protein protects neuronal cell death by enhancing FALS-associated SOD1 mutant activity. *BMB Rep.* 2009;42(3):136–141. doi:10.5483/BMBREP.2009.42.3.136
- Antony, P. M. A., Mäntele, S., Mollenkopf, P., et al. Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol. Dis.* 2009;36(2):280–292. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.020
- Appel-Cresswell, S., Rajput, A. H., Sossi, V., et al. Clinical, positron emission tomography, and pathological studies of DNAJC13 p.N855S Parkinsonism. *Mov Disord.* 2014;29(13):1684–1687. doi:10.1002/mds.26019
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science.* 2016;353(6294):aac4354. doi:10.1126/science.aac4354
- Balusu, S., Prashberger, R., Lauwers, E., De Strooper, B., & Verstreken, P. Neurodegeneration cell per cell. *Neuron.* 2023;111(6):767–786. doi:10.1016/j.neuron.2023.01.016
- Becanovic, K., Pouladi, M. A., Lim, R. S., et al. Transcriptional changes in Huntington disease identified using genome-wide expression profiling and cross-platform analysis. *Hum Mol Genet.* 2010;19(8):1438–1452. doi:10.1093/hmg/ddq018
- Becker, J., & Craig, E. A. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem.* 1994;219(1–2):11–23. doi:10.1007/978-3-642-79502-2_2
- Bellomo, G. Plasma protein profiling reveals novel specific biomarkers reflecting the multifactorial nature of Alzheimer's disease continuum. Conference/Paper presented at: Alzheimer's Association International Conference; July 20, 2023; Philadelphia, USA
- Beretta, G., & Shala, A. L. Impact of Heat Shock Proteins in Neurodegeneration: Possible Therapeutical Targets. *Ann Neurosci.* 2022;29(1):71–82. doi:10.1177/09727531211070528
- Bettencourt, C., & Lima, M. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6(35). doi:10.1186/1750-1172-6-35
- Bettencourt, C., Santos, C., Montiel, R., et al. Increased transcript diversity: Novel splicing variants of Machado-Joseph Disease gene (ATXN3). *Neurogenetics.* 2010;11(2):193–202. doi:10.1007/s10048-009-0216-y
- Bichelmeier, U., Schmidt, T., Hübener, J., et al. Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: In vivo evidence. *J Neurosci.* 2007;27(28):7418–7428. doi:10.1523/JNEUROSCI.4540-06.2007
- Biomarkers Definitions Working Group, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95. doi:10.1067/MCP.2001.113989

- Bonavita, R., Scerra, G., Di Martino, et al. The HSPB1-p62/SQSTM1 functional complex regulates the unconventional secretion and transcellular spreading of the HD-associated mutant huntingtin protein. *Hum Mol Genet.* 2023;32(14):2269–2291. doi:10.1093/hmg/ddad047
- Braakman, I., & Hebert, D. N. Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(5):a013201. doi:10.1101/cshperspect.a013201
- Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Braga Neto, P., Pedroso, J. L., Kuo, S.-H., et al. Current concepts in the treatment of hereditary ataxias. *Arq Neuropsiquiatri.* 2016;74(3), 244–252. doi:10.1590/0004-282X20160038
- Breuer, P., Rasche, T., Han, X., et al. The Ratio of Expanded to Normal Ataxin 3 in Peripheral Blood Mononuclear Cells Correlates with the Age at Onset in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Mov Disord.* 2022;37(5):1098–1099. doi:10.1002/mds.28962
- Brocchieri, L., Conway De Macario, E., Macario, A. J. L. hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol Biol.* 2008;8(19). doi:10.1186/1471-2148-8-19
- Brockwell, D. J., & Radford, S. E. Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr Opin Struct Biol.* 2007;17(1), 30–37. doi:10.1016/j.sbi.2007.01.003
- Brooker, S. M., Edamakanti, C. R., Akasha, S. M., Kuo, S. H., & Opal, P. (2021). Spinocerebellar ataxia clinical trials: opportunities and challenges. *Ann Clin Transl Neurol.* 2021;8(7):1543–1556. doi:10.1002/acn3.51370
- Bundesministerium für Gesundheit. Seltene Erkrankungen. Accessed August 14, 2023. <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/seltene-erkrankungen.html>
- Burman, R. J., Watson, L. M., Smith, D. C., et al. Molecular and electrophysiological features of spinocerebellar ataxia type seven in induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* 2021;16(2):e0247434. doi:10.1371/journal.pone.0247434
- Burnett, B., Li, F., & Pittman, R. N. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet.* 2003;12(23):3195–3205. doi:10.1093/hmg/ddg344
- Campanella, C., Pace, A., Bavisotto, C. C., et al. Heat Shock Proteins in Alzheimer's Disease: Role and Targeting. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9) :2603. doi:10.3390/ijms19092603
- Carvalho, A. L., Silva, A., Macedo-Ribeiro, S. Polyglutamine-Independent Features in Ataxin-3 Aggregation and Pathogenesis of Machado-Joseph Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1049:275–288. doi:10.1007/978-3-319-71779-1_14
- Carvalho, D. R., La Rocque-Ferreira, A., Rizzo, I. M., Imamura, E. U., & Speck-Martins, C. E. Homozygosity Enhances Severity in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Pediatr Neurol.* 2008;38(4), 296–299. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2007.12.006
- Cemal, C. K., Carroll, C. J., Lawrence, L., et al. YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(9):1075-94. doi:10.1093/hmg/11.9.1075

- Chai, Y., Koppenhafer, S. L., Bonini, N. M., Paulson, H. L. Analysis of the Role of Heat Shock Protein (Hsp) Molecular Chaperones in Polyglutamine Disease. *J Neurosci.* 1999;19(23):10338–10347. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-23-10338.1999
- Chang, K. H., Chen, W. L., Wu, Y. R., et al. Aqueous extract of *Gardenia jasminoides* targeting oxidative stress to reduce polyQ aggregation in cell models of spinocerebellar ataxia 3. *Neuropharmacology.* 2014;81:166–175. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.01.032
- Chang, W. H., Cemal, C. K., Hsu, Y. H., et al. Dynamic expression of Hsp27 in the presence of mutant ataxin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336(1):258–267. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.065
- Choi, H., Kim, H. J., Yang, J., et al. Acetylation changes tau interactome to degrade tau in Alzheimer's disease animal and organoid models. *Aging Cell,* 2020;19(1):e13081. doi:10.1111/acer.13081
- Chou, A.-H., Chen, C.-Y., Chen, S.-Y., et al. Polyglutamine-expanded ataxin-7 causes cerebellar dysfunction by inducing transcriptional dysregulation. *Neurochem Int.* 201;56(2):329–339. doi:10.1016/j.neuint.2009.11.003
- Chung, C. H., & Baek, S. H. Deubiquitinating Enzymes: Their Diversity and Emerging Roles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;266(3):633-640. doi:10.1006/bbrc.1999.1880
- Clark, H. F., Gurney, A. L., Abaya, E., et al. The Secreted Protein Discovery Initiative (SPDI), a Large-Scale Effort to Identify Novel Human Secreted and Transmembrane Proteins: A Bioinformatics Assessment. *Genome Res.* 2003;13(10):2265-2270. doi:10.1101/gr.1293003
- Coarelli, G., Brice, A., Durr, A. Recent advances in understanding dominant spinocerebellar ataxias from clinical and genetic points of view. *F1000Res.* 2018;7(F1000).version 1; peer review: 3 approved. doi:10.12688/f1000research.15788.1
- Costa, M. do C., & Paulson, H. L. Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol.* 2012; 97(2):239-57. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.11.006
- Costa, M. do C., Radzwion, M., McLoughlin, H. S., et al. In Vivo Molecular Signatures of Cerebellar Pathology in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Mov Disord.* 2020;35(10):1774–1786. doi:10.1002/mds.28140
- Cummings, C. J., Mancini, M. A., Antalffy, B., DeFranco, D. B., Orr, H. T., Zoghbi, H. Y. Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet.* 1998;19(2):148–154. doi:10.1038/502
- Da Silva, J. D., Teixeira-Castro, A., Maciel, P. From Pathogenesis to Novel Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 3: Evading Potholes on the Way to Translation. *Neurotherapeutics* 2019;16(4):1009–1031. doi:10.1007/s13311-019-00798-1
- D'Abreu, A., França, M. C., Yasuda, C. L., Campos, B. A. G., Lopes-Cendes, I., Cendes, F. Neocortical Atrophy in Machado-Joseph Disease: A Longitudinal Neuroimaging Study. *J Neuroimaging.* 2012;22(3):285–291. doi:10.1111/j.1552-6569.2011.00614.x
- Di Domenico, F., Sultana, R., Tiu, G. F., et al. Protein levels of heat shock proteins 27, 32, 60, 70, 90 and thioredoxin-1 in amnesic mild cognitive impairment: an investigation on the role of cellular stress response in the progression of Alzheimer disease. *Brain Res.* 2010;1333:72–81. doi:10.1016/j.brainres.2010.03.085

- Diallo, A., Jacobi, H., Cook, A., et al. Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol.* 2018;17(4):327–334. doi:10.1016/S1474-4422(18)30042-5
- Dickson, D. W. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2018;46(Suppl 1):30–33. doi:10.1016/j.parkreldis.2017.07.033
- Dinner, A. R., Šalib, A., Smitha, L. J., Dobson, C. M., Karplus, M. Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(7):331–339. doi:10.1016/S0968-0004(00)01610-8
- Dong, Y., Li, T., Ma, Z., Zhou, C., Wang, X., Li, J. HSPA1A, HSPA2, and HSPA8 Are Potential Molecular Biomarkers for Prognosis among HSP70 Family in Alzheimer's Disease. *Dis Markers.* 2022:9480398. doi:10.1155/2022/9480398
- Dou, F., Netzer, W. J., Tanemura, K., et al. Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(2):721–726. <https://doi.org/10.1073/PNAS.242720499>
- Dragovic, Z., Broadley, S. A., Shomura, Y., Bracher, A., Hartl, F. U. Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.* 2006;25(11):2519–2528. doi:10.1038/sj.emboj.7601138
- Duarte-Neves, J., Gonçalves, N., Cunha-Santos, J., et al. Neuropeptide Y mitigates neuropathology and motor deficits in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet.* 2015;24(19):5451–5463. doi:10.1093/hmg/ddv271
- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(7):a028035. doi:10.1101/cshperspect.a028035
dzne.de. Available: <https://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi/> [Accessed 19.08.23; 19.02 Uhr]
- Easthope, S. E., & Jarvis, B. Candesartan cilexetil: an update of its use in essential hypertension. *Drugs.* 2002;62(8):1253–1287. doi:10.2165/00003495-200262080-00016
- Ellisdon, A. M., Thomas, B., Bottomley, S. P. The Two-stage Pathway of Ataxin-3 Fibrillogenesis Involves a Polyglutamine-independent Step. *J Biol Chem.* 2006;281(25):16888–16896. doi:10.1074/jbc.M601470200
- Emard, O., Thouez, J., Gauvreau, D. Neurodegenerative diseases and risk factors: A literature review. *Soc Sci Med.* 1995;40(6):847-58. doi:10.1016/0277-9536(94)00138-j
ensembl.org. Available: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000107159;r=9:35673928-35681159 [Accessed 24.08.23; 16.30 Uhr]
- Eroglu, B., Moskophidis, D., Mivechi, N. F. Loss of Hsp110 leads to age-dependent tau hyperphosphorylation and early accumulation of insoluble amyloid beta. *Mol Cell Biol.* 2010;30(19):4626–4643. doi:10.1128/MCB.01493-09
- Evert, B. O., Araujo, J., Vieira-Saecker, A. M., et al. Ataxin-3 Represses Transcription via Chromatin Binding, Interaction with Histone Deacetylase 3, and Histone Deacetylation. *J Neurosci.* 2006;26(44):11474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2053-06.2006
- Evert, B. O., Schelhaas, J., Fleischer, H., et al. Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin Neuropathol.* 2006;25(6):272–281. PMID:17140157

- Evert, B. O., Vogt, I. R., Kindermann, C., et al. Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *J Neurosci.* 2001;21(15):5389–5396. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-15-05389.2001
- Evert, B. O., Vogt, I. R., Vieira-Saecker, A. M., et al. Gene Expression Profiling in Ataxin-3 Expressing Cell Lines Reveals Distinct Effects of Normal and Mutant Ataxin-3. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003;62(10):1006–1018. doi:10.1093/jnen/62.10.1006
- Fahl, C. N., Branco, L. M. T., Bergo, F. P. G., D’Abreu, A., Lopes-Cendes, I., França, M. C. Spinal Cord Damage in Machado-Joseph Disease. *Cerebellum.* 2015;14(2):128–132. doi:10.1007/s12311-014-0619-7
- Ferini-Strambi, L. Treatment options for restless legs syndrome. *Expert Opin Pharmacother.* 2009;10(4):545–554. doi:10.1517/14656560902793605
- Garrido, C. News and Commentary Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ.* 2002;9(5):483–485. doi:10.1038/sj.cdd.4401005
- Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286(3):433–442. doi:10.1006/bbrc.2001.5427
- Gaspar, C., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., et al. Ancestral Origins of the Machado-Joseph Disease Mutation: A Worldwide Haplotype Study. *Am J Hum Genet.* 2001;68(2):523–528. doi:10.1086/318184
- Giffard, R. G., Xu, L., Zhao, H., et al. Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J Exp Biol.* 2004;207(18):3213–3220. doi:10.1242/jeb.01034
- Girard, M., Poupon, V., Blondeau, F., McPherson, P. S. The DnaJ-domain protein RME-8 functions in endosomal trafficking. *J Biol Chem.* 2005;280(48):40135–40143. doi:10.1074/jbc.M505036200
- Glavan, D., Gheorman, V., Gresita, A., Hermann, D. M., Udristoiu, I., Popa-Wagner, A. Identification of transcriptome alterations in the prefrontal cortex, hippocampus, amygdala and hippocampus of suicide victims. *Sci Rep.* 2021;11(1):18853. doi:10.1038/s41598-021-98210-6
- Globas, C., Tezenas Du Montcel, S., Baliko, L., et al. Early Symptoms in Spinocerebellar Ataxia Type 1, 2, 3, and 6. *Mov Disord.* 2008;23(15):2232–2238. doi:10.1002/mds.22288
- Gonsior, K., Kaucher, G. A., Pelz, P., et al. PolyQ-expanded ataxin-3 protein levels in peripheral blood mononuclear cells correlate with clinical parameters in SCA3: a pilot study. *J Neurol.* 2021;268(4):1304-1315. doi:10.1007/s00415-020-10274-y
gtexportal.org. Available: <https://www.gtexportal.org/home/gene/OTOF> [Accessed 08.09.2023; 11.11 Uhr]
- gtexportal.org Available: <https://www.gtexportal.org/home/gene/SUSD1> [Accessed 24.09.2023; 14.36 Uhr]
- Guimarães, R. P., D’Abreu, A., Yasuda, C. L., et al. A multimodal evaluation of microstructural white matter damage in spinocerebellar ataxia type 3. *Mov Disord.* 2013;28(8):1125–1132. doi:10.1002/mds.25451
- Gustavsson, E. K., Trinh, J., Guella, I., et al. DNAJC13 genetic variants in parkinsonism. *Mov Disord.* 2015;30(2):273–278. doi:10.1002/mds.26064
- Haacke, A., Broadley, S. A., Boteva, R., Tzvetkov, N., Hartl, F. U., Breuer, P. Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and

- sequestration of non-expanded ataxin-3. *Hum Mol Genet.* 2006;15(4):555–568. doi:10.1093/hmg/ddi472
- Haas, E., Incebacak, R. D., Hentrich, T., et al. A Novel SCA3 Knock-in Mouse Model Mimics the Human SCA3 Disease Phenotype Including Neuropathological, Behavioral, and Transcriptional Abnormalities Especially in Oligodendrocytes. *Mol Neurobiol.* 2022;59(1):495–522. doi:10.1007/s12035-021-02610-8
- Haberhausen, G., Damian M. S., Leweke, F., Müller, U. Spinocerebellar ataxia, type 3 (SCA3) is genetically identical to Machado- Joseph disease (MJD). *J Neurol Sci.* 1995;132(1):71–75. doi:10.1016/0022-510x(95)90927-i
- Harding, A. E. The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the “the Drew family of Walworth.” *Brain.* 1982;105(Pt 1):1–28. doi:10.1093/brain/105.1.1
- Harding, A. E. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet.* 1983;1(8334):1151–1155. doi: 10.1016/s0140-6736(83)92879-9
- Hay, D. G., Sathasivam, K., Tobaben, S., et al. Progressive decrease in chaperone protein levels in a mouse model of Huntington’s disease and induction of stress proteins as a therapeutic approach. *Hum Mol Genet.* 2004;13(13):1389–1405. doi:10.1093/hmg/ddh144
- Hayes, S. A., & Dice, J. F. Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol.* 1996;132(3):255–258. doi:10.1083/jcb.132.3.255
- Hentrich, T., Wassouf, Z., Ehrhardt, C., et al. Increased expression of myelin-associated genes in frontal cortex of and *SNCA* overexpressing rats and Parkinson's disease patients. *Aging (Albany NY).* 2020;12(19):18889-18906. doi:10.18632/aging.103935.
- Hershenson, J., Haworth, A., Houlden, H. The inherited ataxias: Genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in research and clinical diagnostics. *Hum Mutat.* 2012;33(9):1324–1332. doi:10.1002/humu.22132
- Hilvo, M., Baranauskiene, L., Salzano, A. M., et al. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem.* 2008;283(41):27799–27809. doi:10.1074/jbc.M800938200
- Hoche, F., Seidel, K., Brunt, E. R., et al. Involvement of the auditory brainstem system in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2), type 3 (SCA3) and type 7 (SCA7). *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008;34(5):479–491. doi:10.1111/j.1365-2990.2007.00933.x
- Höglund, K., & Salter, H. Molecular biomarkers of neurodegeneration. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013;13(8):845–861. doi:10.1586/14737159.2013.850033
- Hoshino, T., Murao, N., Namba, T., et al. Suppression of Alzheimer’s disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J Neurosci.* 2011;31(14):5225–5234 doi:10.1523/JNEUROSCI.5478-10.2011
- Hsiao, H. Y., Chen, Y. C., Chen, H. M., Tu, P. H., Chern, Y. A critical role of astrocyte-mediated nuclear factor- κ B-dependent inflammation in Huntington’s disease. *Hum Mol Genet.* 2013;22(9):1826–1842. doi:10.1093/hmg/ddt036
- Hsieh, M., Tsai, H. F., Chang, W. H. HSP27 and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Cerebellum.* 2005;4(1):31–36. doi:10.1080/14734220410026248
- Hsu, J.-Y., Jhang, Y.-L., Cheng, P.-H., et al. The Truncated C-terminal Fragment of Mutant ATXN3 Disrupts Mitochondria Dynamics in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Models. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:196. doi:10.3389/fnmol.2017.00196

