

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

**Longitudinale Biomarkeranalysen in der  
Spinocerebellären Ataxie Typ 3**

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

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

**vorgelegt von  
Heide, Marie Sophie**

**2025**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler  
1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß  
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Synofzik

Tag der Disputation: 12.11.2025

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	13
1.1 Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)	13
1.2 Epidemiologie	14
1.3 Symptomatik	16
1.4 Genetik	19
1.5 Ataxin-3 und Pathogenese	20
1.6 Therapie	26
1.7 Biomarker in der SCA3	28
1.8 Messtechniken des Ataxin-3	34
1.9 SNP im ATXN3 Gen	37
1.10 ESMI-Kohorte	39
1.11 Ziele dieser Arbeit	40
2 Material und Methoden	42
2.1 Material	42
2.1.1 Gewinnung der Biomaterialien und klinischen Daten	42
2.2 Methodik	47
2.2.1 DNA-Isolation aus Blutproben	47
2.2.2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	48
2.2.3 Bestimmung der CAG Wiederholungsanzahl im Ataxin-3 Gen	49
2.2.4 PCR CAG Bestimmung	49
2.2.5 PCR für SNP 1118 und SNP 987	50
2.2.6 Gelelektrophorese	53
2.2.7 Fragmentlängenanalyse	55
2.2.8 High Resolution Melting SNP 668	58
2.2.9 Lyse der PBMCs	62
2.2.10 Bradford Assay	63

2.2.11	Herstellung der Positiv Kontrollen _____	64
2.2.12	TR FRET _____	66
2.2.13	Statistische Methoden _____	70
3	Ergebnisse _____	71
3.1	Full-length Ataxin-3 mit TR-FRET _____	73
3.1.1	Kohortenanalyse _____	73
3.1.2	Statistische Analyse der Ataxin-3 Proteinlevel und klinischen Parameter _____	77
3.2	Expandiertes Ataxin-3 im Simoa _____	82
3.2.1	Kohortenanalyse _____	83
3.2.2	Statistische Analyse der Ataxin-3-Konzentration und der klinischen Parameter _____	86
3.2.3	Korrelation der klinischen Daten mit der expandierte Ataxin-3 Konzentration im Plasma. _____	88
3.3	Expandiertes Ataxin-3 im Singulex _____	91
3.3.1	Kohortenanalyse _____	91
3.3.2	Statistische Analyse der Ataxin-3 Proteinlevel und klinischen Parameter _____	95
3.4	Gesamt Ataxin-3 im TR-FRET Assay im longitudinalen Studiendesign 99	
3.4.1	Kohortenanalyse der Follow Up 1 Kohorte _____	99
3.4.2	Statistische Analyse der Ataxin-3 Proteinlevel und klinischen Parameter _____	101
3.4.3	Kohortenanalyse der Follow Up 2 und 3 Kohorte _____	104
3.4.4	Longitudinale Analyse in TR-FRET n-Term Kohorte _____	107
3.5	Expandiertes Ataxin-3 im Simoa Assay im longitudinalen Studiendesign _____	119
3.5.1	Kohortenanalyse in der Follow Up 1 Kohorte _____	119
3.5.2	Statistische Analyse der Ataxin-3 Proteinlevel und klinischen Parameter _____	121
3.5.3	Longitudinale Analyse in der Simoa Assay Kohorte _____	124
3.6	Longitudinale Auswertung Singulex _____	130
3.6.1	Kohortenanalyse der Follow Up 1 Kohorte im Singulex _____	130
3.6.2	Kohortenanalyse des Follow Up 2 Visit im Singulex _____	135

3.6.3	Longitudinale Auswertung der Singulex-Kohorte _____	140
3.7	Vergleich des expandierten Ataxin-3 in Singulex Assay und im Simoa Assay	152
3.7.1	Kohortenanalyse der Singulex und Simoa Assay Kohorte ____	152
3.7.2	Vergleich der Trennschärfe für Singulex Assay vs. Simoa Assay	153
3.7.3	Vergleich des Simoa und Singulex Assays in der longitudinalen Analyse	156
3.8	Vergleich der Ataxin-3 Konzentration in Simoa und TR-FRET ____	167
3.8.1	Kohortenanalyse der Simoa und TR-FRET Kohorte _____	167
3.8.2	Vergleich der Trennschärfe für Simoa Assay vs. TR-FRET Assay	168
3.8.3	Longitudinale Analyse der Simoa und TR-FRET Daten im Vergleich _____	171
3.9	Vergleich Singulex vs. TR-FRET n-Term _____	177
3.9.1	Kohortenanalyse für die Kohorte Singulex vs. TR-FRET ____	177
3.9.2	Vergleich der Trennschärfe des Singulex Assay vs. n-Term TR-FRET Assay _____	178
3.9.3	Longitudinale Biomarker Analyse in den Singulex und n-term Daten	181
3.10	Analyse des ATXN3 SNPs an BP 1118 _____	191
3.11	Analyse des ATXN3 SNP an BP 987 _____	193
3.12	Analyse des ATXN3 SNP an BP 669 _____	195
4	Diskussion _____	197
4.1	Ataxin-3 als Biomarker _____	198
4.2	Longitudinale Analyse der Ataxin-3 Level in den Messmethoden TR-FRET, Simoa und Singulex _____	205
4.3	Genotypen der Kohorte _____	214
4.4	Stärken und Schwächen der Promotion _____	219
5	Zusammenfassung _____	222
6	Literaturverzeichnis: _____	224
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	237
8	Danksagung _____	239

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Formel zur Berechnung von $\Delta F$ (Abbildung nach Promotion Patrick Pelz 2022 Tübingen) .....	35
Abbildung 2.1: Foto der Gelelektrophorese unter UV-Licht der CAG PCR der Proben Tübingen 40,41,42,43,44,45 (2 X) sowie an erster und letzter Position den Gene RulerMix der Firma Peqlab.....	55
Abbildung 2.2 CAG Längenanalyse der Probe Bo56 mit Genotyp 21/28:.....	58
Abbildung 2.3: Auswertung der Fragmentlängenanalyse der PCR zu Amplifizierung für SNP 1118 .....	58
Abbildung 2.4: Melting Curve SNP 669.....	60
Abbildung 2.5: melting peak SNP 669 Genotyp A/A.....	61
Abbildung 2.6: melting peak Genotyp SNP 669 A/G.....	61
Abbildung 2.7: Melting Peak Genotyp SNP 669 G/G.....	62
Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des Ataxin-3 Proteins mit Bindungsdomäne der Antikörper 1H9 D2 (lila) und n term Tb (rot.) .....	69
Abbildung 3.1: Darstellung der Arbeitsschritte dieser Promotion in einem Flussdiagramm: .....	72
Abbildung 3.2 Darstellung der Arbeitsschritte der Promotion .....	73
Abbildung 3.3 A Alter der Baseline Kohorte B SARA der Baseline Kohorte:....	74
Abbildung 3.4: Geschlechterverteilung der Baseline Kohorte der TR-FRET-Gruppe.....	75
Abbildung 3.5: A INAS der Baseline Kohorte: B CAG-Repeat des expandierten Allels der Baseline Kohorte .....	77
Abbildung 3.6 A Vergleich der Gesamt Ataxin-3 Protein-Konzentrationen B ROC Curve Kontrolle vs. prä-ataktische Gruppe C ROC Curve prä-ataktisch vs. ataktisch D ROC Curve Kontrollen vs. ataktisch .....	79
Abbildung 3.7: A AAO vs. CAG Repeat B SARA vs. $\Delta F$ Ataxin-3 C INAS vs. $\Delta F$ Ataxin-3 D AAO vs. $\Delta F$ Ataxin-3 E SARA vs. AAO F DD vs. $\Delta F$ Ataxin-3.....	80
Abbildung 3.8 Darstellung der Arbeitsschritte der Promotion .....	83

Abbildung 3.9: Geschlechterverteilung in der Baseline-Kohorte in der Simoa-Gruppe.....	84
Abbildung 3.10: A Alter in der Baseline Kohorte in der Simoa-Gruppe B SARA in der Baseline Kohorte in der Simoa-Gruppe .....	85
Abbildung 3.11 A INAS Score der Baseline Kohorte der mit dem Simoa Assay untersuchten Probanden B expandierte CAG Repeat Länge der Baseline Kohorte der mit dem Simoa Assay untersuchten Probanden.....	86
Abbildung 3.12 A Vergleich der Ataxin-3-Proteinkonzentrationen B ROC Curve Kontrolle vs. prä-ataktisch C ROC Curve Kontrolle vs. ataktischD ROC Curve prä-ataktisch vs. ataktisch.....	88
Abbildung 3.13 A SARA Score vs. expandierte Ataxin-3 Konzentration im Plasma B INAS Score vs. expandierte Ataxin-3 Konzentration im Plasma C AAO vs. expandiertes Ataxin-3 Konzentration im Plasma D SARA vs. AAO.....	90
Abbildung 3.14 Darstellung der Arbeitsschritte der Promotion .....	91
Abbildung 3.15: Geschlechterverteilung der Baseline Kohorte der Singulex Gruppe.....	92
Abbildung 3.16 A Alter der Baseline Kohorte der Singulex Gruppe: B SARA Score der Baseline Kohorte der Singulex Gruppe .....	93
Abbildung 3.17 A INAS der Baseline Kohorte der Singulex Gruppe B CAG-Repeat der Baseline Kohorte der Singulex Grupp.....	94
Abbildung 3.18 A Vergleich der Ataxin-3-Konzentrationen B ROC Curve der Kontrollen und prä-ataktischen Probanden C ROC Curve der Kontrollen und ataktischen Probanden D ROC Curve der prä-ataktischen und ataktischen Probanden.....	96
Abbildung 3.19 A SARA vs. expandiertes Ataxin-3 im Plasma B INAS vs. expandiertes Ataxin-3 im Plasma C AAO vs. expandiertes Ataxin-3 in Plasma D SARA vs. AAO der Baseline Kohorte .....	98
Abbildung 3.20 A Vergleich der Ataxin-3 Konzentrationen B ROC Curve Kontrollen vs. prä-ataktische Probanden C ROC-Curve prä-ataktische Probanden vs. ataktische Probanden D ROC Curve Kontrollen vs. ataktische Probanden.....	102