- Hübener, J., Casadei, N., Teismann, P., et al. Automated behavioral phenotyping reveals presymptomatic alterations in a SCA3 genetrapped mouse model. *J Genet Genomics*. 2012;39(6):287–299. doi:10.1016/j.jgg.2012.04.009
- Hübener, J., Vauti, F., Funke, C., et al. N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation. *Brain*. 2011;134(Pt 7):1925–1942. doi:10.1093/brain/awr118
- Hübener, J., Weber, J. J., Richter, C., et al. Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Hum Mol Genet*. 2013;22(3):508–518. doi:10.1093/hmg/ddt449
- Hübener-Schmid, J., Kuhlbrodt, K., Peladan, J., et al. Polyglutamine-Expanded Ataxin-3: A Target Engagement Marker for Spinocerebellar Ataxia Type 3 in Peripheral Blood. *Mov Disord*. 2021;36(11):2675–2681. doi:10.1002/mds.28749
- Ichikawa, Y., Goto, J., Hattori, M., et al. The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet*. 2001;46(7):413–422. doi:10.1007/s100380170060
- Ikeuchi, T., Igarashi, S., Takiyama, Y., et al. Non-Mendelian transmission in dentatorubral-pallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis. *Am J Hum Genet*. 1996;58(4):730–733. PMID:8644735
- Ilg, W., Brötz, D., Burkard, S., Giese, M. A., Schöls, L., Synofzik, M. Long-term effects of coordinative training in degenerative cerebellar disease. *Mov Disord*. 2010;25(13):2239–2246. doi:10.1002/mds.23222
- Jacobi, H., Rakowicz, M., Rola, R., et al. Inventory of non-ataxia signs (INAS): Validation of a new clinical assessment instrument. *Cerebellum*. 2013;12(3):418–428. doi:10.1007/s12311-012-0421-3
- Jahn, T. R., & Radford, S. E. The Yin and Yang of protein folding. *FEBS*. 2005;272(23):5962–5970. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05021.x
- Jana, N. R., Tanaka, M., Wang, G. H., Nukina, N. Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum Mol Genet*. 2000;9(13):2009–2018. doi:10.1093/hmg/9.13.2009
- Jin, J., Peng, Q., Hou, Z., et al. Early white matter abnormalities, progressive brain pathology and motor deficits in a novel knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2015;24(9):2508–2527. doi:10.1093/hmg/ddv016
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
- Kakimura, J.-I., Kitamura, Y., Takata, K., et al. Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J*. 2002;16(6):601–603. doi:10.1096/fj.01-0530fje
- Kampinga, H. H., & Bergink, S. Heat shock proteins as potential targets for protective strategies in neurodegeneration. *Lancet Neurol*. 2016;15(7):748–759. doi:10.1016/S1474-4422(16)00099-5
- Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14(1):105–111. doi:10.1007/s12192-008-0068-7
- Kang, J. S., Klein, J. C., Baudrexel, S., Deichmann, R., Nolte, D., Hilker, R. White matter damage is related to ataxia severity in SCA3. *J Neurol*. 2014;261(2):291–299. doi:10.1007/s00415-013-7186-6

- Kato, T., Manabe, R. I., Igarashi, H., et al. Candesartan prevents arteriopathy progression in cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy model. *J Clin Invest.* 2021;131(22):e140555. doi:10.1172/JCI140555
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet.* 1994;8(3):221–228. doi:10.1038/ng1194-221
- Klockgether, T., & Evert, B. Genes involved in hereditary ataxias. *Trends Neurosci.* 1998;21(9):413–418. doi:10.1016/s0166-2236(98)01315-0
- Klockgether, T., Mariotti, C., & Paulson, H. L. Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):24. doi:10.1038/s41572-019-0074-3
- Kumada, S., Hayashi, M., Mizuguchi, M., Nakano, I., Morimatsu, Y., Oda, M. Cerebellar degeneration in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol.* 2000;99(1):48–54. doi:10.1007/pl00007405
- Kuo, Y., Ren, S., Lao, U., Edgar, B. A., Wang, T. Suppression of polyglutamine protein toxicity by co-expression of a heat-shock protein 40 and a heat-shock protein 110. *Cell Death Dis.* 2013;4(10):e833. doi:10.1038/cddis.2013.351
- Labbadia, J., Cunliffe, H., Weiss, A., et al. Altered chromatin architecture underlies progressive impairment of the heat shock response in mouse models of Huntington disease. *J Clin Invest.* 2011;121(8):3306–3319. doi:10.1172/JCI57413
- Landry, J., Chr6tien, P., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L. A. Heat Shock Resistance Conferred by Expression of the Human HSP27 Gene in Rodent Cells. *J Cell Biol.* 1989;109(1):7–15. doi:10.1083/jcb.109.1.7
- Lane, C. A., Hardy, J., Schott, J. M. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2018;25(1):59–70. doi: 10.1111/ene.13439
- Leclère, J. C., & Dulon, D. Otoferlin as a multirole Ca²⁺ signaling protein: from inner ear synapses to cancer pathways. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1197611. doi:10.3389/fncel.2023.1197611
- Lei, L.-F., Yang, G.-P., Wang, J.-L., et al. Safety and efficacy of valproic acid treatment in SCA3/MJD patients. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016;26:55–61. doi:10.1016/j.parkreldis.2016.03.005
- Levine, B., & Kroemer, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell.* 2019;176(1–2):11–42. doi:10.1016/j.cell.2018.09.048
- Lim, J., Hao, T., Shaw, C., et al. A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell.* 2006;125(4):801–814. doi:10.1016/j.cell.2006.03.032
- Lima, M., Coutinho, P., Abade, A., Vasconcelos, J., Mayer, F. M. Causes of Death in Machado-Joseph Disease. *Arch Neurol.* 1998;55(10):1341–1344. doi:10.1001/archneur.55.10.1341
- Lima, M., & Raposo, M. Towards the Identification of Molecular Biomarkers of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3)/Machado-Joseph Disease (MJD). *Adv Exp Med Biol.* 2018;1049:309–319. doi:10.1007/978-3-319-71779-1_16
- Lin, C. H., Wu, Y. R., Kung, P. J., et al. The potential of indole and a synthetic derivative for polyQ aggregation reduction by enhancement of the chaperone and autophagy systems. *ACS Chem Neurosci.* 2014;5(10):1063–1074. doi:10.1021/cn500075u
- Lindner, R. A., Kapur, A., Carver, J. A. The Interaction of the Molecular Chaperone, α -Crystallin, with Molten Globule States of Bovine α -Lactalbumin. *J Biol Chem.* 1997;272(44):27722–27729. doi:10.1074/jbc.272.44.27722

- Liu, C., Shen, Z., Xu, Q., et al. The SFT2D2 gene is associated with the autoimmune pathology of schizophrenia in a Chinese population. *Front Neurol.* 2022;13:1037777. doi:10.3389/fneur.2022.1037777
- Long, P. M., Stradecki, H. M., Minturn, J. E., Wesley, U. V., Jaworski, D. M. Differential aminoacylase expression in neuroblastoma. *Int J Cancer.* 2011;129(6):1322–1330. doi:10.1002/ijc.25798
- Lopes, T. M., D’Abreu, A., Junior, M. C. F., et al. Widespread neuronal damage and cognitive dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurol.* 2013;260(9):2370–2379. doi:10.1007/s00415-013-6998-8
- Lopes-Cendes, I., Silveira, I., Maciel, P., et al. Limits of Clinical Assessment in the Accurate Diagnosis of Machado-Joseph Disease. *Arch Neurol.* 1996;53(11):1168–1174. doi:10.1001/archneur.1996.00550110120020
- Macedo-Ribeiro, S., Cortes, L., Maciel, P., Carvalho, A. L. Nucleocytoplasmic Shuttling Activity of Ataxin-3. *PLoS One.* 2009;4(6):e5834. doi:10.1371/journal.pone.0005834
- Maciel, P., Costa M. C., Ferro A., et al. Improvement in the Molecular Diagnosis of Machado-Joseph Disease. *Arch Neurol.* 2001;58(11):1821–1827. doi:10.1001/archneur.58.11.1821
- Maciel, P., Gaspar, C., DeStefano, A. L., et al. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet.* 1995;57(1):54–61. PMID:7611296
- Maciel, P., Gaspar, C., Guimarães, L., et al. Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)_n tract. *Eur J Hum Genet.* 1999;7(2):147–156. doi:10.1038/sj.ejhg.5200264
- Magrané, J., Smith, R. C., Walsh, K., Querfurth, H. W. Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J Neurosci.* 2004;24(7):1700–1706. doi:10.1523/JNEUROSCI.4330-03.2004
- Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(7):1–25. doi:10.1101/cshperspect.a006247
- Martins, S., Calafell, F., Wong, V. C. N., Sequeiros, J., Amorim, A. A multistep mutation mechanism drives the evolution of the CAG repeat at MJD/SCA3 locus. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(8):932–940. doi:10.1038/sj.ejhg.5201643
- Martins, S., Coutinho, P., Silveira, I., et al. Cis-acting factors promoting the CAG intergenerational instability in Machado-Joseph disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B(4):439–446. doi:10.1002/ajmg.b.30624
- Masino, L., Musi, V., Menon, R. P., et al. Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Lett.* 2003;549(1–3):21–25. doi:10.1016/s0014-5793(03)00748-8
- McLoughlin, H. S., Moore, L. R., Paulson, H. L. Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiol Dis.* 2020;134:104635. doi:10.1016/j.nbd.2019.104635
- Meira, A. T., Arruda, W. O., Ono, S. E., et al. Neuroradiological Findings in the Spinocerebellar Ataxias. *Tremor Other Hyperkinet Mov.* 2019;9:1–8. doi:10.7916/tohm.v0.682
- Meira, A. T., Pedroso, J. L., Boller, F., Franklin, G. L., Barsottini, O. G. P., Teive, H. A. G. Reconstructing the history of machado-joseph disease. *Eur Neurol.* 2020;83(1):99–104. doi:10.1159/000507191

- Mogk, A., Bukau, B., Kampinga, H. H. Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Mol Cell*. 2018;69(2):214–226. doi:10.1016/j.molcel.2018.01.004
- Muchowski, P. J., & Wacker, J. L. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(1):11–22. doi:10.1038/nrn1587
- Muranova, L. K., Ryzhavskaia, A. S., Sudnitsyna, M. V., Shatov, V. M., Gusev, N. B. Small Heat Shock Proteins and Human Neurodegenerative Diseases. *Biochemistry (Mosc)*. 2018;84(11):1256–1267. doi:10.1134/S000629791911004X
- Nagy, M., Fenton, W. A., Li, D., Furtak, K., Horwich, A. L. Extended survival of misfolded G85R SOD1-linked ALS mice by transgenic expression of chaperone Hsp110. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;113(19):5424–5428. doi:10.1073/pnas.1604885113
- Nakano, K. K., Dawson, D. M., & Spence, A. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*. 1972;22(1):49–55. doi:10.1212/wnl.22.1.49
- Nilsson, D., Pettersson, M., Gustavsson, P., et al. Whole genome sequencing of cytogenetically balanced chromosome translocations identifies potentially pathological gene disruptions and highlights the importance of microhomology in the mechanism of formation. *Hum Mutat*. 2017;38(2):180–192. doi:10.1002/humu.23146
- Nóbrega, C., Carmo-Silva, S., Albuquerque, D., et al. Re-establishing ataxin-2 downregulates translation of mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain*. 2015;138(12):3537–3554. doi:10.1093/brain/awv298
- Nóbrega, C., Simões, A. T., Duarte-Neves, J., et al. Molecular Mechanisms and Cellular Pathways Implicated in Machado-Joseph Disease Pathogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1049:349–367. doi:10.1007/978-3-319-71779-1_18
- Nordengen, K., Heuser, C., Rinholm, J. E., Matalon, R., Gundersen, V. Localisation of N-acetylaspartate in oligodendrocytes/myelin. *Brain Struct Funct*. 2015;220(2):899–917. doi:10.1007/s00429-013-0691-7
- Norman, M., Rivers, C., Lee, Y. B., Idris, J., Uney, J. The increasing diversity of functions attributed to the SAFB family of RNA-/DNA-binding proteins. *Biochem J*. 2016;473(23):4271–4288. doi:10.1042/BCJ20160649
- Omasits, U., Ahrens, C. H., Müller, S., Wollscheid, B. Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*. 2014;30(6):884–886. doi:10.1093/bioinformatics/btt607
- Padiath, Q. S., Srivastava, A. K., Roy, S., Jain, S., Brahmachari, S. K. Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;133B(1):124–126. doi:10.1002/ajmg.b.30088
- Palpagama, T. H., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., Kwakowsky, A. The Role of Microglia and Astrocytes in Huntington's Disease. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:258. doi:10.3389/fnmol.2019.00258
- Park, H., Kim, H. J., Jeon, B. S. Parkinsonism in spinocerebellar ataxia. *Biomed Res Int*. 2015;2015:125273. doi:10.1155/2015/125273
- Parrales, A., Ranjan, A., Iyer, S. V., et al. DNAJA1 controls the fate of misfolded mutant p53 through the mevalonate pathway. *Nat Cell Biol*. 2016;18(11):1233–1243. doi:10.1038/ncb3427
- Pathak, N., Kumar Vimal, S., Tandon, I., Agrawal, L., Hongyi, C., Bhattacharyya, S. Neurodegenerative Disorders of Alzheimer, Parkinsonism, Amyotrophic Lateral

- Sclerosis and Multiple Sclerosis: An Early Diagnostic Approach for Precision Treatment. *Metab Brain Diss.* 2022;37(1):67-104. doi:10.1007/s11011-021-00800-w
- Paulson, H. Repeat expansion diseases. *Handb Clin Neurol.* 2018;147:105–123. doi:10.1016/B978-0-444-63233-3.00009-9
- Paulson, H. L. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am J Hum Genet.* 1999;64(2):339–345. doi:10.1086/302269
- Paulson, H. L., Das, S. S., Crino, P. B., et al. Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol.* 1997;41(4):453–462. doi:10.1002/ana.410410408
- Paulson, H. L., Perez, M. K., Trotter, Y., et al. Intranuclear Inclusions of Expanded Polyglutamine Protein in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuron.* 1997;19(2):333–344. doi:10.1016/s0896-6273(00)80943-5
- Paulson, H. L., Shakkottai, V. G., Clark, H. B., Orr, H. T. Polyglutamine spinocerebellar ataxias-from genes to potential treatments. *Nature Rev Neurosci.* 2017;18(10):613–626. doi:10.1038/nrn.2017.92
- Perrin, V., Régulier, E., Abbas-Terki, T., et al. Neuroprotection by Hsp104 and Hsp27 in Lentiviral-based Rat Models of Huntington's Disease. *Mol Ther.* 2007;15(5):903–911. doi:10.1038/mt.sj.6300141
- Petyuk, V. A., Chang, R., Ramirez-Restrepo, M., et al. The human brainome: network analysis identifies HSPA2 as a novel Alzheimer's disease target. *Brain.* 2018;141(9):2721–2739. doi:10.1093/brain/awy215
- Pushkin, A., Carpenito, G., Abuladze, N., et al. Structural characterization, tissue distribution, and functional expression of murine aminoacylase III. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286(4):C848-56. doi:10.1152/ajpcell.00192.2003
- Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S., Wang, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(22):2560–2570. doi:10.1007/s00018-006-6192-6
- Rajaraman, K., Raman, B., Ramakrishna, T., Rao, C. M. Interaction of human recombinant alphaA- and alphaB-crystallins with early and late unfolding intermediates of citrate synthase on its thermal denaturation. *FEBS Lett.* 2001;497(2–3):118–123. doi:10.1016/s0014-5793(01)02451-6
- Ramakrishnan, N. A., Drescher, M. J., Morley, B. J., Kelley, P. M., Drescher, D. G. Calcium Regulates Molecular Interactions of Otoferlin with Soluble NSF Attachment Protein Receptor (SNARE) Proteins Required for Hair Cell Exocytosis. *J Biol Chem.* 2014;289(13):8750-8766. doi:10.1074/jbc.M113.480533
- Ramani, B., Panwar, B., Moore, L. R., et al. Comparison of spinocerebellar ataxia type 3 mouse models identifies early gain-of-function, cell-autonomous transcriptional changes in oligodendrocytes. *Hum Mol Genet.* 2017;26(17):3362-3374. doi:10.1093/hmg/ddx224
- Raposo, M., Hübener-Schmid, J., Ferreira, A. F., et al. Blood transcriptome sequencing identifies biomarkers able to track disease stages in spinocerebellar ataxia type 3. *Brain.* 2023;146(10):4132-4143 doi:10.1093/brain/awad128
- Raviol, H., Sadlish, H., Rodriguez, F., Mayer, M. P., Bukau, B. Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO J.* 2006;25(11):2510–2518. doi:10.1038/sj.emboj.7601139
- Reina, C. P., Zhong, X., Pittman, R. N. Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum Mol Genet.* 2010;19(2):235–249. doi:10.1093/hmg/ddp482