Abbildung 3.21 A SARA Score vs. full-length Ataxin-3 Proteinkonzentration in PBMCs B INAS Score vs. full-length Ataxin-3 Proteinkonzentration in PBMCs C AAO vs. full-length Ataxin-3 Proteinkonzentration in PBMCs D SARA Score vs. AAO der ataktischen Probanden. ....	104
Abbildung 3.22 A Gesamt Ataxin-3 Konzentration des Follow Up 2 Gruppe B Gesamt Ataxin-3 Konzentration der Follow Up 3 Gruppe .....	106
Abbildung 3.23 A SARA Score der n-Term Kohorte im longitudinalen Verlauf B Ataxin-3 Konzentration der n-Term Kohorte im longitudinalen Verlauf .....	108
Abbildung 3.24 A Ataxin-3 Konzentration der Kontrollprobanden B Ataxin-3 Konzentration der prä-ataktischen Probanden C Ataxin-3 Konzentration der mild ataktischen Probanden D Ataxin-3 Konzentration der moderat ataktischen Probanden E Ataxin-3 Konzentration der schwer ataktischen Probanden .....	110
Abbildung 3.25 A SARA Score prä-ataktische Probanden B SARA Score mild ataktische Probanden C SARA Score moderat ataktische Probanden D SARA Score schwer ataktische Probanden .....	111
Abbildung 3.26: Ataxin-3-Werte der moderat ataktischen Probanden im longitudinalen Verlauf .....	112
Abbildung 3.27: Ataxin-3 Konzentration eines prä-ataktischen Probanden B Ataxin-3 Konzentration eines mild ataktischen Probanden C Ataxin-3 Konzentration moderat ataktischer Probanden mit 2 Visiten D Ataxin-3 Konzentration eines schwer ataktischen Probanden .....	113
Abbildung 3.28 A Konverter mild ataktisch zu moderat ataktisch B Konverter prä-ataktisch zu mild ataktisch C Konverter mild-ataktisch zu prä-ataktisch D Konverter moderat ataktisch zu mild ataktisch .....	117
Abbildung 3.29 A Konverter 1 moderat-zu schwer ataktisch B Konverter 2 moderat zu schwer ataktisch .....	118
Abbildung 3.30 A Konverter 1 prä-ataktisch zu mild ataktisch B Konverter 2 prä-ataktisch zu mild ataktisch .....	118
Abbildung 3.31 A Vergleich der expandierten Ataxin-3 B ROC Curve Kontrollen vs ataktisch C ROC Curve Kontrolle vs Mutationsträger .....	122
Abbildung 3.32 A SARA vs expandiertes Ataxin-3 im Plasma B INAS vs expandiertes Ataxin-3 C AAO vs expandiertes Ataxin-3 im Plasma .....	124

Abbildung 3.33 A Ataxin-3 Konzentration in den Mutationsträgern longitudinal B SARA Score in den Mutationsträgern longitudinal .....	125
Abbildung 3.34 A Ataxin-3 Konzentration in Kontrollen longitudinal B Ataxin-3 Konzentration der prä-ataktischen Probanden longitudinal C Ataxin-3 Konzentration in mild ataktischen Probanden longitudinal D Ataxin-3 Konzentration in moderat ataktischen Probanden longitudinal E Ataxin-3 Konzentration in schwer ataktischen Probanden longitudinal .....	126
Abbildung 3.35 A SARA Score der Kontrollen longitudinal B SARA Score der prä-ataktischen Probandin longitudinal C SARA Score der mild ataktischen Probanden longitudinal D SARA Score der moderat ataktischen Probanden longitudinal E SARA Score der schwer ataktischen Probanden longitudinal .	127
Abbildung 3.36 A Ataxin-3 Konzentration in Konverter 1 und 2 Ataxin-3 B Ataxin-3 Konzentration in Konverter 3 C SARA Score in Konverter 1 und 2 D SARA Score in Konverter 3 .....	129
Abbildung 3.37 A-C Auswertung des Simoa Assays der Mutationsträger für die Baseline und den Follow Up 1 .....	130
Abbildung 3.38 A Ataxin-3-Konzentrationen der Kontrollen, prä-ataktischen und ataktischen Probanden B ROC Curve Kontrollen vs. ataktische Probanden C ROC Curve vs. prä-ataktisch D ROC Curve prä-ataktisch vs. ataktisch. ....	133
Abbildung 3.39 A SARA vs. Expandiertes Expandiertes Ataxin-3 im Plasma B INAS vs. expandiertes Ataxin-3 im Plasma C AAO vs. expandiertes Ataxin-3 im Plasma D SARA vs. AAO.....	135
Abbildung 3.40 A Ataxin-3 Konzentrationen der Kontrollen, prä-ataktischen Probanden und ataktischen Probanden B ROC Curve Kontrollen vs ataktisch C ROC Curve Kontrollen vs prä-ataktisch D ROC Curve prä-ataktisch vs ataktisch .....	138
Abbildung 3.41 A SARA Score vs. Ataxin-3 Konzentration im Plasma B INAS Score vs. Ataxin-3 Konzentration im Plasma C AAO vs. Ataxin-3 Konzentration im Plasma D SARA Score vs. AAO .....	140
Abbildung 3.42 A Ataxin-3 Konzentration Mutationsträger 2 Visiten B Ataxin-3 Konzentration Mutationsträger 3 Visiten C SARA Score Mutationsträger 2 Visiten D SARA Score Mutationsträger 3 Visiten .....	141

Abbildung 3.43 A Hintergrundsignal der Kontrollprobanden B Ataxin-3 Konzentration der prä-ataktischen Probanden C Ataxin-3 Konzentration mild ataktische Probanden D Ataxin-3 Konzentration moderat ataktische Probanden E Ataxin-3 Konzentration schwer ataktische Probanden .....	144
Abbildung 3.44 A Hintergrundsignal in den Kontrollprobanden B Ataxin-3 Konzentration der mild ataktischen Probanden C Ataxin-3 Konzentration der moderat ataktischen Probanden D Ataxin-3 Konzentration der schwer ataktischen Probanden. ....	147
Abbildung 3.45 A SARA Score der mild ataktischen Probanden B SARA Score der prä-ataktischen Probanden C SARA Score der moderat ataktischen Probanden D SARA Score der schwer ataktischen Probanden .....	148
Abbildung 3.46 A SARA Score mild ataktisch B SARA Score moderat ataktisch C SARA schwer ataktisch .....	150
Abbildung 3.47 A-F Konverter der Singulex Kohorte mit ihren Ataxin-3 Konzentrationen A Konverter von moderat zu schwer ataktisch B Konverter von mild ataktisch zu moderat ataktisch und zu mild ataktisch C Konverter von moderat zu mild ataktisch D Konverter von mild zu moderat ataktisch E Konverter von mild ataktisch zu moderat ataktisch F Konverter von mild ataktisch zu moderat ataktisch zu mild ataktisch .....	151
Abbildung 3.48 A Ataxin-3 Konzentrationen der Kontrollen, prä-ataktischen und ataktischen Probanden B ROC Curve Kontrollen vs prä-ataktisch C ROC Curve Kontrollen vs ataktisch D ROC Curve prä-ataktisch vs ataktisch .....	154
Abbildung 3.49 A Ataxin-3 Konzentrationen der Kontrollen, prä-ataktischen und ataktischen Probanden B ROC Curve Kontrollen vs prä-ataktisch C ROC Curve Kontrollen vs ataktisch D ROC Curve prä-ataktisch vs ataktisch .....	156
Abbildung 3.50 A Simoa Kontrolle B Singulex Kontrolle C Simoa prä-ataktisch D Singulex prä-ataktisch E Simoa mild ataktisch F Singulex mild ataktisch G Simoa moderat ataktisch H Singulex moderat ataktisch.....	159
Abbildung 3.51 A Konverter prä-ataktisch-mild ataktisch Simoa B Konverter prä-ataktisch-mild ataktisch Singulex C Konverter mild ataktisch-moderat ataktisch Simoa D Konverter mild ataktisch-moderat ataktisch Singulex .....	161

Abbildung 3.52 A SARA prä-ataktisch B SARA mild ataktisch C SARA moderat ataktisch D SARA longitudinal.....	162
Abbildung 3.53 A Simoa Baseline B Simoa Follow Up 1 .....	163
Abbildung 3.54 A Singulex Baseline B Singulex Follow Up 1.....	164
Abbildung 3.55 A SARA Score longitudinal B Simoa Assay longitudinal C Singulex Assay longitudinal D Singulex longitudinal in CPT-Röhrchen...	166
Abbildung 3.56 A Konzentration an expandiertem Ataxin-3 in Kontrollen, prä-ataktische Probanden und ataktischen Probanden B ROC Curve der Kontrollen vs. prä-ataktischen Probanden C ROC Curve der Kontrollen vs. ataktischen Probanden D ROC Curve prä-ataktisch vs. ataktische Probanden .....	170
Abbildung 3.57 A Konzentration an Gesamt Ataxin-3 in Kontrollen, prä-ataktischen und ataktischen Probanden B ROC Curve Kontrollen vs. prä-ataktisch C ROC Curve Kontrollen vs. ataktisch D ROC Curve prä-ataktisch vs. ataktisch.....	171
Abbildung 3.58 A Expandierte Ataxin-3 Konzentration der mild ataktischen Probanden B Gesamt Ataxin-3 Konzentration der mild ataktischen Probanden C Expandierte Ataxin-3 Konzentration des moderat ataktischen Probanden D Gesamt Ataxin-3 Konzentration des moderat ataktischen Probanden E Expandierte Ataxin-3 Konzentration des schwer ataktischen Probanden F Expandierte Ataxin-3 Konzentration des schwer ataktischen Probanden 2 ...	175
Abbildung 3.59 A Konverter Simoa B Konverter n-Term TR-FRET .....	175
Abbildung 3.60 A SARA Score der mild ataktischen Probanden B SARA Score des moderat ataktischen Probanden C SARA Score des schwer ataktischen Probanden.....	176
Abbildung 3.61 A SARA Score longitudinal B expandiertes Ataxin-3 Simoa longitudinal C full-length Ataxin-3 n-Term longitudinal. ....	177
Abbildung 3.62 A Ataxin-3 Konzentration der Kontrollprobanden, prä-ataktischen und ataktischen Probanden mit dem n-term TR-FRET Assay B ROC Curve Kontrollen vs. ataktische Probanden C ROC Curve Kontrollen vs. prä-ataktisch: D ROC Curve prä-ataktische Probanden vs. ataktische Probanden.....	180
Abbildung 3.63 A Ataxin-3 Konzentration der Kontrollprobanden, prä-ataktischen und ataktischen Probanden im Singulex Assay B ROC Curve Kontrollprobanden	