- Renkawek, K., de Jong, W. W., Merck, K. B., Frenken, C. W. G. M., van Workum, F. P. A., Bosman, G. J. α B-Crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.* 1992;83(3):324–327. doi:10.1007/BF00296796
- Renkawek, K., Stege, G. J. J., Bosman, G. J. Dementia, gliosis and expression of the small heat shock proteins hsp27 and α B-crystallin in Parkinson's disease. *Neuroreport.* 1999;10(11):2273–2276. doi:10.1097/00001756-199908020-00009
- Riess, O., Rüb, U., Pastore, A., Bauer, P., Schöls, L. SCA3: Neurological features, pathogenesis and animal models. 2008;7(2):125-37. doi:10.1007/s12311-008-0013-4
- Ripley, T. L., Chonlahan, J. S., Germany, R. E. Candesartan in heart failure. *Clin Interv Aging.* 2006;1(4):357-366. doi:10.2147/ciia.2006.1.4.357
- Robitaille, Y., Lopes-Cendes, I., Becher, M., Rouleau, G., Clark, A. W. The neuropathology of CAG repeat diseases: Review and update of genetic and molecular features. *Brain Pathol.* 1997;7(3), 901–926. doi:10.1111/j.1750-3639.1997.tb00893.x
- Romano, S., Coarelli, G., Marcotulli, C., et al. Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2015;14(10):985–991. doi:10.1016/S1474-4422(15)00201-X
- Rosenberg, R., Nyhan, W., Bay, C., Shore, P. Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology.* 1976;26(8):703–714. doi:10.1212/wnl.26.8.703
- Ross, J. P., Dupre, N., Dauvilliers, Y., et al. Analysis of DNAJC13 mutations in French-Canadian/French cohort of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2016;45:212.e13-212.e17. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.04.023
- Roux, I., Safieddine, S., Nouvian, R., et al. Otoferlin, Defective in a Human Deafness Form, Is Essential for Exocytosis at the Auditory Ribbon Synapse. *Cell.* 2006;127(2):277–289. doi:10.1016/j.cell.2006.08.040
- Ruano, L., Melo, C., Silva, M. C., Coutinho, P. The Global Epidemiology of Hereditary Ataxia and Spastic Paraplegia: A Systematic Review of Prevalence Studies. *Neuroepidemiology.* 2014;42(3):174–183. doi:10.1159/000358801
- Rüb, U., Brunt, E. R., Deller, T. New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol.* 2008;21(2):111–116. doi:10.1097/WCO.0b013e3282f7673d
- Rüb, U., de Vos, R. A., Schultz, C., Brunt, E. R., Paulson, H., Braak, H. Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus. *Brain.* 2002;125(9):2115–2124. doi:10.1093/brain/awf208
- Rüb, U., Schöls, L., Paulson, H., et al. Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog Neurobiol.* 2013;104:38–66. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.01.001
- Rubinsztein, D. C. Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet.* 2002;18(4):202–209. doi:10.1016/s0168-9525(01)02625-7
- Rubinsztein, D. C., Leggo, J., Coles, R., et al. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet.* 1996;59(1):16–22. PMID:8659522
- Saini, P., Rudakou, U., Yu, E., et al. Association study of DNAJC13, UCHL1, HTRA2, GIGYF2 and EIF4G1 with Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2021;100:119.e7-119.e13. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2020.10.019

- Sajjad, M., Samson, B., Wyttenbach, A. Heat Shock Proteins: Therapeutic Drug Targets for Chronic Neurodegeneration? *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11(2):198–215. doi:10.2174/138920110790909641
- Santana, M. M., Gaspar, L. S., Pinto, M. M., et al. A standardised protocol for blood and cerebrospinal fluid collection and processing for biomarker research in ataxia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2023;49(2):e12892. doi:10.1111/nan.12892
- Satyral, S. H., Schmidt, E., Kitagawa, K., et al. Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(11):5750–5755. doi:10.1073/pnas.100107297
- Saute, J. A. M., de Castilhos, R. M., Monte, T. L., et al. A randomized, phase 2 clinical trial of lithium carbonate in Machado-Joseph disease. *Mov Disord.* 2014;29(4):568–573. doi:10.1002/mds.25803
- Scaglione, K. M., Zavodszky, E., Todi, S. V., et al. Ube2w and Ataxin-3 Coordinately Regulate the Ubiquitin Ligase CHIP. *Mol Cell.* 2011;43(4):599–612. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.036
- Scherzed, W., Brunt, E. R., Heinsen, H., et al. Pathoanatomy of Cerebellar Degeneration in Spinocerebellar Ataxia Type 2 (SCA2) and Type 3 (SCA3). *The Cerebellum.* 2012;11(3):749–760. doi:10.1007/s12311-011-0340-8
- Schmidpeter, P. A. M., Schmid, F. X. Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding and protein function. *J Mol Biol.* 2015;427(7):1609–1631. doi:10.1016/j.jmb.2015.01.023
- Schmidt, T., Landwehrmeyer, G. B., Schmitt, I., et al. An Isoform of Ataxin-3 Accumulates in the Nucleus of Neuronal Cells in Affected Brain Regions of SCA3 Patients. *Brain Pathol.* 1998;8(4):669–679. doi:10.1111/j.1750-3639.1998.tb00193.x.
- Schmidt, T., Lindenberg, K. S., Krebs, A., et al. Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: Redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol.* 2002;51(3):302–310. doi:10.1002/ana.10101
- Schmitz-Hübsch, T., Coudert, M., Bauer, P., et al. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: Disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology.* 2008;71(13):982–989. doi:10.1212/01.wnl.0000325057.33666.72
- Schmitz-Hübsch, T., Tezenas Du Montcel, S., Baliko, L., et al. Scale for the assessment and rating of ataxia Development of a new clinical scale. *Neurology.* 2006;66(11):1717–1720. doi:10.1212/01.wnl.0000219042.60538.92
- Scholefield, J., Watson, L., Smith, D., Greenberg, J., Wood, M. J. Allele-specific silencing of mutant Ataxin-7 in SCA7 patient-derived fibroblasts. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(12):1369–1375. doi:10.1038/ejhg.2014.39
- Schöls, L., Amoiridis, G., Büttner, T., Przuntek, H., Epplen, J. T., Riess, O. Autosomal dominant cerebellar ataxia: Phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol.* 1997;42(6):924–932. doi:10.1002/ana.410420615
- Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., Riess, O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 2004;(5):291–304. doi:10.1016/S1474-4422(04)00737-9
- Schöls, L., Vieira-Saecker, A. M. M., Schöls, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., & Riess, O. Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. *Hum Mol Genet.* 1995;4(6):1001–1005. doi:10.1093/hmg/4.6.1001

- Schug, N., Braig, C., Zimmermann, U., et al. Differential expression of otoferlin in brain, vestibular system, immature and mature cochlea of the rat. *Eur J Neurosci.* 2006;24(12):3372–3380. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05225.x
- Schuster, K. H., Zalon, A. J., Zhang, H., et al. Impaired Oligodendrocyte Maturation Is an Early Feature in SCA3 Disease Pathogenesis. *J Neurosci.* 2022;42(8):1604–1617. doi:10.1523/JNEUROSCI.1954-20.2021
- Seaman, M. N., & Freeman, C. L. Analysis of the Retromer complex-WASH complex interaction illuminates new avenues to explore in Parkinson disease. *Commun Integr Biol.* 2014;7(4):e29483. doi:10.4161/cib.29483
- Seidel, K., Meister, M., Dugbartey, G. J., et al. Cellular protein quality control and the evolution of aggregates in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012;38(6):548–558. doi:10.1111/j.1365-2990.2011.01220.x
- Sequeiros, J., Maciel, P., Taborda, F., et al. Prenatal diagnosis of Machado-Joseph disease by direct mutation analysis. *Prenat Diagn.* 1998;18(6):611–617. PMID:9664608
- Shan, Y., Wang, D. D., Xu, Y. X., et al. Aging as a Precipitating Factor in Chronic Restraint Stress-Induced Tau Aggregation Pathology, and the Protective Effects of Rosmarinic Acid. *J Alzheimers Dis.* 2016;49(3):829–844. doi:10.3233/JAD-150486
- Shao, J., & Diamond, M. I. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet.* 2007;16(Spec No. 2):R115–R123. doi:10.1093/hmg/ddm213
- Shen, X. N., Wu, K. M., Huang, Y. Y., et al. Systematic assessment of plasma biomarkers in spinocerebellar ataxia. *Neurobiol Dis.* 2023;181:106112. doi:10.1016/j.nbd.2023.106112
- Shin, J. Y., Fang, Z. H., Yu, Z. X., Wang, C. E., Li, S. H., Li, X. J. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol.* 2005;171(6):1001–1012. doi:10.1083/jcb.200508072
- Shorter, J. The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PLoS One.* 2011;6(10):e26319. doi:10.1371/journal.pone.0026319
- Silberbauer, J., Schidl, S., Diermayr, G., Schmitz-Hübsch, T., Greisberger, A. Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA): translation and cultural adaptation to German-speaking areas. *Wien Med Wochenschr.* 2023. doi:10.1007/s10354-023-01014-8
- Simoës, A. T., Goncalves, N., Koeppen, A., et al. Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease. *Brain.* 2012;135(8):2428–2439. doi:10.1093/brain/aws177
- Snijder, P. M., Baratashvili, M., Grzeschik, N. A., et al. Overexpression of Cystathionine γ -Lyase Suppresses Detrimental Effects of Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Mol Med.* 2016;21(1):758–768. doi:10.2119/molmed.2015.00221
- Song, Y., Nagy, M., Ni, W., et al. Molecular chaperone Hsp110 rescues a vesicle transport defect produced by an ALS-associated mutant SOD1 protein in squid axoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(14):5428–5433. doi:10.1073/pnas.1303279110
- Soto, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(1):49–60. doi:10.1038/nrn1007
- Srivastava, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):185–194. doi:10.1038/nri749

- Stenoien, D. L., Cummings, C. J., Adams, H. P., et al. Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum Mol Genet.* 1999;8(5):731–741. doi:10.1093/hmg/8.5.731
- Stetler, R. A., Gan, Y., Zhang, W., et al. Heat shock proteins: Cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 2010;92(2):184–211. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.05.002
- Stevanin, G., & Brice, A. Spinocerebellar ataxia 17 (SCA17) and Huntington's disease-like 4 (HDL4). *Cerebellum.* 2008;7(2):170-8. doi:10.1007/s12311-008-0016-1
- Su, C. T., & Urban, Z. *Ltbp4* in health and disease. *Genes (Basel).* 2021;12(6):795. doi:10.3390/genes12060795
- Tabula-muris-ds-czbiohub.org Available: <https://tabula-muris.ds.czbiohub.org> [Accessed:08.09.2023; 11.05 Uhr (HDJ2); 08.09.23; 11.17 Uhr (HSP105)]
- Tadic, J., Ring, J., Jerkovic, A., et al. A pathological role of the Hsp40 protein Ydj1/DnaJA1 in models of Alzheimer's disease. *Cell Stress.* 2022;6(5):61–64. doi:10.15698/cst2022.05.267
- Taguchi, Y. V., Gorenberg, E. L., Nagy, M., et al. Hsp110 mitigates α -synuclein pathology in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(48):24310–24316. doi:10.1073/pnas.1903268116
- Takahashi, T., Katada, S., Onodera, O. Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J Mol Cell Biol.* 2010;2(4):180–191. doi:10.1093/jmcb/mjq005
- Takiyama, Y., Igasashi, S., Rogaeva, E. A., et al. Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet.* 1995;4(7):1137–1146. doi:10.1093/hmg/4.7.1137
- Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet.* 1993;4(3):300–304. doi:10.1038/ng0793-300
- Tang, W., Teichert, M., Chasman, D. I., et al. A genome-wide association study for venous thromboembolism: the extended cohorts for heart and aging research in genomic epidemiology (CHARGE) consortium. *Genet Epidemiol.* 2013;37(5):512–521. doi:10.1002/gepi.21731
- Toonen, L. J. A., Overzier, M., Evers, M. M., et al. Transcriptional profiling and biomarker identification reveal tissue specific effects of expanded ataxin-3 in a spinocerebellar ataxia type 3 mouse model. *Mol Neurodegener.* 2018;13(1):31. doi:10.1186/s13024-018-0261-9
- Trottier, Y., Cancel, G., An-Gourfinkel, I., et al. Heterogeneous Intracellular Localization and Expression of Ataxin-3. *Neurobiol Dis.* 1998;5(5):335–347. doi:10.1006/nbdi.1998.0208
- Twyffels, L., Gueydan, C., Kruys, V. Shutting SR proteins: More than splicing factors. *FEBS J.* 2011;278(18):3246–3255 doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08274.x
- van de Warrenburg, B. P. C., Hendriks, H., Dürr, A., et al. Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: A study in a Dutch-French cohort. *Ann Neurol.* 2005;57(4):505–512. doi:10.1002/ana.20424
- van de Warrenburg, B. P. C., Sinke, R. J., Verschuuren-Bemelmans, C. C., et al. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology.* 2002;58(5):702–708. doi:10.1212/wnl.58.5.702

- van Gaalen, J., Giunti, P., van de Warrenburg, B. P. Movement disorders in spinocerebellar ataxias. *Mov Disord.* 2011;26(5):792–800. doi:10.1002/mds.23584
- van Waarde-Verhagen, M. & Kampinga, H. Measurement of Chaperone-Mediated Effects on Polyglutamine Protein Aggregation by the Filter Trap Assay. *Methods Mol Biol.* 2018;1709:59-74. doi:10.1007/978-1-4939-7477-1_5
- Vendredy, L., Adriaenssens, E., Timmerman, V. Small heat shock proteins in neurodegenerative diseases. *Cell Stress Chaperones.* 2020;25(4):679–699. doi:10.1007/s12192-020-01101-4
- Vilariño-Güell, C., Rajput, A., Milnerwood, A. J., et al. DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet.* 2014;23(7):1794–1804. doi:10.1093/hmg/ddt570
- Vleminckx, V., Van Damme, P., Goffin, K., Delye, H., Van Den Bosch, L., Robberecht, W. Upregulation of HSP27 in a transgenic model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61(11):968–974. doi:10.1093/jnen/61.11.968.
- Vydra, N., Winiarski, B., Rak-Raszewska, A., et al. The expression pattern of the 70-kDa heat shock protein Hspa2 in mouse tissues. *Histochem Cell Biol.* 2009;132(3):319–330. doi:10.1007/s00418-009-0605-1
- Waelter, S., Boeddrich, A., Lurz, R., et al. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell.* 2001;12(5):1393–1407. doi: 10.1091/mbc.12.5.1393
- Wang, B., Fu, C., Wei, Y., et al. Ferroptosis-related biomarkers for Alzheimer’s disease: Identification by bioinformatic analysis in hippocampus. *Front Cell Neurosci.* 2022;16:1023947. doi:10.3389/fncel.2022.1023947
- Wang, G., Ide, K., Nukina, N., et al. Machado–Joseph Disease Gene Product Identified in Lymphocytes and Brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;233(2):476–479. doi:10.1006/bbrc.1997.6484
- Wang, Y., & Wang, Z. Identification of dysregulated genes and pathways of different brain regions in Alzheimer’s disease. *Int J Neurosci.* 2020;130(11):1082-1094. doi:10.1080/00207454.2020.1720677
- Wellington, C. L., Brinkman, R. R., O’Kusky, J. R., Hayden, M. R. Toward Understanding the Molecular Pathology of Huntington’s Disease. *Brain Pathol.* 1997;7(3):979–1002. doi:10.1111/j.1750-3639.1997.tb00897.x
- Wen, F.-C., Li, Y.-H., Tsai, H.-F., et al. Down-regulation of heat shock protein 27 in neuronal cells and non-neuronal cells expressing mutant ataxin-3. *FEBS Lett.* 2003;546(2–3):307–314. doi:10.1016/s0014-5793(03)00605-7
- Wentink, A. S., Nillegoda, N. B., Feufel, J., et al. Molecular dissection of amyloid disaggregation by human HSP70. *Nature.* 2020;587(7834):483–488. doi:10.1038/s41586-020-2904-6
- Wickramaratne, A., & Wickner, S. Diptoindonesin G, a new Hsp90 drug. *J Biol Chem.* 2023;299(1):102826. doi:10.1016/j.jbc.2022.102826
- Wilke, C., Haas, E., Reetz, K., et al. Neurofilaments in spinocerebellar ataxia type 3: blood biomarkers at the preataxic and ataxic stage in humans and mice. *EMBO Mol Med.* 2020;12(7):e11803. doi:10.15252/emmm.201911803
- Wilkinson, K. D. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* 1997;11(14):1245–1256. doi:10.1096/fasebj.11.14.9409543
- Woods, B. T., & Schaumburg, H. H. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia a unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci.* 1972;17(2):149-166. doi:10.1016/0022-510x(72)90137-2

- Wu, W. J., Lu, C. W., Wang, S. E., Lin, C. L., Su, L. Y., Wu, C. H. MPTP toxicity causes vocal, auditory, orientation and movement defects in the echolocation bat. *Neuroreport*. 2021;32(2):125–134. doi:10.1097/WNR.0000000000001574
- Wu, Y. L., Chang, J. C., Lin, W. Y., Li, C. C., Hsieh, M., Chen, H. W., Wang, T. S., Wu, W. T., Liu, C. S., & Liu, K. L. Caffeic acid and resveratrol ameliorate cellular damage in cell and *Drosophila* models of spinocerebellar ataxia type 3 through upregulation of Nrf2 pathway. *Free Radic Biol Med*. 2018;115:309–317. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.011
- Wytenbach, A., Sauvageot, O., Carmichael, J., Diaz-Latoud, C., Arrigo, A. P., Rubinsztein, D. C. Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet*. 2002;11(9):1137–1151. doi:10.1093/hmg/11.9.1137
- Yakubu, U. M., & Morano, K. A. Suppression of aggregate and amyloid formation by a novel intrinsically disordered region in metazoan Hsp110 chaperones. *J Biol Chem*. 2021;296:100567. doi:10.1016/j.jbc.2021.100567
- Yamada, M., Hayashi, S., Tsuji, S., Takahashi, H. Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol*. 2001;101(2):140–144. doi:10.1007/s004010000277
- Yamada, M., Sato, T., Tsuji, S., & Takahashi, H. CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. 2008;115(1):71–86. doi:10.1007/s00401-007-0287-5
- Yao, L., Lin, K., Zheng, Z., et al. Bioinformatic Analysis of Genetic Factors from Human Blood Samples and Postmortem Brains in Parkinson's Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;9235358 doi:10.1155/2022/9235358
- Yu, Y. C., Kuo, C. L., Cheng, W. L., Liu, C. S., Hsieh, M. Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease. *J Neurosci Res*. 2009;87(8):1884–1891. doi:10.1002/jnr.22011
- Zesiewicz, T. A., Greenstein, P. E., Sullivan, K. L., et al. A randomized trial of varenicline (Chantix) for the treatment of spinocerebellar ataxia type 3. *Neurology*. 2012;78(8):545–550. doi:10.1212/WNL.0b013e318247cc7a
- Zhang, S., Binari, R., Zhou, R., Perrimon, N. A genomewide RNA interference screen for modifiers of aggregates formation by mutant Huntingtin in *Drosophila*. *Genetics*. 2010;184(4):1165–1179. doi:10.1534/genetics.109.112516
- Zheng, Q., Kebede, M. T., Kemeh, M. M., et al. Inhibition of the Self-Assembly of A β and of Tau by Polyphenols: Mechanistic Studies. *Molecules Basel*. 2019;24(12):2316. doi:10.3390/molecules24122316
- Zijlstra, M. P., Rujano, M. A., Van Waarde, M. A., Vis, E., Brunt, E. R., Kampinga, H. H. Levels of DNAJB family members (HSP40) correlate with disease onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Eur J Neurosci*. 2010;32(5):760–770. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07352.x
- Zourlidou, A., Gidalevitz, T., Kristiansen, M., et al. Hsp27 overexpression in the R6/2 mouse model of Huntington's disease: chronic neurodegeneration does not induce Hsp27 activation. *Hum Mol Genet*. 2007;16(9):1078–1090. doi:10.1093/hmg/ddm057
- Zourlidou, A., Payne Smith, M. D., Latchman, D. S. HSP27 but not HSP70 has a potent protective effect against alpha-synuclein-induced cell death in mammalian neuronal cells. *J Neurochem*. 2004;88(6):1439–1448. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02273.x

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation

Die Dissertation erfolgte am Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Olaf Rieß.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid.

Von den ESMI-Zentren – Azoren (Ponta Delgada), Bonn, Coimbra, London, Nijmegen/Groningen, Tübingen – wurde sowohl eine standardisierte Kollektion der Blutproben als auch die klinische und demographische Datenerhebung übernommen. Die verwendeten murinen Gewebe stammten aus der Forschung von Eva Haas. Für die bioinformatische Analyse wurden bestehende Datensätze der ESMI-ProbandInnen, SCA3 KI Mäuse mit 304 Glutaminen (Haas et al., 2022) und hemizygoten YAC84Q Mäusen (Cemal et al., 2002) verwendet.

Die Bioinformatik-Analyse sowie die Versuche auf RNA- und Protein-Ebene wurden nach Einarbeitung durch meine Betreuerin Frau Dr. Jeannette Hübener-Schmid von mir selbstständig durchgeführt. Ich versichere, die statistische Auswertung nach Anleitung meiner Betreuerin eigenständig umgesetzt zu haben.

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

Tübingen, den _____

Constanze Frank

8 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank an Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß, der mir diese Doktorarbeit ermöglichte, sodass ich an den Forschungsarbeiten im Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik mitwirken durfte. Dies gilt ebenfalls meiner wissenschaftlichen Begleitperson Herrn Prof. Dr. Ludger Schöls sowie meiner/m 2. Berichterstatter/in.

Zudem möchte ich mich bei allen Zentren des ESMI-Projekts für die Bereitstellung der klinischen Daten und Blutproben sowie bei allen SCA3-PatientInnen und KontrollprobandInnen für ihr Mitwirken am ESMI-Projekt bedanken.

Mein Dank gilt auch dem Genetik-Labor der Nägelestraße 5 in Tübingen; denn ohne die stete Hilfsbereitschaft aller Labormitglieder wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Ohne Marie-Kristin Krüger, die mich auf die Forschung zur Spinozerebellären Ataxie aufmerksam gemacht hat, hätte ich niemals diese Doktorarbeit begonnen. Vielen Dank, dass du mich für das Thema begeistert hast.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Jeannette Hübener-Schmid. Durch sie hatte ich eine wunderschöne Zeit im Labor, in die sie mich eingearbeitet hat. Darüber hinaus hat sie mir alle meine Fragen beantwortet, hat sich Zeit genommen und war immer für mich da. Danke für diese außergewöhnliche Begleitung.

An dieser Stelle möchte ich mich bei der Konrad-Adenauer-Stiftung bedanken, welche es mir ermöglichte, dass ich ein Semester außerhalb meines Zahnmedizinstudiums finanziell und ideell gefördert wurde.

Im privaten Umfeld wurde ich jederzeit von meinen Freundinnen und Freunden unterstützt, hervorheben möchte ich hier Elisabeth Kehl.

Durch meinen Freund, der zu jeder Tageszeit ein Ohr für mich hatte und mich in vielen Dingen des Alltags unterstützte, wäre diese Dissertation nicht so schnell vorangekommen; ich danke ihm von Herzen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern bedanken, die sich über jeden Fortschritt im Labor oder beim Schreiben mit mir freuten

Danksagung

und mich ermutigten den Schritt einer experimentellen Doktorarbeit außerhalb der Zahnmedizin zu wagen. Es hat sich gelohnt.

9 Anlagen im Anhang

9.1 Tabellen

Tabelle 9.1: Überblick der IPA-Analyse

| Gen | Datensatz | LogFold Change | p-Wert | Netzwerk | Pathway |
|--------|---|----------------|------------------|--|---|
| ACY3 | SCA3 Maus KI 2M (Cerebellum) | 0,926 | 1,66 e^{-4} | Zellentwicklung, Zellwachstum und -proliferation, Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems | |
| ACY3 | SCA3 Maus Transgen 84Q Striatum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M | 1,057 | 3,08 e^{-9} | Entwicklungsstörung, Erbstörung und Stoffwechselerkrankung | |
| ACY3 | SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M | 0,484 | 1,16 e^{-3} | Zellmorphologie, Zellfunktion und -erhaltung, Entwicklung und Funktion des Nervensystems | |
| ACY3 | SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M | 0,691 | 3,15 e^{-5} | Zellaufbau und -organisation, Zellentwicklung, Zellfunktion und -erhaltung | |
| CA9 | SCA3 Patient Cerebellum | -0,698 | 3,44 e^{-2} | Entwicklungsstörung, Augenkrankheit, Organismenverletzung und Anomalien | |
| CA9 | SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum) | -0,911 | 6,26 e^{-6} | Krebs, Störungen des endokrinen Systems, Verletzungen und Anomalien von Organismen | |
| CA9 | SCA3 Maus KI 2M (Cerebellum) | -0,658 | 3,75 e^{-4} | Zellmorphologie, Zellaufbau und -organisation, Gewebemorphologie | |
| HSP105 | SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum) | -0,387 | 2,82 e^{-2} | | Aldosteron-Signalisierung in Epithelzellen |
| HSP27 | Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild | 0,289 | 1,14 e^{-2} | Zell-Kompromittierung, Zellentwicklung, Zellwachstum und -proliferation | |
| HSP27 | Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch | -0,346 | 2,81 e^{-2} | Zellvermittelte Immunantwort, Zellentwicklung, Zellfunktion und -erhaltung | |
| HSP27 | SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum) | -1,116 | 8,54 e^{-5} | Zellfunktion und -erhaltung, Entwicklung und Funktion hämatologischer Systeme, Proteinsynthese | |
| HSPA2 | SCA3 Patient Cerebellum | -2,364 | 2,54 e^{-4} | Organmorphologie, Entwicklung und Funktion des Skelett- und Muskelsystems, Gewebemorphologie | Signalisierung der Huntington-Krankheit; BAG2-Signalweg |
| HSPA2 | SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum) | 0,253 | 2,33 e^{-2} | | Aldosteron-Signalisierung in Epithelzellen; Signalisierung der Huntington-Krankheit; HIF1 α Signalisierung |
| LTBP4 | SCA3 Patient Cerebellum | -0,45 | 4,18 e^{-1} | Krebs, Magen-Darm-Erkrankungen, Organismenverletzungen und Anomalien | |
| LTBP4 | SCA3 Maus Transgen 84Q präfrontaler Cortex Wildtyp 2M vs. Transgen 2M | -0,533 | 1,12 e^{-4} | Störungen des endokrinen Systems, Magen-Darm-Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen | |
| OTOF | Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild | 2,556 | 2,42 e^{-8} | Zellmorphologie, Infektionskrankheiten, Organismenschäden und Anomalien | |
| OTOF | Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild weiblich | 1,61 | 3,47 e^{-3} | Erbkrankheiten, Stoffwechselkrankheiten, Organismenschäden und Anomalien | |
| OTOF | Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild männlich | 2,596 | 4,39 e^{-4} | Hörkrankheit, immunologische Krankheit, Organismenverletzung und Anomalien | |
| OTOF | Blut ESMI Baseline Kontrolle vs. Mutationsträger | 1.563 | 1,03 e^{-4} | Entzündliche Erkrankung, Entzündungsreaktion, Organismenverletzung und Anomalien | |

Anlagen im Anhang

| | | | | |
|--------|---|--------|-------------------|---|
| OTOF | Blut ESMI Baseline alle | 1,5 | 1,28 e^{-4} | Zellmorphologie, Embryonalentwicklung, Haar- und Hautentwicklung und -funktion |
| OTOF | SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 12M vs. Transgen 12M | 0,439 | 2,07 e^{-2} | Zellwachstum und -proliferation, Entwicklung und Funktion des Fortpflanzungssystems, Gewebeentwicklung |
| OTOF | SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M | -0,383 | 2,18 e^{-2} | Störungen des endokrinen Systems, Verletzungen und Anomalien von Organismen, Erkrankungen des Fortpflanzungssystems |
| SAFB2 | SCA3 Patient Cerebellum | 0,572 | 1,37 e^{-2} | Zelluläre Entwicklung, Embryonalentwicklung, Organismische Entwicklung |
| SFT2D2 | SCA3 Maus Transgen 84Q präfrontaler Cortex Transgen 2M vs. Transgen 12M | 1,007 | 2,59 e^{-12} | Zellaufbau und -organisation, Zellfunktion und -erhaltung, Erbkrankheit |
| SUSD1 | SCA3 Patient Cerebellum | -1,199 | 3,47 e^{-3} | Arzneimittelstoffwechsel, Energieproduktion, posttranslationale Modifikation |
| SUSD1 | Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild | 0,27 | 3,47 e^{-5} | Zellfunktion und -erhaltung, Lipidstoffwechsel, Biochemie kleiner Moleküle |
| SUSD1 | Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch | 0,324 | 2,21 e^{-4} | Krebs, Hämatologische Erkrankung, Immunologische Erkrankung |
| SUSD1 | Blut ESMI Baseline präataktisch vs. Kontrolle | -0,297 | 6,20 e^{-5} | Hämatologische Erkrankungen, Infektionskrankheiten, Organismenschäden und Anomalien |
| SUSD1 | SCA3 Maus Transgen 84Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M | 0,32 | 3,32 e^{-1} | Kohlenhydratstoffwechsel, molekularer Transport, posttranslationale Modifikation |

9.2 Abbildungen

9.2.1 Abbildungen zur bioinformatischen Analyse

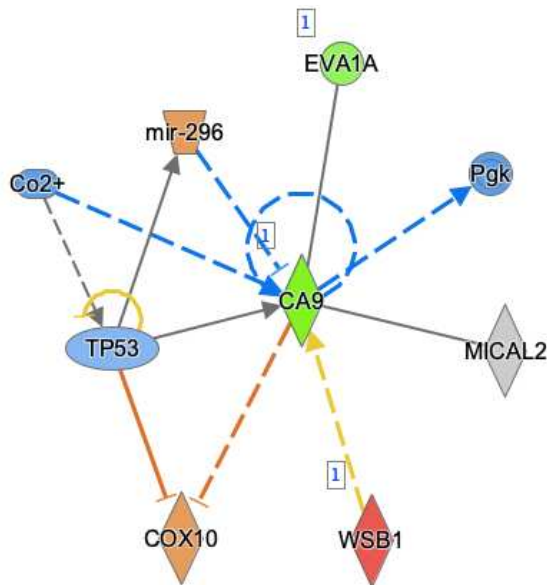


Abbildung 9.1: Hochreguliertes CA9 im Netzwerk „Krebs, Störungen des endokrinen Systems, Verletzungen und Anomalien von Organismen“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum)

Anlagen im Anhang

logFold Change von $-0,911$; p -Wert von $6,26 \cdot 10^{-6}$; CA9 steht in Interaktion mit dem runterregulierten EVA1A (*eva-1 homolog A, regulator of programmed cell death*) und MICAL2 (*microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2*); das inhibierte P_{gk} (*phosphoglycerate kinase*) wird durch die Expression von CA9 indirekt inhibiert; das inhibierte Co²⁺ drückt eine indirekte Inhibierung auf CA9 aus; das inhibierte TP53 (*tumor protein 53*) steht in Interaktion mit CA9, wobei diese Wirkung nicht vorhersehbar ist; durch eine indirekte Inhibierung von CA9 kommt es zur Aktivierung von COX10 (*cytochrome c oxidase assembly factor heme A:farnesyltransferase COX10*); das hochregulierte WSB1 (*WD repeat and SOCS box containing 1*) zeigt eine Interaktion auf CA9, wobei die Ergebnisse nicht mit dem Zustand des nachgeschalteten Moleküls übereinstimmen; durch mir-296 (*microRNA 296*) wird CA9 indirekt inhibiert.

rot: hochreguliert; grün: runterreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

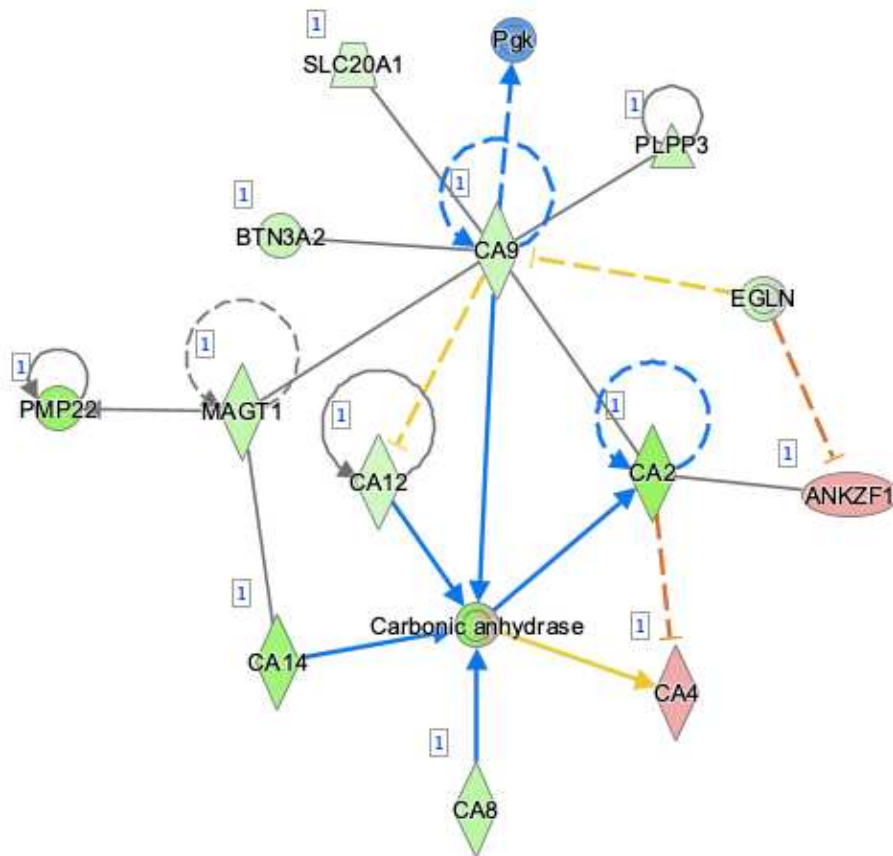


Abbildung 9.2: Runterreguliertes CA9 im Netzwerk „Entwicklungsstörung, Augenkrankheit, Organismenverletzung und Anomalien“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum

Anlagen im Anhang

logFold Change von -0,698; p-Wert von $3,44e^{-2}$; CA9 ist runterreguliert und inhibiert sich indirekt selbst; CA9 drückt die Inhibierung der Gruppe der Carboanhydrasen aus, welche selbst runterreguliert sind; Carboanhydrasen (CA) aktivieren ebenfalls eine Inhibierung auf CA2 und werden von CA8, CA14 und CA12 durch Expression inhibiert; CA2, BTN3A2 (butyrophilin subfamily 3 member A2), SLC20A1 (solute carrier family 20 member 1), PLPP3 (phospholipid phosphatase 3) – alle runterreguliert – stehen zu CA9 in einer Interaktion, bei der die Wirkung nicht vorhergesagt werden kann; CA9 inhibiert indirekt das runterregulierte CA12, aber die Ergebnisse stimmen nicht mit dem Zustand des nachgeschalteten Moleküls überein; Gleiches gilt für das runterregulierte EGLN (egl-9 family hypoxia inducible), welches CA9 indirekt inhibiert

rot: hochreguliert; grün: runterreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

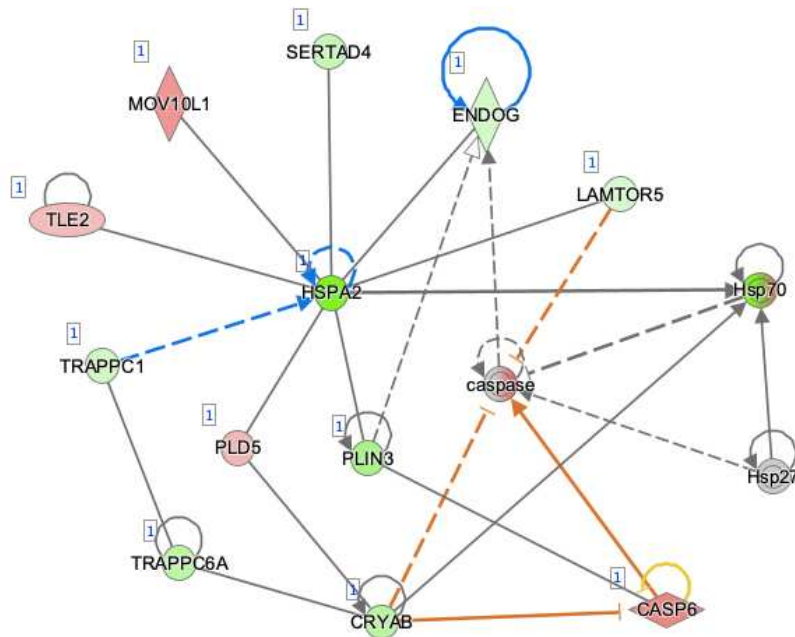


Abbildung 9.3: Runterreguliertes HSPA2 im Netzwerk „Organmorphologie, Entwicklung und Funktion des Skelett- und Muskelsystems, Gewebemorphologie“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum

logFold Change von -2,364; p-Wert von $2,54 e^{-4}$; runterreguliertes HSPA2 exprimiert indirekt eine Inhibierung auf sich selbst; durch das runterregulierte TRAPPC1 (trafficking protein particle complex subunit 1) wird eine indirekte Aktivierung auf HSPA2 ausgeübt, wodurch es zur Inhibierung kommt; HSPA2 aktiviert das runterregulierte Hsp70, wobei die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist; zur Hsp70-Familie gehören unter anderem HSP105 und HSPA2; gleichzeitig wird Hsp70 durch Hsp27 (Heat shock protein 27) aktiviert, auch hier ist

Anlagen im Anhang

eine Vorhersage der Expression nicht möglich; zudem steht HSPA2 jeweils mit dem runterregulierten ENDOG (endonuclease G), dem runterregulierten LAMTOR5 (late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 5), dem runterregulierten PLIN3 (perilipin 3), dem hochregulierten PLD5 (phospholipase D family member 5), dem hochregulierten TLE2 (TLE family member 2, transcriptional corepressor), dem hochregulierten MOV10L1 (Mov10 like RISC complex RNA helicase 1) und dem runterregulierten SERTAD4 (SERTA domain containing 4) in Interaktion; bei diesen Verbindungen ist wiederum eine Aussage über die Wirkung nicht gegeben

rot: hochreguliert; grün: runterreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

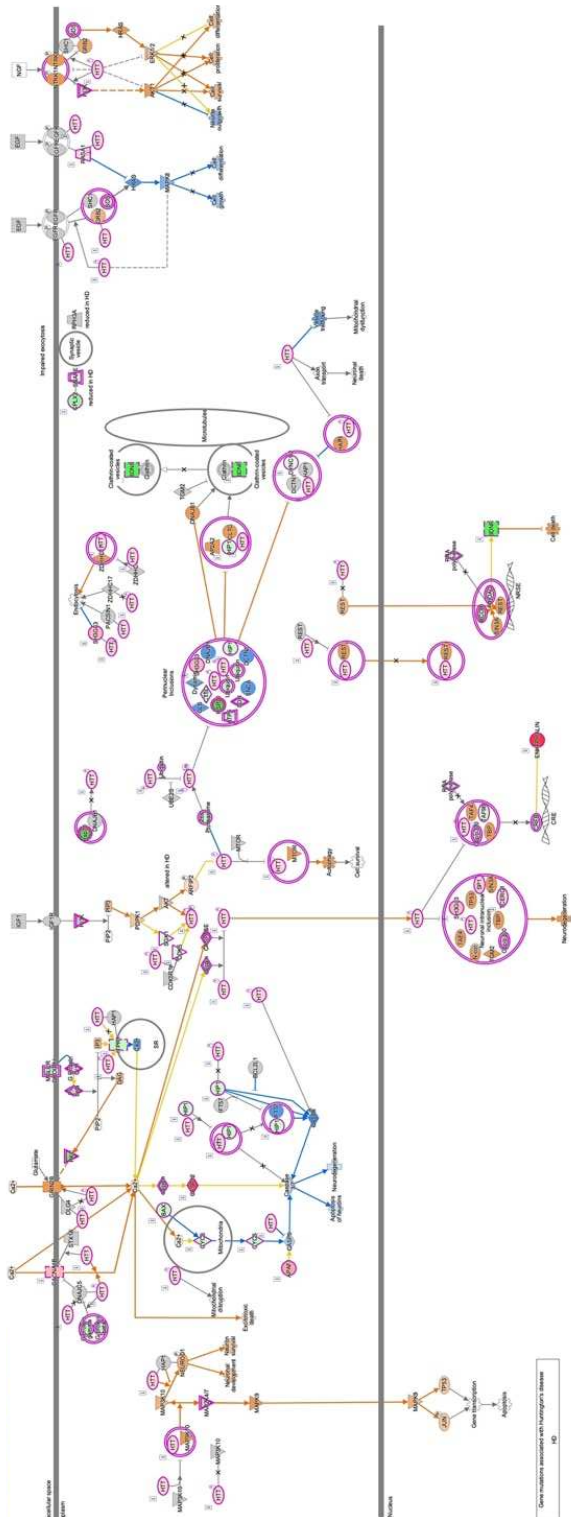


Abbildung 9.4: Übersichtsbild vom runterregulierten HSPA2 im Pathway „Signalisierung der Huntington-Krankheit“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum

logFold Change von -2,364; p-Wert von $2,54 \cdot 10^{-4}$; der Pathway spielt vor allem im Zytoplasma ab; HSPA2 als runterreguliertes Hsp70 eingezeichnet; dieses Protein spielt hier unter anderem

bei perinuklearen Einschlüssen eine Rolle; auch Huntingtin befindet sich in diesen perinuklearen Einschlüssen

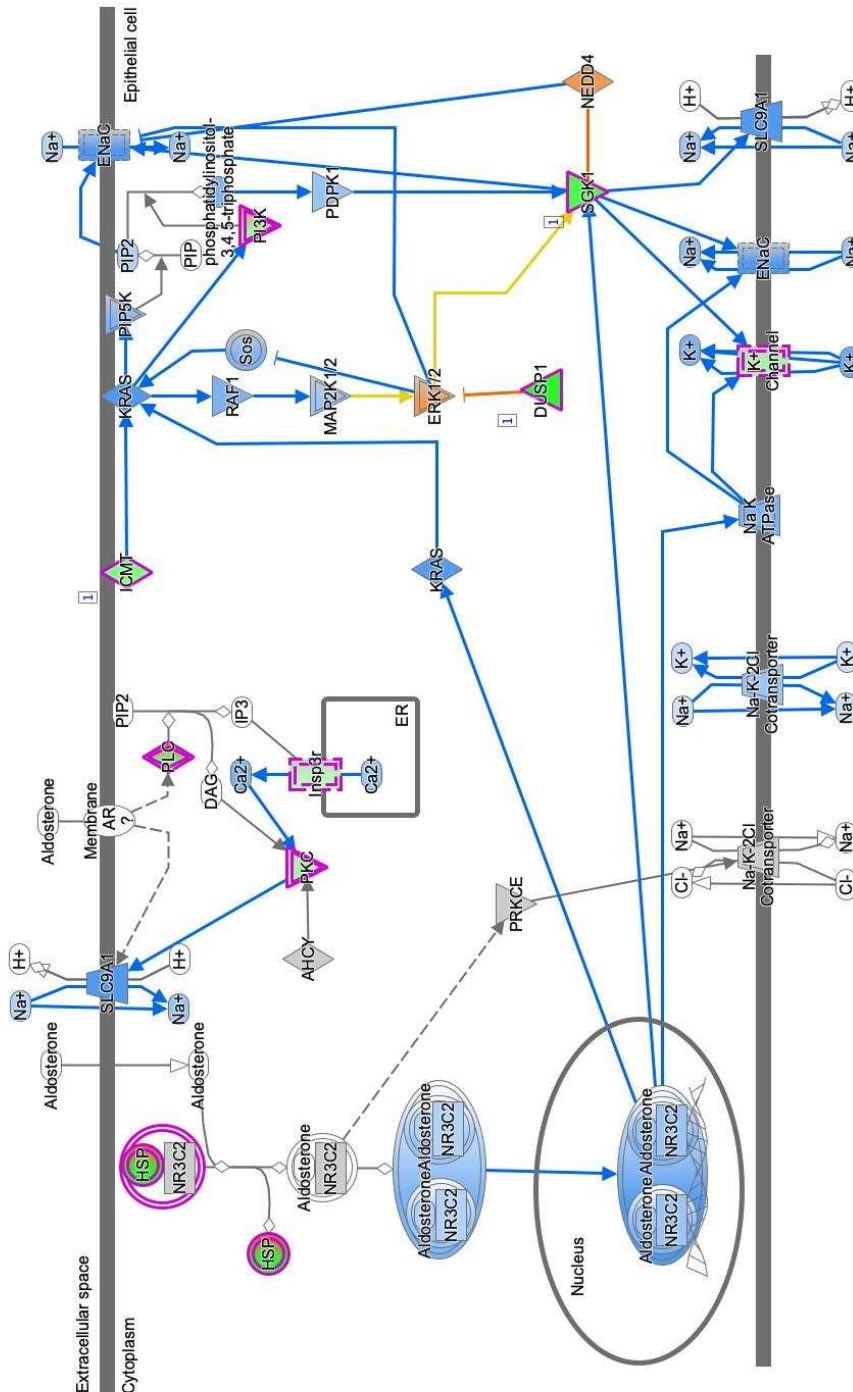


Abbildung 9.5: HSPA2 und HSP105 im Pathway „Aldosteron-Signalisierung in Epithelzellen“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum)

Anlagen im Anhang

logFold Change von 0,253 und einem p-Wert von $2,33 \cdot 10^{-2}$; im Pathway wurden HSPA2 als auch HSP105 als HSP gekennzeichnet; der Pathway befindet sich vor allem im Zytoplasma; HSP befindet sich mit NR3C2 (nuclear receptor subfamily 3 group C member 2) in einem Einschluss, der seine Informationen an den Komplex von Aldosteron und NR3C2 weitergibt; auch HSP allein ist an den zuletzt genannten Komplex gekoppelt

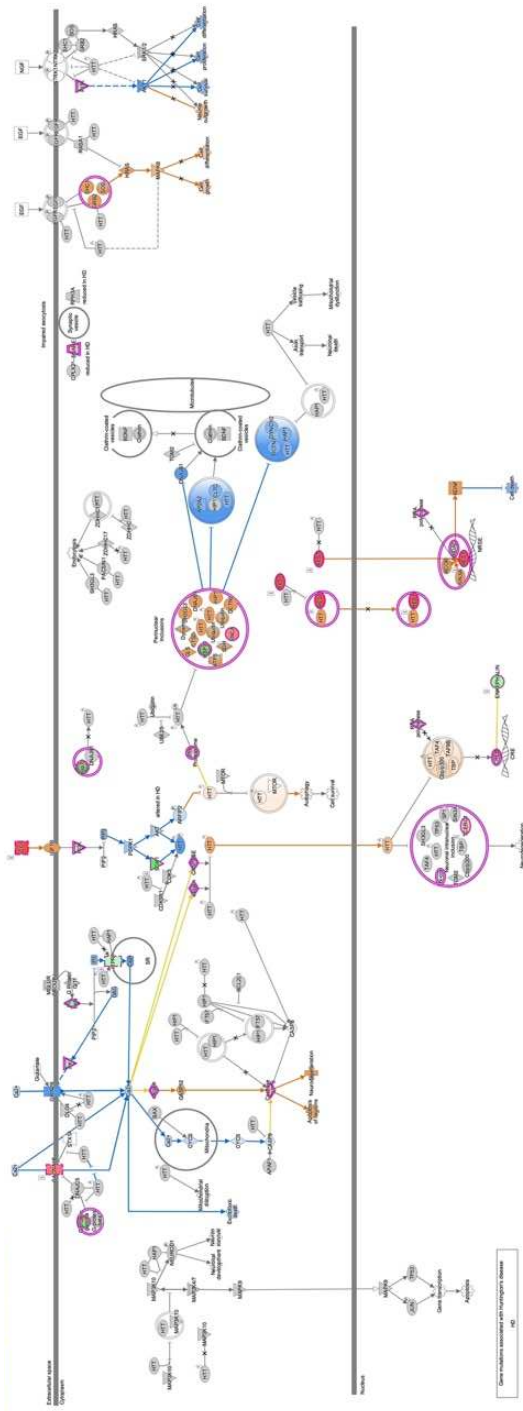


Abbildung 9.6: HSPA2 im Pathway „Signalisierung der Huntington-Krankheit“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum)

logFold Change von 0,253 und einem *p*-Wert von $2,33 \cdot 10^{-2}$; im Pathway wurde HSPA2 als HSP gekennzeichnet; der Pathway befindet sich vor allem im Zytoplasma und es ist die Signalisierung von Morbus Huntington dargestellt; HSP befindet sich unter anderem mit Huntingtin in perinuklearem Einschluss, der Komplexe mit Huntingtin und anderen Proteinen inhibiert

Anlagen im Anhang

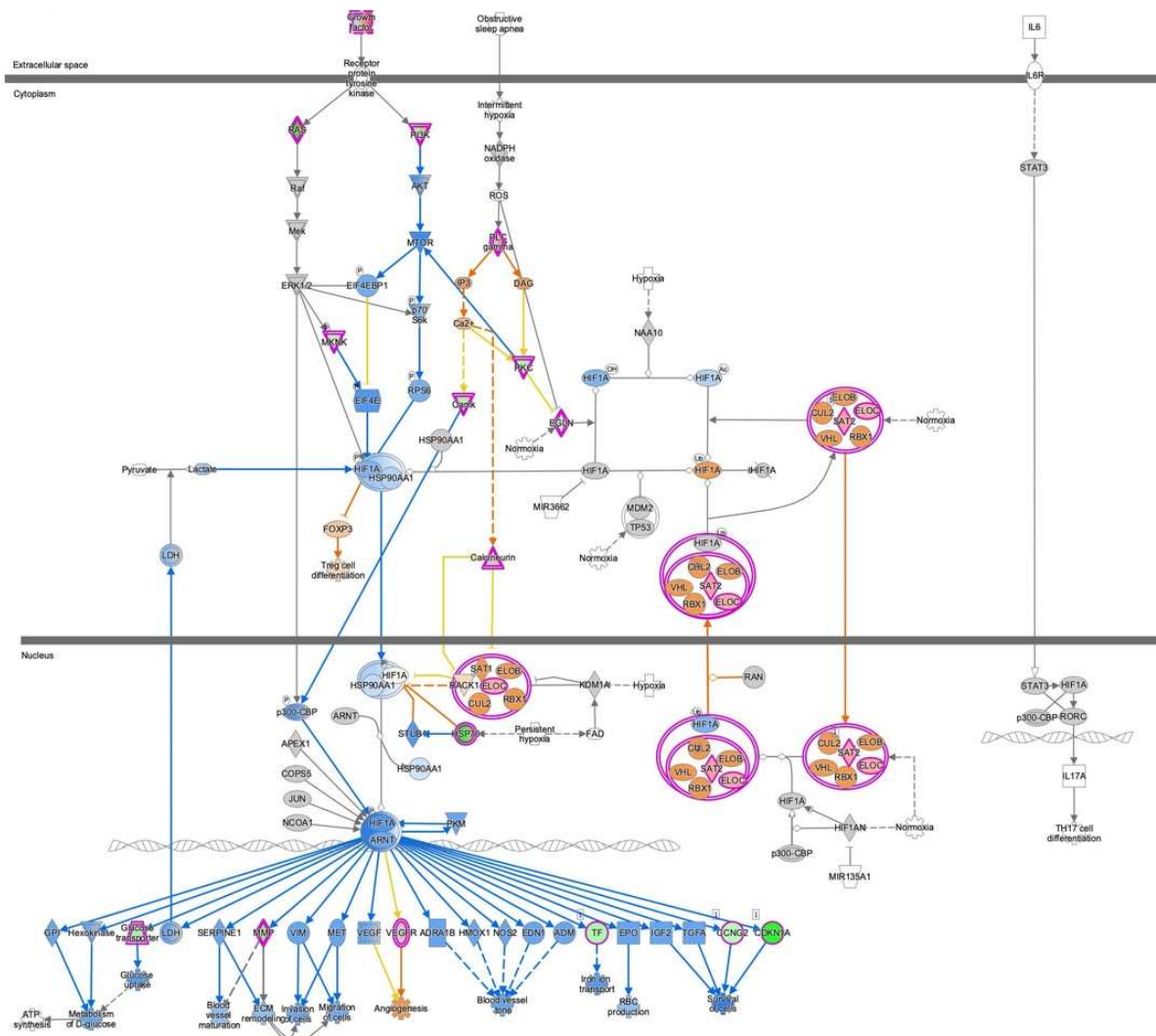


Abbildung 9.7: HSPA2 im Pathway „HIF1 α Signalisierung“ aus dem Datensatz SCA3 Maus KI 12M (Cerebellum)

logFold Change von 0,253 und einem *p*-Wert von $2,33 \cdot 10^{-2}$; im Pathway wurde HSPA2 als HSP70 gekennzeichnet; der Komplex findet vor allem im Zytoplasma und Nucleus statt; HSP70 drückt an STUB1 (STIP1 homology and U-box containing protein 1) eine Inhibierung aus und interagiert mit einem Komplex von HIF1A (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha) und HSP90AA1 (heat shock protein 90 alpha family class A member 1); HSP70 selbst steht indirekt mit der anhaltenden Hypoxie in Verbindung

Anlagen im Anhang

BAG2 is an HSP70/HSPA8 molecular chaperone-interacting protein, functioning as a co-chaperone and facilitating the pro-folding activity of the cell. BAG2 inhibits STUB1/E2 cooperation, thereby inhibiting STUB1-mediated ubiquitination and protein degradation.