vs. ataktische Probanden C ROC Curve Kontrollprobanden vs. prä-ataktische Probanden D ROC Curve prä-ataktische vs. ataktische Probanden .....	181
Abbildung 3.64 A Kontrollprobanden n-term B Kontrollprobanden Singulex C prä-ataktische Probanden n-term D prä-ataktische Probanden Singulex E mild ataktische Probanden n-term F mild ataktische Probanden Singulex.....	185
Abbildung 3.65 A moderat ataktische Probanden n-term B moderat ataktische Probanden Singulex C schwer ataktische Probanden n-term D schwer ataktische Probanden Singulex .....	186
Abbildung 3.66 A SARA Score prä-ataktische Probanden B SARA Score mild ataktische Probanden C SARA Score moderat ataktische Probanden D SARA Score schwer ataktische Probanden .....	187
Abbildung 3.67 A Gesamt Ataxin-3 der Konverter moderat-mild ataktisch B Expandiertes Ataxin-3 der Konverter moderat-mild ataktische.....	189
Abbildung 3.68 A Gesamt Ataxin-3 Konzentration des Konverter prä-ataktisch-mild ataktisch B Expandierte Ataxin-3 Konzentration Konverter prä-ataktisch-mild ataktisch C Gesamt Ataxin-3 Konzentration des Konverters prä-ataktisch-mild ataktisch-prä-ataktisch D Expandierte Ataxin-3 Konzentration des Konverters prä-ataktisch-mild ataktisch-prä-ataktisch E Gesamt Ataxin-3 Konzentration des Konverter moderat ataktisch-schwer ataktisch F Expandierte Ataxin-3 Konzentration des Konverter moderat ataktisch-schwer ataktisch .....	190
Abbildung 3.69 A Verteilung der Genotypen der Kontrollprobanden für SNP 1118 B Verteilung der Genotypen der Mutationsträger für SNP 1118.....	192
Abbildung 3.70 A Wildtypallel der Mutationsträger B Expandiertes Allel der Mutationsträger.....	193
Abbildung 3.71 A Verteilung der Genotypen der Kontrollprobanden für SNP 987 B Verteilung der Genotypen der Kontrollprobanden für SNP 987 .....	194
Abbildung 3.72 A Wildtypallel der Mutationsträger B Expandiertes Allel der Mutationsträger .....	195
Abbildung 3.73 A Verteilung der Genotypen für die Kontrollprobanden des SNP 669 B Verteilung der Genotypen für die Mutationsträger des SNP 669 .....	196

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien .....	43
Tabelle 2 Kits.....	44
Tabelle 3 Primer .....	44
Tabelle 4 Antikörper.....	45
Tabelle 5 Lösungen und Puffer .....	45
Tabelle 6 Geräte.....	45
Tabelle 7 Verbrauchsmaterialien .....	46
Tabelle 8 Mastermix für PCR für die Fragmentlängenanalyse des CAG Repeat .....	50
Tabelle 9 Thermocyclerprogramm für die Fragmentlängenanalyse des CAG Repeat .....	50
Tabelle 10 Mastermix für PCR für SNP 1118.....	51
Tabelle 11 Mastermix für PCR für SNP 987 .....	52
Tabelle 12 Thermocycler Programm für PCR Amplifizierung SNP 1118 .....	52
Tabelle 13 Thermocycler Programm für PCR Amplifizierung SNP 987 .....	53
Tabelle 14 Mastermix für Fragmentlängenanalyse im Beckman Gerät .....	56
Tabelle 15 Einstellungen des Frag 2 Programmes .....	57
Tabelle 16: Einstellungen des Frag 3 .....	57
Tabelle 17 Mastermix für HRM für SNP 669 .....	59
Tabelle 18 Programm Lightcycler für HRM für SNP 669.....	60
Tabelle 19 Standardreihe Bradford Assay .....	64
Tabelle 20 Einstellungen des TR-FRET Geräts:.....	68
Tabelle 21 Einstellungen der TR FRET Laser Unit .....	68
Tabelle 22 Stockangabe der Antikörper .....	69
Tabelle 23 Kohortenanalyse der mit dem TR-FRET Assay untersuchten Probanden mit Median und Interquartilenabstand. ....	74
Tabelle 24 Kohortenanalyse der mit dem Simoa Assay untersuchten Probanden der Baseline Kohorte. ....	83
Tabelle 25 Kohortenanalyse der Singulex Baseline Kohorte.....	91
Tabelle 26 Zusammenfassung der Auswertung der Baseline Kohorte .....	99

Tabelle 27 Kohortenanalyse der TR-FRET Follow Up 1 Kohorte .....	99
Tabelle 28 Kohortenanalyse der Follow Up 2 Kohorte .....	105
Tabelle 29 Kohortenanalyse der Follow Up 1 Kohorte .....	119
Tabelle 30 Kohortenanalyse der Singulex-Kohorte für Follow Up 1 .....	131
Tabelle 31 Kohortenanalyse des Follow Up 2 der Singulex Kohorte .....	136
Tabelle 32 Kohortenanalyse Singulex vs Simoa .....	153
Tabelle 33 Kohortenanalyse der Simoa vs. n-Term Kohorte.....	167
Tabelle 34 Kohortenanalyse der Kohorte Baseline Singulex vs. TR-FRET....	177

## Abkürzungsverzeichnis

A Adenin

AAO *Age at Onset*

ALS Amyothrophe Lateralsklerose

ASO Antisense Oligonukleotid

AUC *Area under the Curve*

BEST *Biomarkers, Endpoints and other Tools*

BP Basenpaar

BSA Rinderserumalbumin

C Cytosin

CSF *Cerebrospinal fluid*

D-2 D2-Cäsium

DD *Disease Duration*

DNA Desoxyribonulceic acid

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EMG Elektromyografie

ESMI *European Spinocerebellar Ataxia type 3/Machado-Joseph Disease Initiative*

FDA *U.S. Food and Drug Administration*

G Guanin

HD *Huntington Disease*  
HELA *Henrietta Lachs*  
ICARS *International Cooperative Ataxia Rating Scale*  
IGF-1 *Insulin-like growth factor 1*  
INAS Score *Inventory of Non-Ataxia Signs*  
IQA *Interquartilenabstand*  
kDa *Kilo Dalton*  
miRNA *microRNA*  
MJD *Machado-Josephs Disease*  
MRT *Magnetresonanztomographie*  
MS *Multiple Sklerose*  
NfL *Neurofilament light Chain*  
PBMC *Peripheral Blood Mononuclear Cells*  
PCR *Polymerase chain reaction*  
PET *Positron emission tomography*  
PolyQ *Polyglutamin*  
RNA *Ribonucleic acid*  
ROC *Receiver operating characteristic*  
SARA Score *Scale of the Assessment and Rating of Ataxia Score*  
SCA *Spinocerebelläre Ataxie*  
SCA3 *Spinocerebelläre Ataxie Typ 3*  
shRNA *Small hairpin RNA*  
Simoa *Single Molecule Assay*  
SNP *Single Nucleotid Polymorphism*  
T *Thymin*  
Tb *Terbiumkryptat*  
TBE *Tris-Borat-EDTA*  
TR-FRET *Time-resolved fluorescence energy transfer*  
UIM *Ubiquitin Interacting Motifs*  
UPS *ubiquitin-proteasome system*

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)

Die Machado-Josephs Krankheit (MJD), seit den 1990er Jahren auch als Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) bekannt, ist eine autosomal dominant vererbte unheilbare seltene neurodegenerative Krankheit, die letztlich zum Tod führt (Matos et al., 2019). Die Krankheit wurde erstmals auf den Azoren beschrieben, wo sie auch heute noch die höchste Inzidenz (auf Insel Flores 1:140) aufweist. Ursache der Erkrankung ist ein instabiles CAG-Repeat auf dem *ATXN3* Gen auf Chromosom 14q32.1 (Sudarsky & Coutinho, 1995). Bei der Erstbeschreibung der Genmutation wurde bei gesunden Personen ein CAG Repeat von 13-36 Wiederholungen beschrieben, bei Betroffenen eine CAG-Expansion von 68-79 Repeats (Kawaguchi et al., 1994). Paulsen et al. (Paulson) definiert als Länge für ein expandiertes CAG Repeat eine Anzahl von über 60 Repeats bis zu 87 Repeats (Paulson, 2012). Aufgrund des instabilen CAG Repeats im *ATXN3* Gen (auch *MJD1* Gen) entsteht das Polyglutamin (PolyQ)-expandierte Protein Ataxin-3, welche intrazellulären Aggregate bildet und wichtigen zellulären Prozesses wie Autophagie, Proteinbildung, Transkription, mitochondriale Funktion und Signalübertragung stört. Der genaue Mechanismus der Aggregation wurde noch nicht abschließend geklärt (Matos et al., 2019).