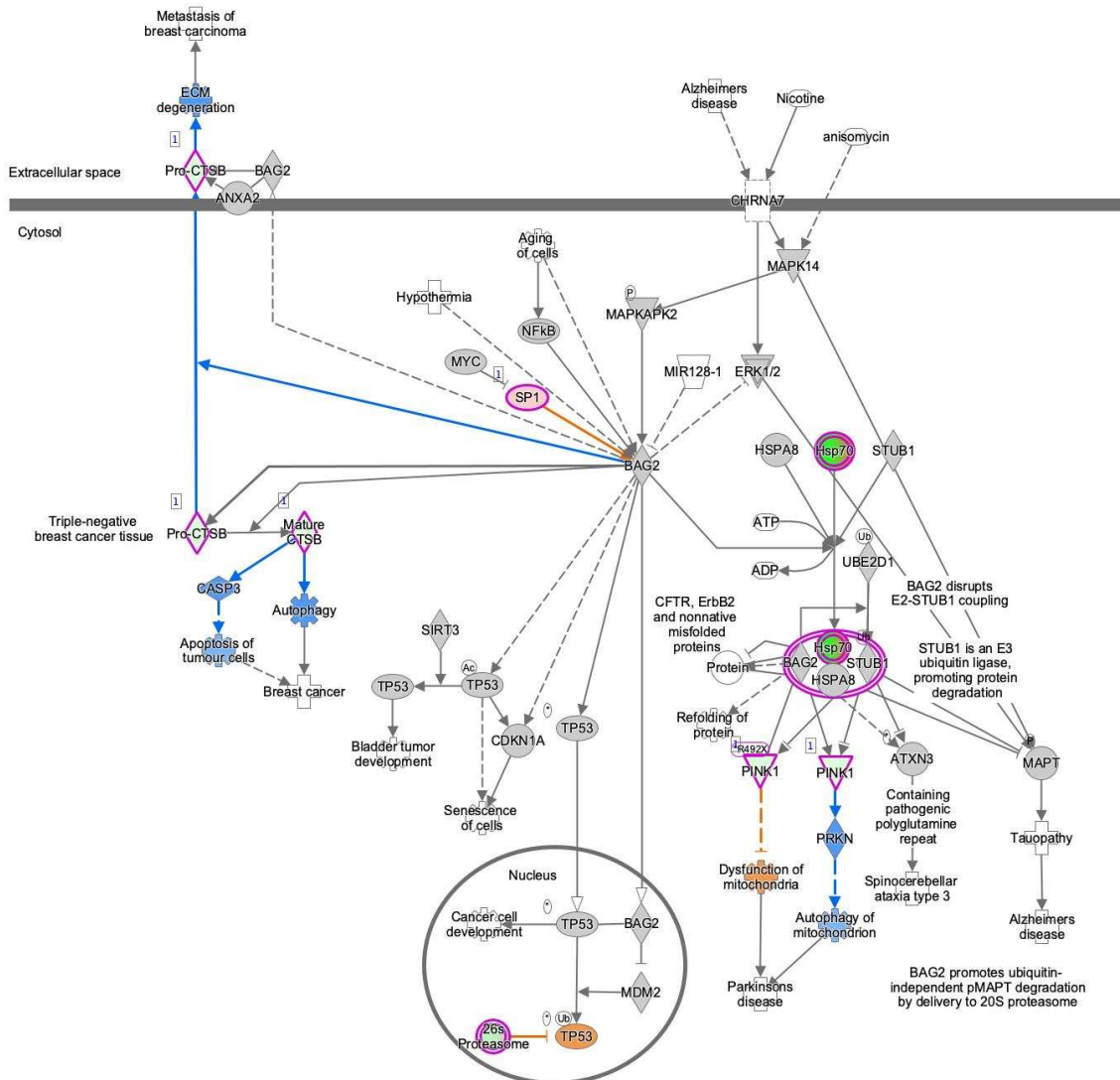


Abbildung 9.8: HSPA2 im Pathway „BAG2-Signalweg“ aus dem Datensatz SCA3 Patient Cerebellum

logFold Change von -2,364; p -Wert von $2,54 \cdot 10^{-4}$; Im Pathway ist HSPA2 als HSP70 eingezeichnet; der Pathway ist vor allem im Zytoplasma; HSP70 befindet sich mit BAG2, HSPA8 und STUB1 (STIP1 homology and U-box containing protein 1) in einem Komplex, welcher eine indirekte Verbindung zu ATXN3 hat; Aufgrund der pathologischen CAG-Wiederholungen auf dem ATXN3 Gen kommt es zur SCA3; der oben genannte Komplex führt zur Inhibierung von MAPT (microtubule associated protein tau), wodurch eine Tauopathie entsteht, was die Alzheimer Erkrankung auslöst; zudem aktiviert der oben genannte Komplex PINK1 (PTEN induced kinase 1), wodurch es zur Inhibierung von PRKN (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase) kommt und somit die Autophagie der Mitochondrien zu Morbus Parkinson führt;

außerdem kann PINK1 durch indirekte Inhibierung die Dysfunktion der Mitochondrien aktivieren, was wiederum zu Morbus Parkinson führt

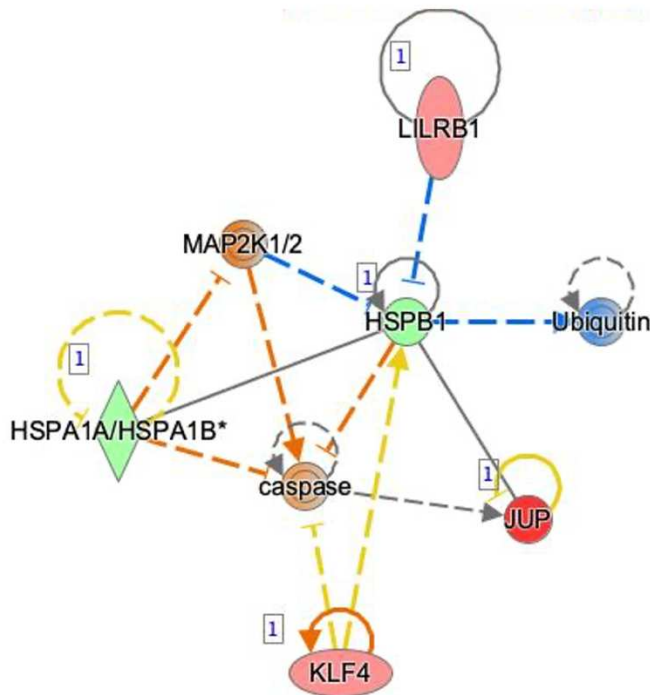


Abbildung 9.9: Runterreguliertes HSPB1 im Netzwerk „Zell-Kompromittierung, Zellentwicklung, Zellwachstum und -proliferation“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild; logFold Change von -0,289; p-Wert von $1,14 \cdot 10^{-2}$

Das runterregulierte HSPB1 aktiviert sich selbst, wobei eine Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist; HSPB1 wird vom hochregulierten LILRB1 (leukocyte immunoglobulin-like receptor B1) und vom aktivierten MAP2K1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase 1) indirekt inhibiert; die Expression von HSPB1 führt auf Ubiquitin zu einer Inhibierung; das runterregulierte HSPA1A/HSPA1B* und das hochregulierte JUP (junction plakoglobin) stehen mit HSPB1 in Interaktion, jedoch ist eine Vorhersage der Wirkung nicht möglich; Caspase wird durch die indirekte Inhibierung von HSPB1 aktiviert; das hochregulierte KLF4 (KLF transcription factor 4) aktiviert indirekt HSPB1, aber diese Verbindung stimmt nicht mit dem Zustand des nachgeschalteten Moleküls überein

rot: hochreguliert; grün: runterreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

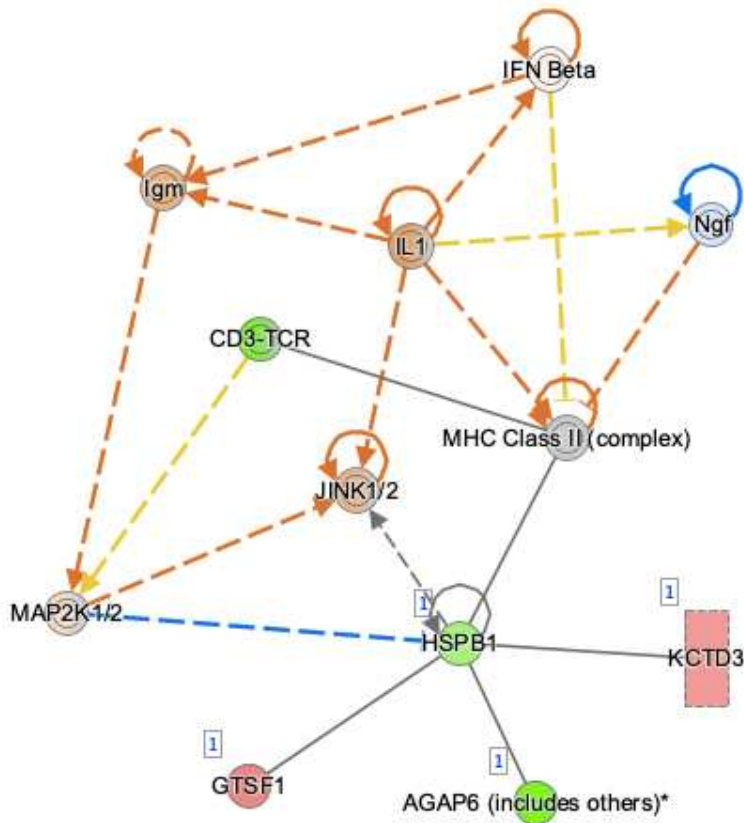


Abbildung 9.10: Runterreguliertes HSPB1 im Netzwerk „Zellvermittelte Immunantwort, Zellentwicklung, Zellfunktion und -erhaltung“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline schwer vs. präataktisch; logFold Change von -0,346; p-Wert von $2,81 e^{-2}$

Das runterregulierte HSPB1 aktiviert sich selbst, ohne dass die Wirkung des Mechanismus vorherzusagen ist. HSPB1 wird indirekt durch MAP2K1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase 1) inhibiert und JINK1/2 (c-Jun N-terminal kinase 1/2) wird indirekt durch HSPB1 aktiviert, wobei auch hier die Wirkung des Mechanismus nicht vorherzusehen ist; das gleiche gilt für die Interaktion von HSPB1 zu dem hochregulierten KCTD3 (potassium channel tetramerization domain containing 3), dem hochregulierten GTSF1 (gametocyte specific factor 1), dem runterregulierten AGAP6 (ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 6) und dem MHC-Klasse-II-Komplex (major histocompatibility complex class II)

rot: hochreguliert; grün: runterreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert



Abbildung 9.11: Runterreguliertes LTBP4 im Netzwerk Störungen des endokrinen Systems, Magen-Darm-Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen“ aus dem Datensatz SCA3 Maus Transgen 80Q präfrontaler Cortex Wildtyp 2M vs. Transgen 2M

logFold Change von -0,533; p -Wert $1,12 \cdot 10^{-4}$; LTBP4 steht in Interaktion mit Tgf beta (transforming growth factor beta), wobei keine Wirkung vorhersehbar ist; Tgf beta exprimiert sich selbst, aber auch hier ist die Wirkung vorhersehbar
grün: runterreguliert

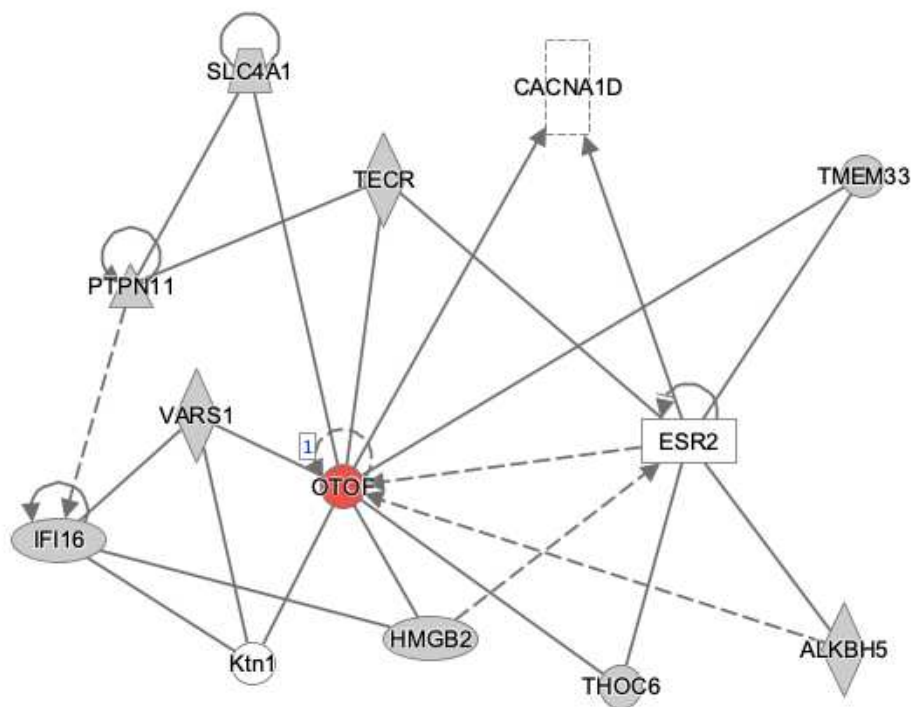


Abbildung 9.12: Hochreguliertes OTOF im Netzwerk „Zellmorphologie, Infektionskrankheiten, Organismenschäden und Anomalien“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild

Anlagen im Anhang

*logFold Change von 2,556; p-Wert von $2,42 \cdot 10^{-8}$; hochreguliertes OTOF übt eine indirekte Aktivierung auf sich selbst aus, wobei die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist; durch ESR2 (estrogen receptor 2) und ALKBH5 (alkB homolog 5, RNA demethylase) wird jeweils auf OTOF eine indirekte Expression ausgeübt; OTOF selbst aktiviert CACNA1D (calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 D) und es besteht eine Interaktion zwischen OTOF und jeweils VARS1 (valyl-tRNA synthetase 1), TECR (trans-2,3-enoyl-CoA reductase), TMEM33 (transmembrane protein 33), THOC6 (THO complex subunit 6), HMGB2 (high mobility group box 2), Ktn1 (kincetin 1) und SLC4A1 (solute carrier family 4 member 1 (Diego blood group)); dennoch ist bei allen genannten Verbindungen nicht ersichtlich, welche Wirkung diese haben
rot: hochreguliert*

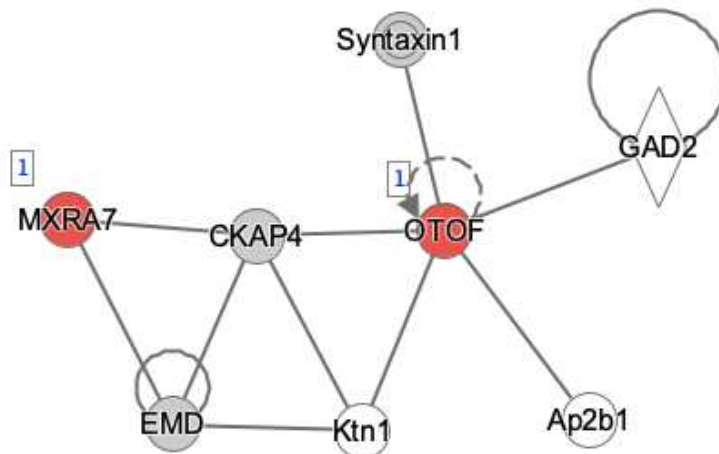


Abbildung 9.13: Hochreguliertes OTOF im Netzwerk „Hörkrankheit, immunologische Krankheit, Organismenverletzung und Anomalien“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline präataktisch vs. mild Männer