Klinisch zeichnet sich die Krankheit durch eine progressive Ataxie, Dysarthrie, posturale Instabilität, Nystagmus, Lidretraktion und fasziale Faszikulationen aus. Bei jüngeren Patienten ist auch eine Dystonie häufig (Sudarsky & Coutinho, 1995). Im Verlauf der Krankheit sind die Patienten meistens auf einen Rollstuhl angewiesen und später bettlägerig (Maciel et al., 1995). Das

durchschnittliche Überleben nach Diagnosestellung beträgt für SCA3 Patienten 21,18 Jahre (Kieling et al., 2007).

Es gibt eine breite Spannweite an klinischen Verläufen, selbst in einer Familie kann die Erkrankung sehr heterogen verlaufen. Das Erkrankungsalter kann von 5 bis 70 Jahren erheblich variieren und ist abhängig von der Länge des CAG Repeats. Ein stark expandiertes CAG Repeat führt zu einem früheren Erkrankungsalter und schnellerem Krankheitsverlauf. Es können klinisch 4 Subtypen an SCA3 unterschieden werden (Paulson, 2012).

Die SCA3 ist eine von 9 sogenannten PolyQ-Erkrankungen. Neurodegenerative Erkrankungen, welche sich alle durch eine pathologisch expandiertes CAG Trinukleotid in der codierenden Region eines Genes auszeichnen. Bei den anderen Krankheiten handelt es sich um Chorea Huntington, Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie, Spinal Bulbäre Muskelatrophie sowie neben SCA3, SCA 1,2,6,7 und 17 (Klockgether et al., 2019; McLoughlin et al., 2020). SCA3 ist dabei die häufigste autosomal dominant vererbte Spinocerebelläre Ataxie (Bettencourt & Lima, 2011).

## 1.2 Epidemiologie

Die SCA3 ist die häufigste dominante vererbte Ataxie weltweit (Martins et al., 2023). Die relative Häufigkeit der Erkrankung unter den SCAs ist in Portugal (49 %), China (49 %), Brasilien (44 %), den Niederlanden (44 %), Japan (43 %) und Deutschland (42 %) am höchsten (Jiang et al., 2005; Lopes-Cendes et al., 1997; Martins et al., 2007; Schols et al., 1997; Silveira et al., 2002; Takano et al., 1998; van de Warrenburg et al., 2002). Die Erkrankung wurde zum ersten Mal in den USA bei portugiesischen Einwanderern beschrieben. Alle damals beschriebenen Patienten stammten von William Machado ab, der von der Insel Sao Miguel aus den Azoren stammte (Nakano et al., 1972). Es wurde 1976 eine separate Erkrankung beschrieben, welche in der Joseph

Familie auftrat, ebenfalls eine portugiesische Einwandererfamilie (Rosenberg et al., 1976). Die Erkrankung erhielt den Namen Machado-Joseph Krankheit nach den betroffenen Familien Machado und Joseph, beide azorischer Abstammung (Lima & Coutinho, 1980; Meira et al., 2020). Gaspar (Gaspar et al., 2001) unterstützte im Rahmen einer 249 Familien umfassenden Haplotyp Studie, das Auftreten von 2 verschiedene Mutationsereignisse, durch die die SCA3 in die portugiesische Bevölkerung gelangte und nun in Populationen auf der ganzen Welt zu finden sind. Zunächst bestand hier die Theorie, dass sich die Mutation von Portugal aus auf die Azoren und dann über die portugiesischen Seefahrer im 15./16. Jahrhundert auf der ganzen Welt verbreitet haben (Gaspar et al., 2001; Sequeiros & Coutinho, 1993).

Es wurden 2 verschiedene Abstammungen der SCA3-Mutation unterschieden: Die Joseph Linie, welche in der Joseph Familie gefunden wurde. Sie ist auf der azorischen Insel Flores führend. Nach einer Gründermutation, vermutlich in Asien vor 6.000-16.000 Jahren entstanden, hat sie sich über viele Populationen weltweit verbreitet. Die Machado Linie, benannt nach der Machado Familie, die von der Insel Sao Miguel stammt, ist jüngeren Ursprungs, um die 3,211+/-693 Jahre alt und geografisch weniger verbreitet (Martins et al., 2007; Martins et al., 2012; Martins et al., 2023). Die Machado Linie trat, mit Ausnahmen wie in (Martins et al., 2023) berichtet in einem Bericht über eine sudanesische Familie, hauptsächlich in Portugal oder in Familien portugiesischer Abstammung auf (Gaspar et al., 2001; Martins et al., 2007; Martins et al., 2023). In einer Haplotyp Studie, welche an 264 Machado-Joseph Familien weltweit durchgeführt wurde, ergab sich eine besonders hohe Variabilität unter Haplotypen japanischer MJD-Familien, was einen Ursprung des Haplotypen TTACAC und damit der Joseph Linie in Asien nahelegt. Da es in der SCA3 kaum Berichte über de Novo Mutationen gibt, liegt die Vermutung nahe das nur sehr wenige Mutationsereignisse zu den Fällen geführt haben, die wir heute sehen. Die Mutation für die Joseph Linie könnte bereits im Bronzezeitalter stattgefunden haben. Für den Haplotypen GTGGCA und damit der Machado Linie liegt ein Ursprung in Portugal nahe,

wobei hier ein Ursprung auf dem Festland gegen einen Ursprung auf den Azoren abgewogen werden kann (Martins et al., 2007).

### **1.3 Symptomatik**

Das führende Symptom bei SCA3 Patienten ist die progressive Ataxie aufgrund von Neurodegeneration, vor allem in den Basalganglien, den Hirnkernen und dem Cerebellum. Im Verlauf der Erkrankung sind die Patienten meist auf einen Rollstuhl angewiesen und leiden an schwerer Dysarthrie und Dysphagie. Das Ausmaß der Neurodegeneration und der Symptomatik kann unter Individuen mit SCA3 sehr variabel sein (Paulson, 2012; Riess et al., 2008; Rub, de Vos, Brunt, et al., 2002; Rub, de Vos, Schultz, et al., 2002; Sequeiros & Coutinho, 1993). Häufig sind auch die Hirnnerven sowie das Rückenmark und besonders der Nucleus dentatus des Kleinhirns, die Substantia nigra, das Vorderhorn des Rückenmarks sowie die motorischen, vestibulären und pontinen Kerne des Hirnstamms betroffen. Der zerebelläre Cortex ist für eine SCA eher untypisch oft weniger stark betroffen, die Purkinje Zellen und die untere Olive sind ebenfalls weniger häufig betroffen (Durr et al., 1996; Paulson, 2012; Sudarsky & Coutinho, 1995; Yamada et al., 2008).

Neben der fortschreitenden Ataxie gibt es noch ein weites Spektrum an nicht ataktischen Symptomen, die auftreten können. Dazu zählen neben der Dysarthrie und Dysphagie das Auftreten von Dysmetrie, Diplopie und Augenmuskelstörungen, Nystagmus und periphere Neuropathie, Dystonie und Spastik. Pyramidale und extra-pyramidale Störungen können im Verlauf ebenfalls auftreten, sowie Faciolinguale Faszikulationen, Gewichtsverlust ohne Appetitverlust und Inkontinenz. Ein Restless Leg Syndrom betrifft ebenfalls viele SCA3 Patienten. Eine kognitive Störung der Patienten kann vorkommen, eine schwere Ausprägung wie Demenz ist jedoch nicht häufig (Bettencourt & Lima, 2011; Paulson, 2012; Riess et al., 2008; Xu et al., 2019). Neben den somatischen Symptomen treten auch Schlafstörungen und psychiatrische Störungen wie Depressionen auf (Matos et al., 2019).

Die heterogene Gruppe der SCA3 Patienten kann in 4 größere Übergruppen unterteilt werden, die sich an den führenden Symptomkomplexen orientieren. Typ I wird durch extrapyramidale Symptome mit Dystonie und pyramidalem Defizit gekennzeichnet und durch ein frühes Erkrankungsalter von 10-30 Jahren geprägt.

Typ II zeigt hauptsächlich pyramidale Symptome mit zerebellarem Defizit und einem Erkrankungsalter von 20-50 Jahren.

Typ III hat im Durchschnitt das späteste Erkrankungsalter mit 40-75 Jahren. Dieser Typ wird durch ein prägendes zerebellares Defizit und Neuropathien gekennzeichnet (Riess et al., 2008). Patienten, die an dem Subtyp 1 der SCA3 leiden, zeigen verglichen mit Typ 2 und Typ 3 der Erkrankung ein längeres CAG Repeat. Typ 1, der mit dem niedrigsten AAO und einem schwereren Krankheitsverlauf, mit einem größeren CAG Repeat assoziiert ist, unterstreicht auch den Zusammenhang zwischen einem frühen AAO und einem größeren CAG Repeat. Der Einfluss der Länge des CAG Repeats auf den AAO wird auf 50 % geschätzt (Maciel et al., 1995). Andere Studien schätzen sogar einen Einfluss des CAG Repeats auf den AAO von bis zu 70 % an (Durr et al., 1996). Ein kleineres Kollektiv an Patienten weist ein Parkinson ähnlichen Typ der Erkrankung auf (auch als Typ IV bezeichnet), der auch Dopamin sensibel ist. Bei diesen Patienten kann ein Ruhetremor auftreten, wie auch Rigidität und Bradykinese, distale Atrophie und Neuropathie mit Areflexie und Gefühlsstörungen. (Tuite et al., 1995). SCA3 als Ursache eines familiären Parkinson Syndroms wurde vor allem in Familien afrikanischer Abstammung beobachtet (Park et al., 2015).

Die meisten Patienten weisen eine Gangstörung als erstes Symptom auf. In einem Kollektiv aus chinesischen Patienten zeigten die Patienten mit einer Gangstörung als Erstsymptom einen schweren Krankheitsverlauf und eine schwerere Ausprägung der Ataxie als Patienten mit nicht Ataxie bezogenen Erstsymptomen (Xu et al., 2019). Die Studie von Xu et al. konnte keinen Einfluss zwischen der Art des Erstsymptoms und dem AAO zeigen. In einer

weiteren Studie wurde ein Kollektiv an amerikanischen Patienten untersucht, die an SCA1, SCA3 oder SCA6 erkrankt waren. Für die Gruppe der SCA3 Patienten konnte in diesem Kollektiv kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Erstsymptom und dem AAO und dem Krankheitsverlauf festgestellt werden (Luo et al., 2017).

Auch im Vergleich zu einem nach Alter und Geschlechtskriterien gematchten Kollektiv wiesen SCA3 Patienten signifikant mehr Schlafstörungen, kognitive Defizite, Depressionen, Blasenstörungen, Restless-Leg Syndrome und Pallhypästhesien auf als die gesunde Bevölkerung. Dieser Zusammenhang wird durch das Fortschreiten der Erkrankung noch verstärkt: Schlafstörungen, Depressionen und kognitive Dysfunktion verschlechtern sich mit der Progression der motorischen Symptome und auch Blasenstörungen und Pallhypästhesie ist mit fortschreitender Ataxie häufiger (Hengel et al., 2023).

Das AAO kann zwischen 5-75 Jahren liegen und korreliert signifikant mit der Expansion des CAG-Repeats, ein größeres CAG-Repeat ist invers mit einem früheren AAO korreliert (Riess et al., 2008). Patienten mit einem intermediären CAG-Repeat mit 53-54 Wiederholungen können einen intermediären Phänotyp aufweisen. Dieser intermediäre Phänotyp kann sich in einem Restless-Leg Syndrom und Muskel Faszikulationen zeigen, aber auch Polyneuropathie bedingen. Symptome bis hin zu Ataxie, extrapyramidale Symptome, Muskelatrophie und autonomen Störungen sind möglich. EMG-Untersuchungen der betroffenen Probanden zeigten Schäden an den Motoneuronen und Zeichen einer primären axonalen Polyneuropathie (Takiyama et al., 1997; van Alfen et al., 2001).

## 1.4 Genetik

Die SCA3 folgt einem autosomal dominanten Erbgang. 1994 wurde als auslösende Mutation ein expandiertes instabiles CAG Repeat auf dem *ATXN3* Gen identifiziert (Kawaguchi et al., 1994). Silveira und Kollegen hatten zuvor bei der Untersuchung von azoreanischen Familien festgestellt, dass der genetische Ursprung für die SCA3 auf einem anderen Allel als die SCA2 liegt und es sich um genetisch verschiedene Entitäten handelt (Silveira et al., 1993). Das *MJD1/ATXN3* Gen wurde auf Chromosom 14q32.1 lokalisiert. In nicht mutierten Probanden hat das CAG-Repeat eine durchschnittliche Länge von 13-63 Wiederholungen, während Mutationsträger ein expandiertes CAG-Repeat (68-79 Repeats) aufweisen (Kawaguchi et al., 1994). Es gibt also einen großen Abstand zwischen der Zahl an normalen CAG Repeats und dem expandierten CAG Repeats der SCA3 Mutationsträger. In normalen Allelen ist die CAG-Repeat-Länge so verteilt, dass es einen Häufigkeitsgipfel bei jeweils 14 Repeats und 24 Repeats gibt (Maciel et al., 1995). Das CAG Repeat liegt im 10. Exon (Paulson, 2012). Das *ATXN3* Gen umfasst in der Referenzisoform 11 Exons, mit denen es für das Protein Ataxin-3 codiert. Die Länge des *ATXN3* Gens wurde auf 48,240 bp gemessen. Die mRNA des *ATXN3* Gens liegt in der Zelle in verschiedenen Längen vor, was auf Splicing Varianten hinweist. Auch kann die mRNA des *ATXN3* Gens in einer Vielzahl menschlicher Gewebe gefunden werden (Ichikawa et al., 2001; Riess et al., 2008). Das expandierte CAG-Repeat der Mutationsträger führt zu einem funktionseingeschränkten Protein aufgrund eines expandierten Glutamin-Anteils (Kawaguchi et al., 1994). De novo Mutationen, die zu einer SCA3 führen sind sehr selten, seltener als in anderen PolyQ Erkrankungen, wie Chorea Huntington (Paulson, 2012).

In Untersuchungen der CAG-Repeat-Länge in Studien an Eltern und Kinder mit SCA3 Mutation, zeigte sich eine Instabilität des expandierten Allels, das sich von Generation zu Generation sowohl vergrößern als auch verkleinern kann. Paternal vererbte expandierte Allele zeigten sich als deutlich anfälliger

für eine Veränderung an der Länge des CAG-Repeats als maternal vererbte Allele. Die Länge des Allels hat jedoch keinen Einfluss auf die Instabilität bei der Vererbung (Maciel et al., 1995). Im Mittelwert zeigt sich eine Expansion von +0,86 CAG Repeats pro Transmission (Durr et al., 1996). Auch hier war die Expansion bei paternal vererbten CAG-Repeats größer, als bei maternal vererbten, jedoch nicht statistisch signifikant (Durr et al., 1996). Eine Studie an einer anderen PolyQ Erkrankung Chorea Huntington hat bereits an den Spermien von Männern mit HD und intermediate HD CAG Repeat eine Variabilität in der Länge und Stabilität des CAG Repeats gezeigt (Semaka et al., 2013). Dieses Phänomen, das zu einer Verlängerung des CAG-Repeats und damit auch zu einem früheren AAO und schwereren Krankheitsverlauf von einer Generation zur nächsten führt, wird als Antizipation bezeichnet und tritt auch bei anderen PolyQ-Erkrankungen auf (Durr et al., 1996).

Homozygote Patienten, welche zwei Allele mit expandiertem CAG-Repeat zeigen, weisen ein früheres AAO aus und einen statistisch signifikant schwereren Krankheitsverlauf als heterozygote Patienten sowohl im Vergleich zu anderen Erkrankten in ihren Familien, als auch im Vergleich zu nicht verwandten heterozygoten Mutationsträgern. Als verantwortlich dafür wird der *Gen Dosage* Effekt vermutet: Bei diesem wird durch eine höhere Konzentration an expandiertem Ataxin-3 und durch das komplette Fehlen an normalem Ataxin-3, die Toxizität des expandiertem Ataxin-3 erhöht, verglichen mit heterozygoten Mutationsträgern (Carvalho et al., 2008; Shang et al., 2018).

## 1.5 Ataxin-3 und Pathogenese

Das Ataxin-3 ist ein 42 kDa schweres Protein, welchem eine Funktion in dem Ubiquitin-Protease-System (Jacobi et al.) zugeordnet wird, sowie einer Funktion bei der DNA-Reparatur. Das mutierte PolyQ-expandierte Ataxin-3 sammelt sich typisch für die PolyQ-Erkrankungen intraneuronal vor allem im

Zellkern. Das mutierte Ataxin-3 stört die Zellfunktion was zu Autophagie, Proteostatis sowie Störungen der Transkription und der mitochondrialen Funktion führt. Es sammelt sich in Zellen an und bildet Aggregate. Der genaue Mechanismus der Aggregation von Ataxin-3 wurde noch nicht abschließend geklärt (Matos et al., 2019). Es gibt Hinweise darauf, dass Ataxin-3 proteolytisch abgebaut wird durch Caspasen und Calpaine. Ataxin-3 kann durch Calpaine in Fragmente geteilt werden, die dann Aggregate bilden (Haacke et al., 2007). Die „*Toxic Fragment Hypothese*“ besagt, dass besonders die Fragmente des expandierten Ataxin-3 sich aggregieren und schädlicher sind, als das vollständige expandierte Ataxin-3 Protein (Haacke et al., 2007). Die Studie (Hubener et al., 2013) zeigte den Abbau von full-length Ataxin-3 aber auch expandiertem Ataxin-3 durch calpain-1 und calpain-2. Weiter zeigte sich das bei Hemmung des Calpain-Inhibitors Calpastatin die Mäuse der Versuchsreihe neurologisch schwerer betroffen waren und auch früher verstarben im Vergleich zu den Kontroll Tieren aber auch im Vergleich zu SCA3 Mäusen mit intakter Calpastatin Funktion. Auch das spricht für eine große Bedeutung der Calpaine für die Pathogenese der SCA3 und der Ataxin-3 Aggregate (Hubener et al., 2013). Caspasen sind ebenfalls in die proteolytische Spaltung von Ataxin-3 in Fragmente involviert (Berke et al., 2004). Dieser Zusammenhang zwischen PolyQ-Erkrankungen und der Rolle von Caspasen in der Proteolyse von PolyQ-expandierten Proteinen wurde zunächst für Chorea Huntington festgestellt (Wellington et al., 2000).

Die häufigste Form des Ataxin-3 umfasst 361 Aminosäuren (Uniprot P54252). Es gliedert sich in eine am N-terminalen Ende befindliche kugelförmige Josephin Domäne und einen flexibles und variables C-terminales Ende, der das CAG-Repeat enthält (Masino et al., 2003; Riess et al., 2008).

Der Josephin Domäne wird eine entscheidende Bedeutung in der Funktion des Ataxin-3 zugeschrieben, vor allem im Bezug auf seine Rolle als Deubiquitinase im Ubiquitin-Protease-System. Sie umfasst 20 kDa und ist auch Isoform-übergreifend und Spezies-übergreifend hochkonserviert. Die Josephin Domain hat eine Cystein-Protease Funktion und gehört zur *papain*

*like cystein protease family*. Die Struktur der Josephin Domäne ist sehr stabil, mit Ausnahme einer flexiblen Haarnadel Struktur bestehend aus 2 Alpha Helices, die vermutlich Protein-Protein Interaktionen unterstützen. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der *papain like cystein protease family*, liegt die Josephin Domäne bereits in ihrer aktiven Form vor, mit einem gut exponierten aktiven Zentrum (Nicastro et al., 2005).