*logFold Change von 2,596; p-Wert von $4,39 \cdot 10^{-4}$; OTOF aktiviert sich indirekt selbst, dennoch kann keine Aussage über die Wirkung getroffen werden; OTOF steht jeweils in Interaktion mit GAD2 (glutamate decarboxylase 2), Ap2b1 (adaptor related protein complex 2 subunit beta 1), Ktn1 (kinectin 1), CKAP4 (cytoskeleton associated protein 4) und Syntaxin1, ohne die Wirkung des Mechanismus vorhersehen zu können
rot: hochreguliert*

Anlagen im Anhang

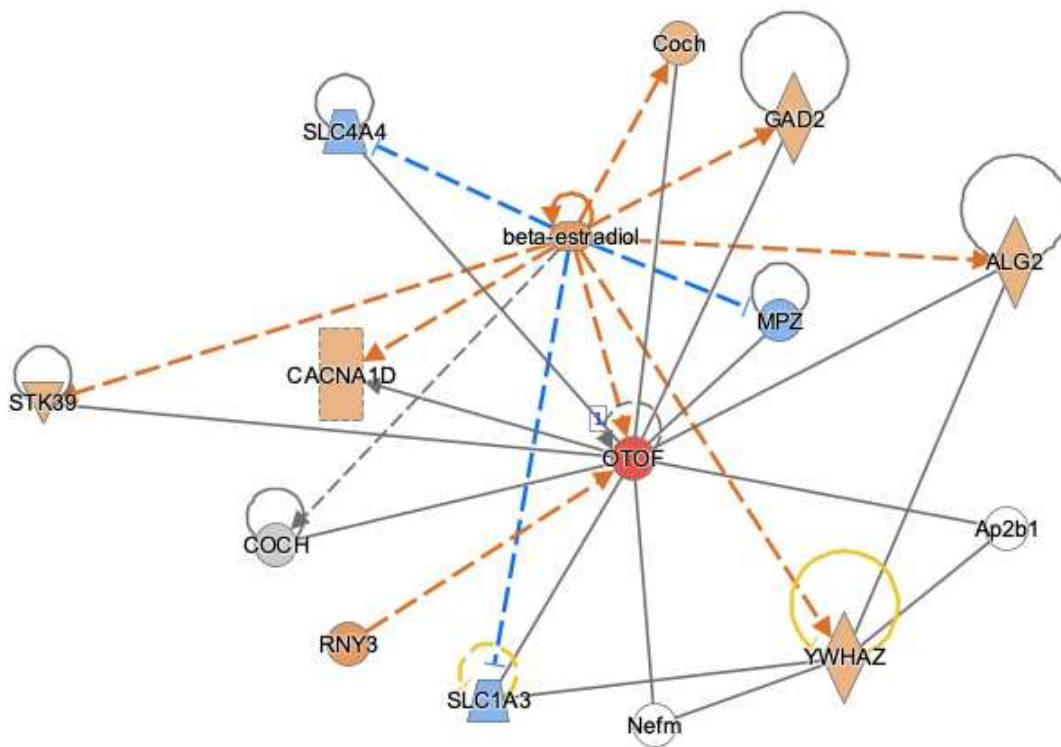


Abbildung 9.14: Hochreguliertes OTOF im Netzwerk „Entzündliche Erkrankung, Entzündungsreaktion, Organismenverletzung und Anomalien“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline Kontrolle vs. Mutationsträger

logFold Change von 1,563; *p*-Wert von $1,03 \cdot 10^{-4}$; OTOF aktiviert sich indirekt selbst ohne vorhersehbare Wirkung dessen; OTOF wird jeweils von beta-Estradiol und RNY3 (RNA, Ro60-associated Y3) indirekt aktiviert; selbst führt OTOF eine Aktivierung auf das aktivierte CACNA1D (calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 D) aus, wobei hier die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist; OTOF steht jeweils mit Nefm (neurofilamentt medium chain), Ap2b1 (adaptor related protein complex 2 subunit beta 1), dem aktivierten ALG2 (ALG2 alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase), dem inhibierten MPZ (myelin protein zero), GAD2 (glutamate decarboxylase 2), dem aktivierten Coch (cochlin), dem inhibierten SLC4A4 (solute carrier family 4 member 4), dem aktivierten STK39 (serine/threonine kinase 39), COCH (cochlin), und dem inhibierten SLC1A3 (solute carrier family 1 member 3) in Interaktion
rot: hochreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

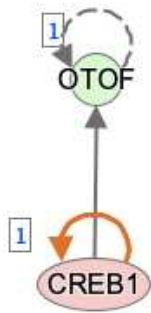
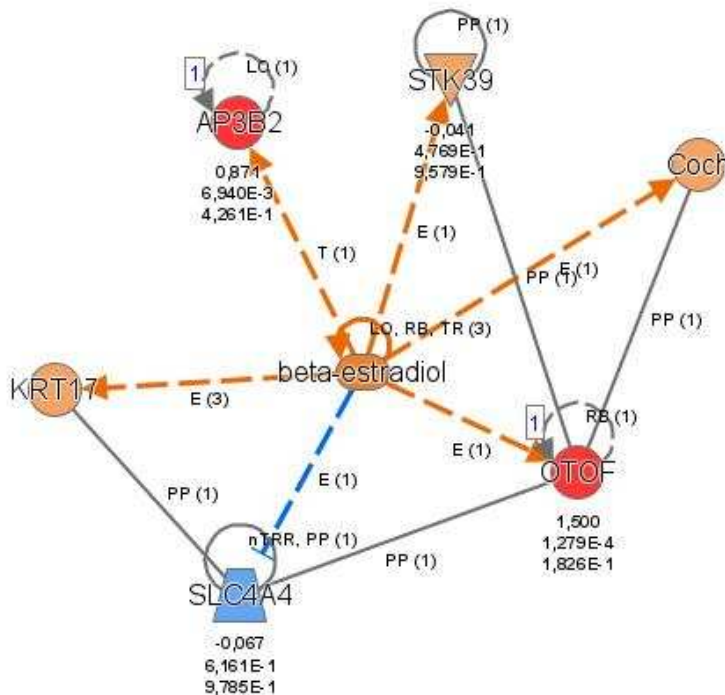


Abbildung 9.15: Runterreguliertes OTOF im Netzwerk „Störungen des endokrinen Systems, Verletzungen und Anomalien von Organismen, Erkrankungen des Fortpflanzungssystems“ aus dem Datensatz SCA3 Maus Transgen 80Q Cerebellum Wildtyp 2M vs. Transgen 2M

logFold Change von $-0,383$; p -Wert von $2,18 \cdot 10^{-2}$; Runterreguliertes OTOF aktiviert sich indirekt selbst, wobei die Wirkung des Mechanismus nicht vorhersehbar ist; OTOF wird vom hochregulierten CREB1 (cAMP responsive element binding protein 1), welches sich selbst aktiviert, exprimiert

rot: hochreguliert; grün: runterreguliert



Anlagen im Anhang

Abbildung 9.16: *OTOF* im Netzwerk „Zellmorphologie, Embryonalentwicklung, Haar- und Hautentwicklung und -funktion“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline alle

logFold Change von 1,50; *p-Wert* von $1,28 \cdot 10^{-4}$; *OTOF* wird vom sich selbst aktivierenden β -Estradiol indirekt aktiviert; zwischen *OTOF* und dem aktivierten *Coch* (*cochlin*), dem aktivierten *STK39* (*serine/threonine kinase 39*) und dem inhibierten *SLC4A4* (*solute carrier family 4 member 4*) liegt eine direkte Interaktion vor; zudem aktiviert sich das hochregulierte *OTOF* indirekt selbst, wobei hier eine Vorhersage der Wirkung nicht gemacht werden kann
rot: hochreguliert; blau: inhibiert; orange: aktiviert

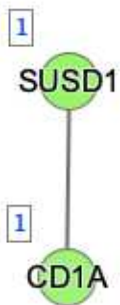
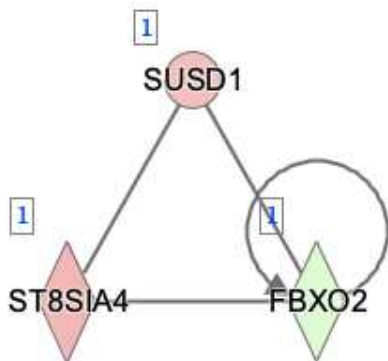


Abbildung 9.17: Runterreguliertes *SUSD1* im Netzwerk „Hämatologische Erkrankungen, Infektionskrankheiten, Organismenschäden und Anomalien“ aus dem Datensatz Blut ESMI Baseline präataktisch vs. Kontrolle

logFold Change von -0,297; *p-Wert* von $6,20 \cdot 10^{-5}$; runterreguliertes *SUSD1* steht in Interaktion zum runterreguliertem *CD1A* (*CD1a molecule*), wobei die Wirkung der Verbindung nicht vorhersehbar ist
grün: runterreguliert



Anlagen im Anhang

Abbildung 9.18: Hochreguliertes *SUSD1* im Netzwerk „Kohlenhydratstoffwechsel, molekularer Transport, posttranslationale Modifikation“ aus dem Datensatz *SCA3* Maus Transgen 80Q Cerebellum Wildtyp 2M und Transgen 2M

logFold Change von 0,32; p -Wert von $3,32 \cdot 10^{-1}$; hochreguliertes *SUSD1* interagiert mit dem hochregulierten *ST8SIA4* (*ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4*) und dem runterregulierten *FBXO2* (*F-box protein 2*); *ST8SIA4* und *FBXO2* stehen selber auch in Verbindung

rot: hochreguliert; grün: runterreguliert

9.2.2 Abbildungen zur Gradienten-PCR

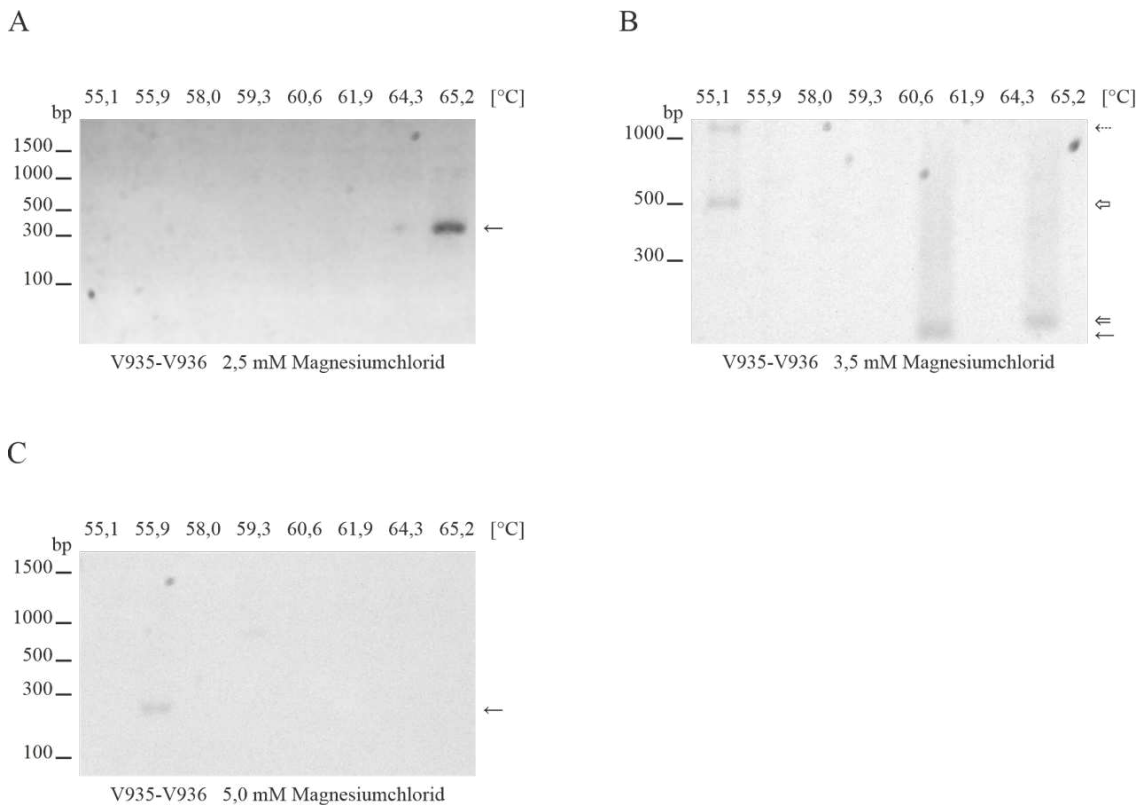


Abbildung 9.19: Gradienten-PCR von *SUSD1* V935-V936 zur Etablierung der Annealing-Temperatur

Horizontale gibt die verschiedenen Temperaturen [°C] an; Vertikale dient als Markierung der Basenpaare (bp)

A: Gesamtkonzentration von 2,5 mM $MgCl_2$; ← zeigt Bande bei 65,2 °C auf Höhe von 300 bp

Anlagen im Anhang

B: Gesamtkonzentration von 3,5 mM MgCl₂; ← zeigt Bande bei 61,9 °C auf Höhe von 150 bp; ⇐ zeigt Bande bei 65,2 °C auf Höhe von ca. 170 bp; ⇒ zeigt Bande bei 55,1 °C auf Höhe von 500 bp; ⇢ zeigt Bande bei 55,1 °C auf Höhe von über 1000 bp

C: Gesamtkonzentration von 5,0 mM MgCl₂; ← zeigt Bande bei 55,9 °C auf Höhe von 250 bp

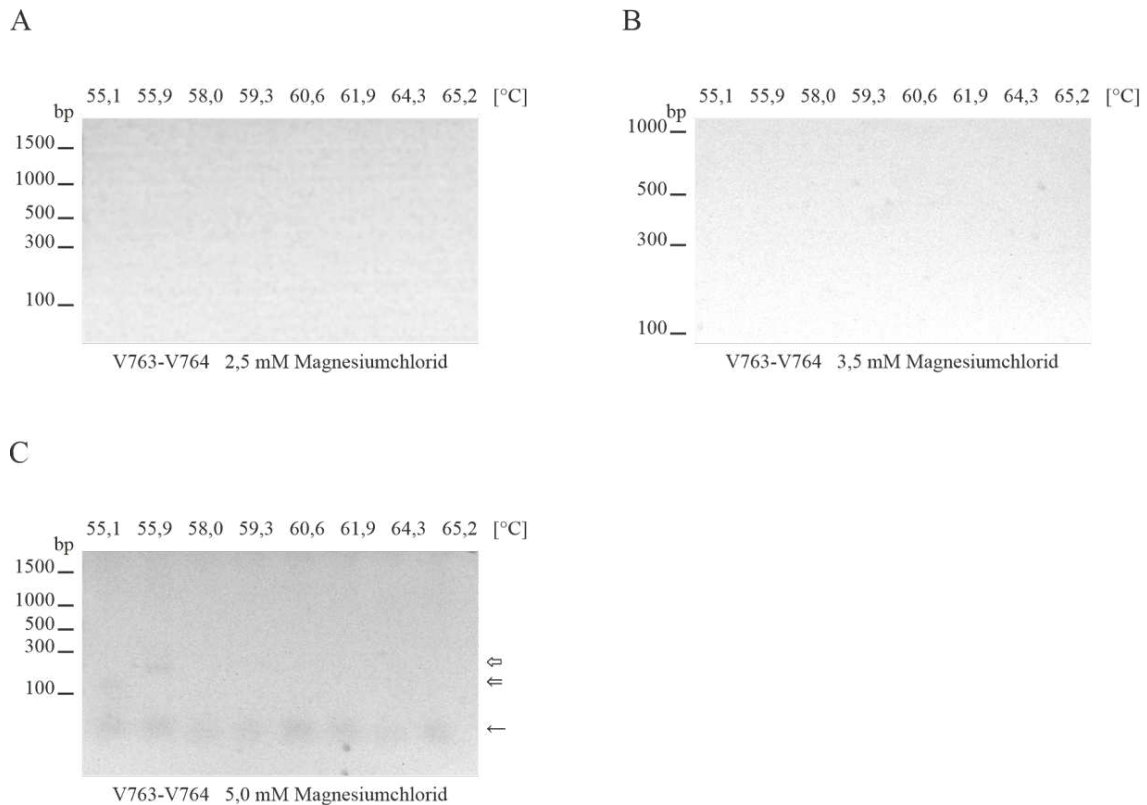


Abbildung 9.20: Gradienten-PCR von SUSD1 V763-V764 zur Etablierung der Annealing-Temperatur

Horizontale gibt die verschiedenen Temperaturen [°C] an; Vertikale dient als Markierung der Basenpaare (bp)

A: Gesamtkonzentration von 2,5 mM MgCl₂; keine Banden zu erkennen

B: Gesamtkonzentration von 3,5 mM MgCl₂; keine Banden zu erkennen

C: Gesamtkonzentration von 5,0 mM MgCl₂; ← zeigt Banden bei allen Temperaturen auf Höhe von 80 bp; ⇐ zeigt Bande bei 55,1 °C auf Höhe von 150 bp; ⇢ zeigt Bande bei 55,9 °C auf Höhe von 250 bp