Es gibt zahlreiche Isoformen des Ataxin-3, mit unterschiedlichem C-terminalen Ende (Bettencourt & Lima, 2011; Riess et al., 2008). Die C-terminale Region trägt 2 *Ubiquitin Interacting Motifs (UIM)*, wobei die beiden *UIM* von einer PolyQ-Frequenz gefolgt werden, auf die ein hydrophober Schwanz C-terminal folgt. Man kann 2 hauptsächlich vertretene Splicing Varianten des Ataxin-3 unterscheiden, die 2UIM Variante und die 3UIM Variante. Die 2UIM Variante umfasst 10 Exons und die 3UIM Variante umfasst 11 Exons. Die 3 UIM-Variante trägt ein drittes UIM am C-terminalen Ende und ist 0,5 kDa schwerer (Harris et al., 2010; Ichikawa et al., 2001; Matos et al., 2019). Beide Varianten werden als *full-length* Ataxin-3 betrachtet, zeigen jedoch im Vorkommen und Verhalten gewisse Unterschiede. Das 2UIM Ataxin-3 zeigt *in vitro* eine stärkere Neigung zur Aggregation und ist weniger stabil, es kann schneller vom Proteasom abgebaut werden. Im Gegensatz zum hydrophoben Schwanz der 2UIM Variante, ist die 3 UIM Ataxin-3 Isoform am 3'Ende hydrophil, durch das zusätzliche dritte UIM (Goto et al., 1997). Die 3UIM Ataxin-3 Form, die nach der Identifikation der 2 UIM Form aus menschlichem Hirn isoliert wurden (Goto et al., 1997), wird nun als die häufigste Form im menschlichen Gehirn betrachtet, während 2UIM im ZNS nur in geringer Konzentration vorkommt (Harris et al., 2010). Ataxin-3 liegt im Cerebellum wesentlich höher konzentriert vor als im Blut, die 3UIM Ataxin-3 Isoform ist im Blut der Probanden die häufigste Isoform. Es können 54 Splicing Varianten des Ataxin-3 differenziert werden, von diesen 54 Varianten gibt es auch Isoformen die exklusiv in Blut oder Cerebellum gefunden werden konnten (Raposo et al., 2024). Die 2UIM Isoform wird in Zellkultur in HELA-Zellen und HEK293T Zellen schneller vom Proteasom abgebaut und liegt in

geringeren Konzentrationen vor als die 3UIM Isoform (Johnson et al., 2019; Weishaupl et al., 2019).

Die 3UIM Isoform wird auch als Ataxin-3c bezeichnet und die 2 UIM-Isoform als Ataxin-3a. Die Ataxin-3a Isoform kann noch in 2 Isoformen aufgeteilt werden, Ataxin-3aL und Ataxin-3aS, die durch eine SNP-Mutation entsteht. Ein SNP mit Stopp Codon führt bei der Ataxin-3aS Variante zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription und damit einem kürzeren Ataxin-3aS. Das „S“ im Namen der Isoform steht für *short* (Weishaupl et al., 2019). Besonders das Vorkommen der Ataxin-3aS Variante ist mit Mutationsträgern der SCA3 assoziiert (Maciel et al., 1999; Weishaupl et al., 2019).

Aufgrund der ATXN3-Mutation entsteht zelluläre Dysfunktion und letztendlich Zelltod. Verschiedene Hypothesen wurden formuliert, um den möglichen toxischen Mechanismus zu erklären, der durch das fehlgefaltete mutierte ATXN3 und seine veränderten Proteininteraktionen ausgelöst wird. Diese beinhalten die Bildung von Aggregaten, die Störung der zellulären Proteinhomeostase, Beeinträchtigung des axonalen Transports, Transkriptionsdysregulation, mitochondriale Dysfunktion und oxidativen Stress sowie abnorme neuronale Signalübertragung (Costa Mdo & Paulson, 2012). Die toxische Wirkung des PolyQ expandierten Ataxin-3 lässt sich dabei vor allem auf 3 Mechanismus zurückführen, die veränderte Protein Homeostase, Schaden an der DNA und Fehlfunktion der DNA-Reparatur sowie nicht neuronale Krankheitsfolgen (McLoughlin et al., 2020).

Eine sehr wichtige Funktion des Ataxin-3 ist seine Rolle im UPS-System, wo es vor allem im *Protein Quality Control Pathway* eine wichtige Funktion hat (Costa Mdo & Paulson, 2012; McLoughlin et al., 2020). Der *Protein Quality Control Pathway* zusammengesetzt aus UPS, molekularen Chaperonen und Autophagie, ist in SCA3 und anderen PolyQ-Krankheiten beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung könnte sowohl durch die Menge an aggregiertem fehlgefaltetem expandiertem Protein erklärt werden, die das UPS-System

überfordern, als auch die toxische Wirkung des expandierten Ataxin-3 auf Bestandteile dieses System (McLoughlin et al., 2020). Ataxin-3 als Deubiquitinprotease spaltet bevorzugt Ubiquitin Ketten, welche länger als 4 Ubiquitine ist. Für diese Funktion sind die Josephin Domäne aber auch die 2 bzw. 3 UIMs zuständig. Die Tatsache das Ataxin-3 besonders längere Ubiquitin-Ketten schneidet, die 4 oder mehr Ubiquitine enthalten, spricht dafür, dass seine Funktion vor allem der Zerstückelung von Proteinen dient, welche danach durch das Proteosom abgebaut werden sollen (McLoughlin et al., 2020; Thrower et al., 2000). Untersuchungen haben gezeigt, dass ATXN3 eine Interaktion mit mehr als 100 Proteinen eingeht, wobei viele davon unmittelbar mit der Ubiquitin- abhängigen Protein-Qualitätskontrolle verknüpft sind (Paulson et al., 2017). ATXN3 Knock-Out Mäuse sind klinisch unauffällig. In den Gehirnen der Knock-Out Mäuse sind erhöhte Level an Polyubiquitin messbar, dies bestätigt die Deubiquitinase Funktion des normalen Ataxin-3. Die fehlende neurologische Symptomatik der Mäuse spricht aber auch für eine Toxizität des mutierten Ataxin-3, welche über ein bloßes Fehlen an physiologischem Ataxin-3 hinausgeht (Paulson et al., 2017; Schmitt et al., 2007). Studien zeigen, dass die Bildung von Aggregaten, durch Proteasom-Beeinträchtigung und zelluläre Stressreaktionen verursacht werden (Seidel et al., 2016).

Das physiologische Ataxin-3 trägt zur DNA-Reparatur bei, indem es Proteine der DNA-Reparatur moduliert. Eine Rolle spielt dabei das Chk1 Protein, dass als Kinase der DNA-Reparatur bei DNA-Schaden dient indem es entweder den Zellzyklus verlangsamt um die Möglichkeit zur Reparatur zu schaffen oder bei zu starkem Schaden die Apoptose unterstützt (Tu et al., 2017; Zhang & Hunter, 2014). Ataxin-3 interagiert mit Chk1 indem Ataxin-3 dessen Polyubiquitinierung und damit vorzeitigen Abbau verhindert. Ataxin-3 erhöht so das zur Verfügung stehende Chk1 und unterstützt damit die DNA-Reparatur (Tu et al., 2017). Ataxin-3 verhindert den vorzeitigen Abbau von weiteren DNA Reparatur Proteinen und fördert so eine DNA-Reparatur (Pfeiffer et al., 2021; Pfeiffer et al., 2017). Neben der Toxizität von Proteinen spielt auch die RNA-Toxizität eine Rolle bei den Krankheitsmechanismen von

PolyQ-Erkrankungen. Die RNA-Toxizität könnte durch eine Beeinflussung des Splicings und der Transkription zustande kommen, aber auch durch eine direkte toxische Wirkung der RNA und Störung des RNA-Interferenz pathway (Evers et al., 2013; Nalavade et al., 2013).

Die mutierte Form von Ataxin-3 aggregiert bei SCA3 sowohl in Form von großen intranukleären Einschlüssen in Neuronen als auch als kleinere zytoplasmatische und axonale Pünktchen (Paulson et al., 2017). Mutiertes Ataxin-3 kann sich aber auch als große kugelförmige Struktur im Zytoplasma ablagern, während physiologisches Ataxin-3 diffus im Zytoplasma verteilt ist (Paulson et al., 1997). Neuronale intranukleären Einschlüsse variieren in der Größe und können eine Größe von einem bis mehrere Mikrometer annehmen. Sie enthalten neben Ataxin-3, das Protein Ubiquitin und auch weitere Proteine wie proteasomen Untereinheiten (Paulson, 2012; Paulson et al., 1997).

Proteotoxischer und oxidativer Stress führen dazu, dass physiologisches und mutiertes Ataxin-3 vermehrt in den Nucleus transportiert wird, während physiologisches Ataxin-3 sich in den meisten menschlichen Zelllinien mehrheitlich im Zytoplasma nachweisen lässt. Der Transport in den Nucleus wird sowohl von der Josephin Domäne als auch vom C-Terminale Ende vermittelt (Reina et al., 2010).

In der SCA3 und in Chorea Huntington konnte gezeigt werden, dass nicht alle Zellen gleich stark auf die intranukleären Protein-Aggregation reagieren. Die Einschlusspathologie korreliert nicht direkt mit der Schwere der Degeneration in verschiedenen Bereichen, was darauf hindeutet, dass verschiedene Neuronen Subtypen unterschiedlich auf die PolyQ-Aggregation reagieren können (Seidel et al., 2016).

## 1.6 Therapie

Die SCA3 ist bisher unheilbar und verläuft für die Patienten letal. Es werden verschiedene Therapie-Optionen in der Forschung verfolgt. Es gibt Studien zur Anwendung von microRNAs, dabei sollen künstliche microRNAs verwendet werden um am *ATXN3* Gen anzusetzen und die Produktion des PolyQ-expandierten Ataxin-3 zu hemmen. Da die Ursache für die SCA3 monogenetisch ist, soll durch diesen Ansatz am *ATXN3* Gen die Toxizität des mutierten Proteins gemindert werden. Das *Silencing* kann dabei Allel spezifisch sein, nur das mutierte Ataxin-3 betreffen oder auch nicht Allel spezifisch sein und beide Allele betreffen (Martier et al., 2019).

Ein weiterer Ansatz verwendet shRNA um in die *RNA Interference* einzugreifen. Die shRNA greift an einem bestimmten SNP an, das am 3'Ende des CAG-Repeats des Ataxin-3 liegt und 70% aller SCA3 Mutationsträger tragen. Dadurch lässt sich spezifisch das PolyQ-expandierte Allel behandeln. Im Rattenmodell konnte hierfür eine gezielte Runter-Regulierung an expandiertem Ataxin-3 gezeigt werden, ohne gleichzeitig das physiologische Ataxin-3 vollständig einzubüßen (Alves et al., 2008).

*Antisense Oligonukleotid* (ASO) sind eine vielversprechende Therapiemöglichkeit für neurologische, onkologische, kardiale und Stoffwechsel-Erkrankungen. Die Funktionsweise beruht darauf, dass die angepasste ASO an die komplementäre RNA bindet. Die gebundene RNA wird dann durch RNase abgebaut oder es kann ein *Exon Skipping* verursacht werden (Cerritelli & Crouch, 2009; McLoughlin et al., 2018). Sie wurden als vielversprechende Option der Gen-Therapie in SCA3 mutierten Mäusen untersucht. Es ergaben sich verbesserte motorische Fähigkeiten und verringerte Level an mutiertem Ataxin-3 und eine verringerte Aggregation bis zu 14 Wochen nach der Injektion. Eine Schwierigkeit war hierbei, dass die ASO intracerebroventrikulär verabreicht werden muss (McLoughlin et al., 2018), mittlerweile kann die Applikation auch über den Rückenmarkskanal durchgeführt werden. 2023 wurden 2 Studien zur ASO-Therapie bei SCA3 zur Phase 1 angemeldet ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), 2024); NCT05160558,

NCT05822908). Die Studie NCT05160558 wurde 2023 vorzeitig abgebrochen. Die Studie mit der ID NCT05822908 läuft derzeit noch (Stand 16.03.2024) und testet die ASO V0659 an 65 SC1, SCA3 und Chorea Huntington Patienten. Die ASO V0659 wird dabei mehrfach intrathekal in den Rückenmarkskanal der Probanden injiziert. Diese Studie wird voraussichtlich bis zum 15.09.2025 laufen. Für die SMA-Erkrankung wurde bereits eine erfolgreiche ASO-Therapie am Menschen etabliert (Finkel et al., 2016). Weitere Ansätze setzen sich mit der Verhinderung der Aggregationsbildung auseinander (Matos et al., 2019).

Es wird außerdem vermutet, dass Antioxidantien einen neuroprotektiven Effekt in der SCA3 haben (Evers et al., 2013). Es gibt Hinweise in Studien an Mäusen, dass eine Diät mit einem Q10 Zusatz die motorische Fähigkeit verbessert und vorbeugend gegen Muskelschwund wirkt (Wu et al., 2022). In einer Zellstudie zeigte sich eine verbesserte Viabilität von Zellen unter Q10, aber auch Lithium Behandlung (Lopes-Ramos et al., 2016).

Für eine Behandlung mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 im Mausmodell, ergab sich ein verbesserter Erhalt von motorischen Fähigkeiten im Krankheitsverlauf, ein vermindertes Auftreten von intrazellulären Aggregaten an mutiertem Ataxin-3 und eine verbesserte mitochondriale Funktion im Cerebellum. Bei einer Behandlung mit IGF-1 ist jedoch auch immer ein erhöhtes Krebsrisiko zu bedenken (Lin et al., 2022). Neben Physiotherapie (Ilg et al., 2010), ist auch Logopädie etwas, was sich positiv auf die Lebensqualität der Betroffenen auswirkt (Diaferia et al., 2022). Die Parkinson Symptomatik der Patienten mit Subtyp 4 spricht gut auf L-Dopa an (Tuite et al., 1995).

Die Behandlung von Ataxie Patienten mit Rilozol zeigte eine klinische Verbesserung der Symptome nach einer Therapiedauer von jeweils 8 Wochen bzw. 12 Monaten, als Maßgabe dafür wurde eine Verbesserung des ICARS bzw. SARA Score verwendet (Ristori et al., 2010; Romano et al., 2015; Saute & Jardim, 2016). In einem Mausmodell konnte zwar eine Verringerung

der Aaxin-3 Level in mit Rilozol behandelten SCA3 Mäusen festgestellt werden, jedoch keine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten der Mäuse (J. Schmidt et al., 2016).

## 1.7 Biomarker in der SCA3

Unter dem Begriff Biomarker versteht man im Allgemeinen objektive Hinweise auf den Gesundheitszustand eines Patienten, die präzise und reproduzierbar gemessen werden können. Im Jahr 1998 definierte die *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group* einen Biomarker als "ein Merkmal, das objektiv gemessen und als Indikator für normale biologische Prozesse bewertet wird, pathogener Prozesse oder pharmakologischer Reaktionen auf eine therapeutische Intervention"(Strimbu & Tavel, 2010). 2001 definierte die Biomarkers Definitions Working Group Biomarker als Parameter, die objektiv gemessen und als Indikator für biologische und pathogene Prozesse oder pharmakologische Reaktionen auf therapeutische Interventionen evaluiert werden.

Der BEST-Katalog der FDA definiert 7 verschiedene Kategorien an Biomarkern. Darunter den *Diagnostic* Biomarker, den Monitoring Biomarker, den Response Biomarker, den *Predictive* Biomarker, den *Prognostic* Biomarker, den *Safety* Biomarker, den *Susceptibility/Risk* Biomarker (FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338449/> Co-published by National Institutes of Health (US), 2024). Silver Spring (Costa Mdo & Paulson): Food and Drug Administration (US); 2016-. FDA-NIH Biomarker Working Group. 2016 Jan 28 [Updated 2021 Jan 25] (Costa Mdo & Paulson) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338449/> Co-published by National Institutes of Health (US), 2024).

Das *National Cancer Institute* definiert Biomarker als „Ein biologisches Molekül, das im Blut, in anderen Körperflüssigkeiten oder im Gewebe vorkommt und ein Anzeichen für einen normalen oder abnormalen Prozess

oder für einen Zustand oder eine Krankheit ist. Ein Biomarker kann verwendet werden, um festzustellen, wie gut der Körper auf eine Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands anspricht. Wird auch als molekularer Marker und Signaturmolekül bezeichnet.“

([www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker](http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker), 2024).

Biomarker sind objektiv erhebbare Merkmale eines biologischen Prozesses, diese können müssen aber nicht mit dem klinischen Zustand eines Patienten direkt zusammenhängen. Im Gegensatz dazu sind klinische Endpunkte einer Studie auch Angaben über die Gesundheit der Studienprobanden aus Sicht dieser Probanden. Biomarker können als *Surrogate Endpoints* in klinischen Studien verwendet werden, als Ersatz von klinischen Endpunkten (Strimbu & Tavel, 2010). Das Paper Weir et al. beschreibt zwei unterschiedliche Kategorien an Biomarkern (Weir et al., 2011). Die *Trait* Biomarker, bei denen es um das Vorhanden sein einer Erkrankung geht und die *State* Biomarker, bei denen es um die Schwere und Ausprägung einer Erkrankung geht. Die Zielsetzung eines State Biomarker sollte eine gute Quantifizierbarkeit und Reproduzierbarkeit sein, von Komorbiditäten unabhängig zu sein und keiner großen Variation in der allgemeinen Bevölkerung unterliegen. Entscheidend für die Anwendung des Biomarkers in klinischen Studien ist, dass er sehr gut linear mit dem Krankheitsverlauf korrelieren und mit den bereits etablierten klinisch-pathologischen Parametern der Erkrankung korreliert. (Henley et al., 2005; Weir et al., 2011). Biomarker bei neurodegenerativen Erkrankungen haben das Potential eine frühere Diagnose zu ermöglichen, den Krankheitsverlauf zu überwachen und den Erfolg einer Therapie zu dokumentieren und zu beurteilen (Henley et al., 2005). Ohne gut messbare und objektive Parameter für klinische Therapiestudien, die als Endpunkte verwendet werden können, sind für diese lange Laufzeiten und große Probandenzahlen nötig um eine ausreichend signifikante Testpower zu erreichen (Weir et al., 2011). Besondere für eine so seltene Krankheit wie die SCA3 kann die Einbindung einer großen Anzahl an Probanden problematisch sein, da zum einen genügend Probanden erstmal rekrutiert werden müssen,

zum anderen diese Probanden im Verlauf der Studie nicht parallel für weitere Studien zur Verfügung stehen (Lima & Raposo, 2018; Saute & Jardim, 2018). Bildgebung des Zentralen Nervensystems kann für Diagnose und Verlaufsdokumentation zahlreicher neurodegenerativer Krankheiten verwendet werden. Die zahlreichen Modalitäten der Bildgebung, die zur Verfügung stehen, können auch dazu verwendet werden Auffälligkeiten in den Gehirnen prä-symptomatischer Mutationsträger zu erkennen und um den optimalen Therapie Zeitpunkt für eine neuroprotektive Therapie festzulegen (Henley et al., 2005). Mittels MRT und PET-Diagnostik konnten in symptomatischen wie asymptomatischen SCA3 Patienten Auffälligkeiten festgestellt werden (Riess et al., 2008; Wan et al., 2020). In MRT Untersuchungen zeigten sich in einem Kollektiv an SCA3 Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine Atrophie des Cerebellums, der Pons, sowie der Medulla oblongata und des Rückenmarks, außerdem eine Vergrößerung des vierten Ventrikels (Burk et al., 1996). Durch eine Untersuchung mit *iDiffusion Tension Imaging* kann zwischen prä-symptomatischen Mutationsträgern und Kontrollen unterscheiden werden (de Oliveira et al., 2023). In einer MRT-Studie ließ sich die Länge des CAG-Repeats der Patienten mit dem Ausmaß an Atrophie in Hirnstamm, Pons, Nucleus Caudatus und Putamen korrelieren (Schulz et al., 2010). Während ein Volumenverlust in alle subkortikalen Regionen in SCA3 Patienten im Vergleich zu Gesunden in der Studie von Schulz et al., (Schulz et al.) gezeigt wurden, waren verglichen mit SCA1 und SCA6 Patienten bei SCA3 Patienten eine weniger starke Atrophie des Cerebellums zu beobachten (Schulz et al., 2010).