Anlagen im Anhang

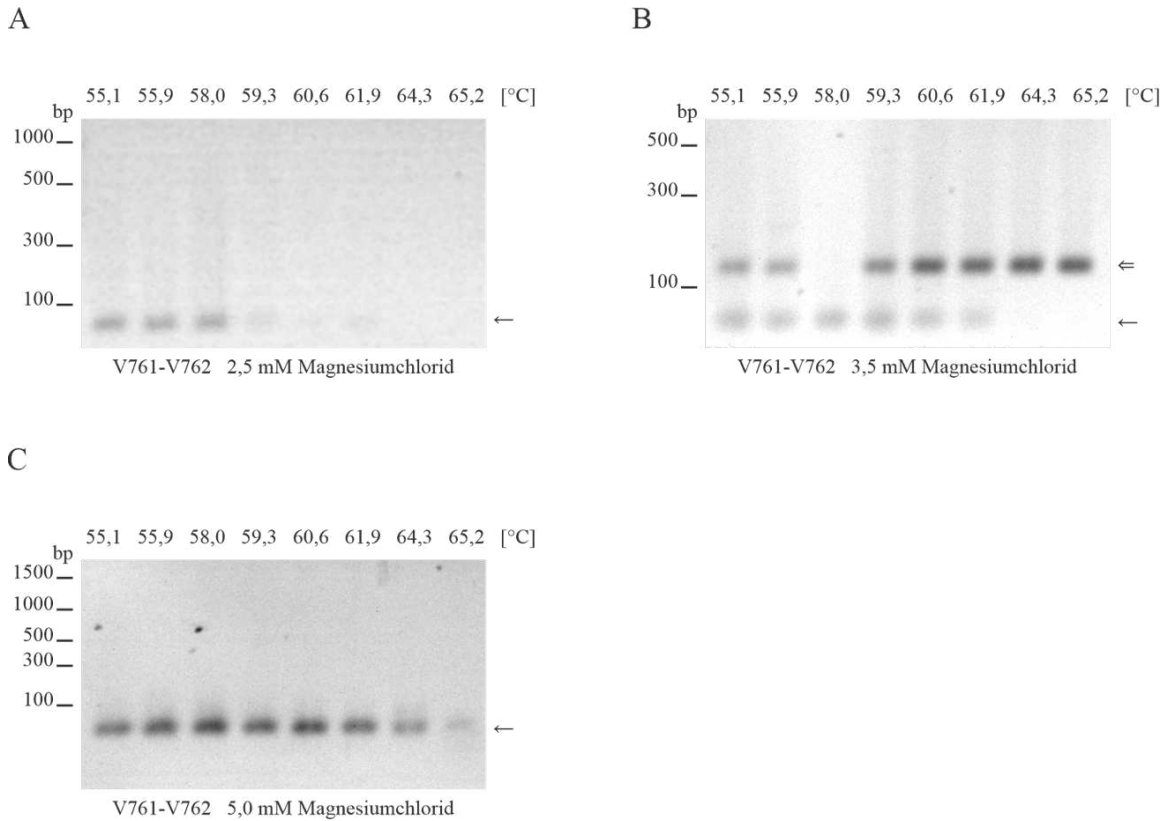


Abbildung 9.21: Gradienten-PCR von SFT2D2 V761-V762 zur Etablierung der Annealing-Temperatur

Horizontale gibt die verschiedenen Temperaturen [°C] an; Vertikale dient als Markierung der Basenpaare (bp)

A: Gesamtkonzentration von 2,5 mM MgCl₂; ← zeigt Banden bei den Temperaturen 55,1 °C, 55,9 °C, 58,0 °C, 59,3 °C, 60,6 °C, 61,9 °C auf Höhe von 80 bp; die Banden werden mit aufsteigender Temperatur blasser

B: Gesamtkonzentration von 3,5 mM MgCl₂; ⇐ zeigt intensive Banden bei den Temperaturen 55,1 °C, 55,9 °C, 59,3 °C, 60,6 °C, 61,9 °C, 64,3 °C, 65,2 °C auf Höhe von 150 bp; ← zeigt blasse Banden bei den Temperaturen 55,1 °C, 55,9 °C, 58,0 °C, 59,3 °C, 60,6 °C, 61,9 °C auf Höhe von 80 bp

C: Gesamtkonzentration von 5,0 mM MgCl₂; ← zeigt Banden bei allen Temperaturen auf Höhe von 80 bp; die Banden sind bei den niedrigeren Temperaturen deutlich intensiver

Anlagen im Anhang

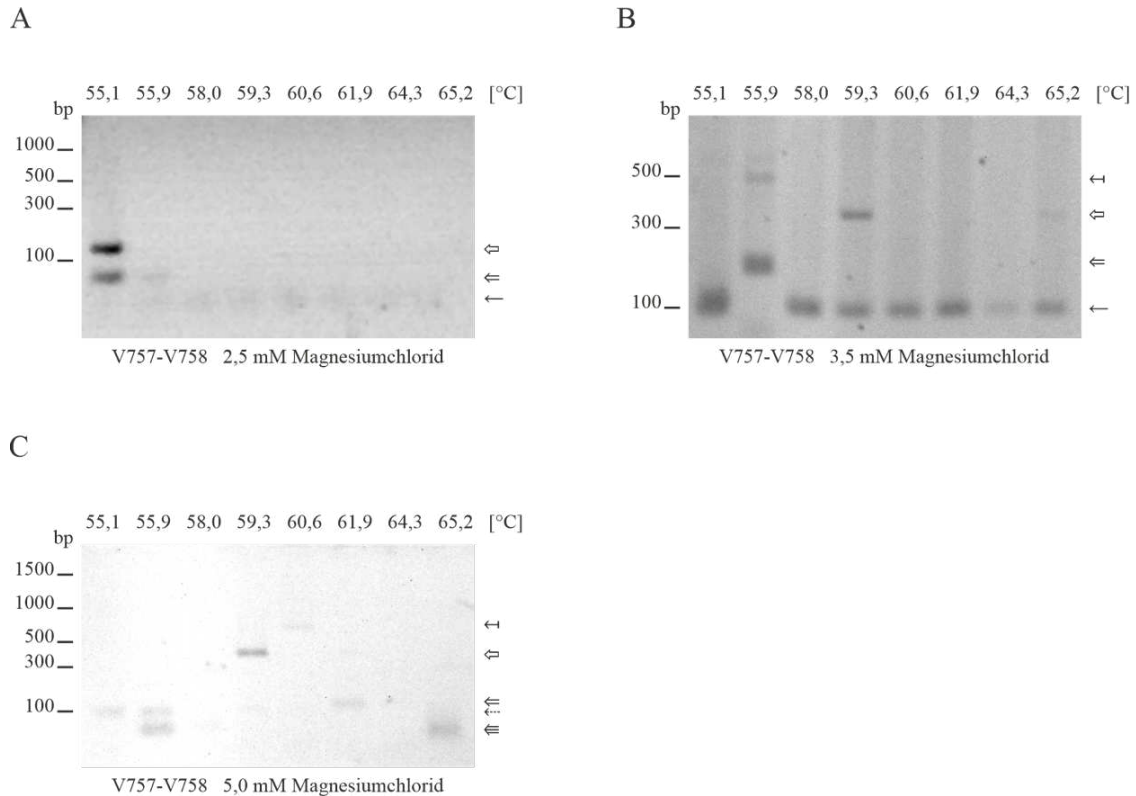


Abbildung 9.22: Gradienten-PCR von OTOF V757-V758 zur Etablierung der Annealing-Temperatur

A: Gesamtkonzentration von 2,5 mM MgCl₂; ← zeigt blasse Banden bei allen Temperaturen auf Höhe von 70 bp; ⇐ zeigt Banden bei den Temperaturen 55,1 °C (intensive Färbung), 55,9 °C (blasse Färbung) auf Höhe von 90 bp; ⇨ zeigt intensive Bande bei 55,1 °C auf Höhe von 120 bp

B: Gesamtkonzentration von 3,5 mM MgCl₂; ← zeigt Banden bei den Temperaturen 55,1 °C, 58,0 °C, 59,3 °C, 60,6 °C, 61,9 °C, 64,3 °C, 65,2 °C auf Höhe von 150 bp; ⇐ zeigt Bande bei 55,9 °C auf Höhe von 200 bp; ⇨ zeigt Banden bei 59,3 °C (intensive Färbung), bei 65,2 °C (blasse Färbung) auf Höhe von 350 bp; ⇩ zeigt Bande bei 55,9 °C auf Höhe von 500 bp

C: Gesamtkonzentration von 5,0 mM MgCl₂; ⇨ zeigt Banden bei 65,2 °C, 55,9 °C auf Höhe von 80 bp; ⇩ zeigt Banden bei 55,1 °C, 55,9 °C auf Höhe von 100 bp; ⇐ zeigt Bande bei 61,9 °C auf Höhe von 120 bp; ⇨ zeigt intensive Bande bei 59,3 °C auf Höhe von 400 bp; ⇩ zeigt Bande bei 59,3 °C auf Höhe von 750 bp

Anlagen im Anhang

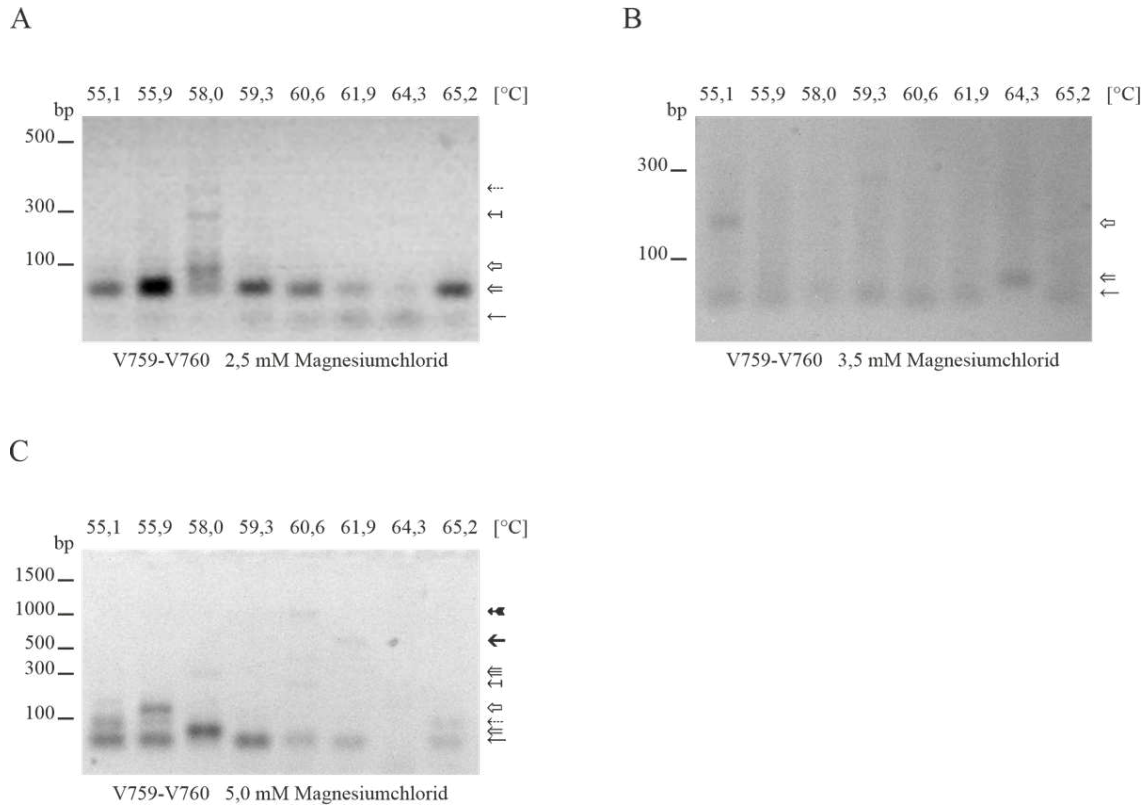


Abbildung 9.23: Gradienten-PCR von OTOF V759-V760 zur Etablierung der Annealing-Temperatur

A: Gesamtkonzentration von 2,5 mM MgCl₂; ← zeigt blasse Banden bei allen Temperaturen auf Höhe von 60 bp; ⇐ zeigt unterschiedlich stark gefärbte Banden bei allen Temperaturen auf Höhe von 90 bp; ⇔ zeigt Bande bei 58,0 °C auf Höhe von 100 bp; ↔ zeigt Bande bei 58,0 °C auf Höhe von 300 bp; ↚ zeigt Bande bei 58,0 °C auf Höhe von 350 bp

B: Gesamtkonzentration von 3,5 mM MgCl₂; ← zeigt Banden bei den Temperaturen 55,1 °C, 55,9 °C, 58,0 °C, 59,3 °C, 60,6 °C, 61,9 °C, 65,2 °C auf Höhe von 60 bp; ⇐ zeigt Bande bei 64,3 °C auf Höhe von 200 bp; ⇔ zeigt Bande bei 55,1 °C auf Höhe von 200 bp

C: Gesamtkonzentration von 5,0 mM MgCl₂; ← zeigt Banden bei den Temperaturen 55,1 °C, 55,9 °C, 59,3 °C, 60,6 °C, 61,9 °C, 65,2 °C auf Höhe von 70 bp; ⇐ zeigt Bande bei 58,0 °C auf Höhe von 80 bp; ↚ zeigt Banden bei 55,1 °C, 65,2 °C auf Höhe von 100 bp; ⇔ zeigt Bande bei 55,9 °C auf Höhe von 130 bp; ↔ zeigt Bande bei 60,6 °C auf Höhe von 290 bp; ⇐ zeigt Bande 58,0 °C auf Höhe von 300 bp; → zeigt Bande bei 61,9 °C auf Höhe von 750 bp; ↗ zeigt Bande bei 60,6 °C auf Höhe von 1000 bp

Anlagen im Anhang

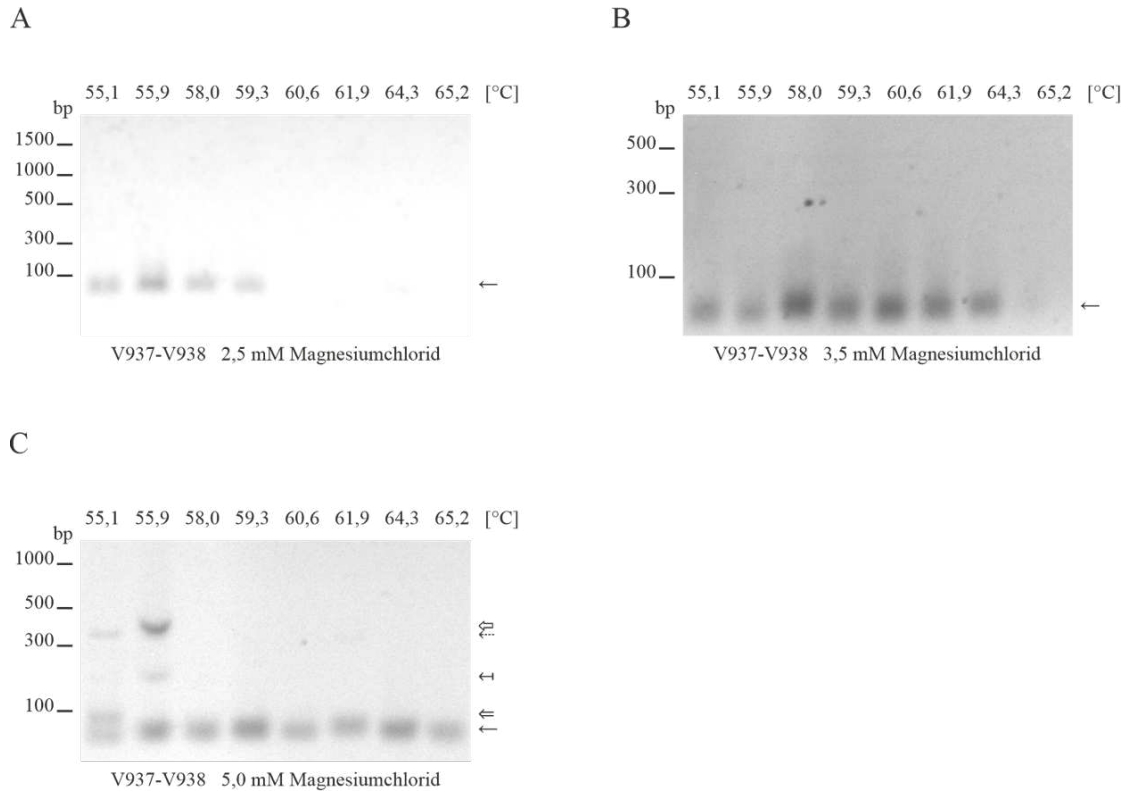


Abbildung 9.24: Gradienten-PCR von OTOF V937-V938 zur Etablierung der Annealing-Temperatur

A: Gesamtkonzentration von 2,5 mM $MgCl_2$; ← zeigt blasse Banden bei 55,1 °C, 55,9 °C, 58,0 °C, 59,3 °C auf Höhe von 90 bp

B: Gesamtkonzentration von 3,5 mM $MgCl_2$; ← zeigt Banden bei 55,1 °C, 55,9 °C, 58,0 °C, 59,3 °C, 60,6 °C, 61,9 °C, 64,3 °C auf Höhe von 90 bp

C: Gesamtkonzentration von 5,0 mM $MgCl_2$; ← zeigt Banden bei allen Temperaturen auf Höhe von 90 bp; ↖ zeigt Bande bei 55,1 °C auf Höhe von 100 bp; ↗ zeigt Bande bei 55,9 °C auf Höhe von 400 bp