Der SARA Score ist bisher das meist verwendete Tool um Effekte von Therapien auf die Ataxie zu messen in Studien zur SCA3 (Saute & Jardim, 2018). Der SARA Score wurde in einer Studie mit jeweils 167 bzw. 119 Probanden mit spinozerebellärer Ataxie getestet und validiert. Anhand von 8 Kategorien soll die Ausprägung einer Spinocerebellären Ataxie beurteilt werden, diese umfassen Gang, Stand, Sitzen, Sprache, Finger-Folge Test,

Finger-Nase Test, Tests für Diadochokinese und Fuß-Schienbein Test. Der SARA Score eignet sich nicht zur Erfassung von nicht-ataktischen Symptomen einer Erkrankung (Schmitz-Hubsch et al., 2006). Der SARA Score lässt sich nicht nur zur Beurteilung einer autosomal dominant vererbten Spinocerebelläre Ataxie wie der SCA3 verwenden, sondern auch in einer heterogenen Gruppe von Erkrankungen, die zu einer Ataxie führen (Weyer et al., 2007). Der SARA Score ist mit Modifikationen sogar im Kinder- und Jugendalter anwendbar (Schouwstra et al., 2022). Zur Bewertung von nicht ataktischen neurologischen Symptomen kann der INAS Score verwendet werden (Saute & Jardim, 2018). Da die SCA3 klinisch nur langsam progredient ist, werden lange Laufzeiten von Studien und große Probandenkollektive nötig um einen Effekt einer Therapie zu zeigen. Deswegen können hier alternativ *Surrogate Marker* als Endpunkte einer Studie verwendet werden. *Surrogate Marker* sind Biomarker, die erwiesenermaßen als Ersatz für einen klinischen Endpunkt verwendet werden können und den Effekt einer Therapie zeigen können. Für die SCA3 könnte ein sensitiver Biomarker sehr wichtig sein, um Therapie Studien abzukürzen (Katz, 2004; Saute & Jardim, 2018; Temple, 1999).

Eine erhöhte Konzentration an *Neurofilament light Chain* (NfL) in Liquor und Blut ist ein Zeichen für einen neuroaxonalen Schaden. NfL kann in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie MS, ALS, Demenz und Parkinson, aber auch nach einem Schädel-Hirn Trauma, als Marker für Neurodegeneration und Axonschaden verwendet werden. Da NfL dabei hochspezifisch für Neuronenschaden ist, kann es zur Überwachung des Krankheitsverlaufs aber auch einer Therapie verwendet werden (Khalil et al., 2018). NfL kommt ausschließlich im Plasma von Neuronen vor und ist als Untereinheit der Neurofilamente zu betrachten. Neurofilamente dienen der Stabilisierung von Neuronen und ermöglichen das radiäre Wachstum von Axonen, deswegen ist NfL besonders konzentriert in größeren myelinisierten Axonen (Gaetani et al., 2019). Da NfL aber auch mit zunehmendem Alter exponentiell vermehrt freigesetzt wird, wurde bereits an einer Übersicht über

altersangepasste NfL-Werte gearbeitet. Zwischen den Geschlechtern und zwischen verschiedenen Ethnien konnte jedoch keine signifikante Differenz in den NfL Werten festgestellt werden, sodass hier keine Anpassung der Werte benötigt wird (Harp et al., 2022). Für eine andere PolyQ Erkrankung Chorea Huntington wurde NfL bereits als vielversprechender Biomarker für Krankheitsbeginn und Verlauf beschrieben (Byrne et al., 2017; Khalil et al., 2018). Plasma NfL war in Mutationsträgern der SCA3 signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrollen (Garcia-Moreno et al., 2022).

Auch das Erkrankungsprotein Ataxin-3 selbst wurde als potentieller Biomarker untersucht und ist ein vielversprechender Kandidat als Biomarker für Therapiestudien (Gonsior et al., 2021; Hubener-Schmid et al., 2021; Nguyen et al., 2013). Ataxin-3 wäre in der FDA-Klassifikation als *pharmacodynamics/response* Biomarker anzusehen und viele Therapieansätze zielen auf Erniedrigung des Ataxin-3 ab (Gonsior et al., 2021).

Nguyen et al. nutzte und etablierte die *Time resolved Fluorescence resonance energy transfer* (TR-FRET) Technik um die Level an lösbarem expandiertem ataxin-3 in den besonders betroffenen Hirnregionen von SCA3 Mäusen zu bestimmen (Nguyen et al., 2013). Die Studie beruhte auf der Untersuchung von Ganz Hirn Homogenate und Lysaten des Cerebellums auf lösliches expandiertes Ataxin-3 bei 12 Monate alten und 22 Monate alten SCA3 Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Diese Untersuchungen ergaben ein gleichbleiben der Level an löslichem Ataxin-3 in den Ganz Hirn Homogenate im Krankheitsverlauf, aber einen Rückgang der löslichen Ataxin-3 Level im Cerebellum. Dies ging im Cerebellum mit einer erhöhten Anzahl und Größe von Ataxin-3 Aggregaten in der Messung nach 22 Monaten einher. Wichtig ist zu bedenken, dass das Cerebellum pathologisch einer der Hauptschauplätze der SCA3 ist.

Um wirklich als Endpunkt einer Studie herangezogen zu werden muss die Korrelation zur Klinik der Patienten zuverlässig sein, aber für die Anwendung im klinischen Kontext am Menschen ist es auch sehr wichtig Ataxin-3 in einer relativ einfach zur Verfügung stehenden Körperflüssigkeit bzw. Biomaterial

messen zu können, welche eventuell auch mehrfach entnommen werden kann um eine Progression der Krankheit nachvollziehen zu können. Eine weitere Studie konnte mit Hilfe eines SMC Immunoassay expandiertes Ataxin-3 in Plasma und CSF von Mutationsträgern messen (Hubener-Schmid et al., 2021). Das expandierte Ataxin-3 war im Plasma signifikant höher als das Signal in den prä-ataktischen Mutationsträgern, und korrelierte positiv mit dem klinischen Krankheitsstadium der Patienten gemessen am SARA Score. Für CSF lies sich keine Differenzierung in den bereits ataktischen und prä-ataktischen Probanden vornehmen und auch der SARA Score der ataktischen Probanden zeigte keine Korrelation mit den Ataxin-3 Werten im CSF. Generell ist noch anzumerken, dass Ataxin-3 im Plasma im Vergleich zum CSF bis zu 10-mal häufiger vorkommt. Der Assay konnte auch sehr gut in Plasma und CSF zwischen Mutationsträgern und Kontrollen differenzieren. Im Beobachtungszeitraum von einem Jahr zeigten sich bei den Probanden die Ataxin-3 Level sehr stabil (Hubener-Schmid et al., 2021).

Die Studie von Gonsior et al. misst das *full-length* Ataxin-3 sowie das expandierte Ataxin-3 in PBMC-Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) mit einer TR-FRET Technologie (Gonsior et al., 2021). Unter *full-length* Ataxin-3 versteht man sowohl das normale als auch das expandierte Ataxin-3 in Summe. Mit der TR-FRET Messung in den PBMC-Zellen für expandiertes Ataxin-3 war eine sehr gute Diskriminierung zwischen den prä-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern sowie eine positive Korrelation zu den mit dem SARA Score beurteilten klinischen Zustand der Patienten möglich.

Die Messung des *full-length* Ataxin-3 zeigte keine lineare Korrelation zum klinischen Zustand der Patienten. Auffallend war, dass prä-ataktische und mild betroffene ataktische Mutationsträger niedrigere *full-length* Ataxin-3 Werte hatten, als Kontrollen. Besonders niedrige Werte an *full-length* Ataxin-3 waren mit einem schnelleren Fortschreiten der Ataxie-Erkrankung in Patienten korreliert. Die beschriebene Technik zeigte in Plasma und CSF keine Sensitivität für Ataxin-3 (Gonsior et al., 2021). In dieser Studie zeigte

sich auch die Bedeutung eines hoch standardisierten Ablaufs und standardisierter Materialien für die Genauigkeit der Untersuchungen.

## 1.8 Messtechniken des Ataxin-3

Um Ataxin-3 als Biomarker für bevorstehende Therapiestudien zu verwenden ist es besonders wichtig diese zuverlässig und genau messen zu können. Dafür werden hochsensitive Messverfahren benötigt, welche zuverlässig und auch spezifisch das gesuchte Ataxin-3 messen können. An dieser Stelle möchte ich auf die für diese Arbeit relevanten hochsensitiven Messtechniken für Ataxin-3 eingehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hochsensitive TR-FRET Messung des *full-length* Ataxin-3, ein ultrasensitiver Simoa Assay für das expandierte Ataxin-3 und ein ultrasensitiver Singulex Assay für das expandierte Ataxin-3 durchgeführt.

Die TR-FRET Messung des *full-length* Ataxin-3 basiert auf der Technik des in (Gonsior et al., 2021) etablierten TR-FRET. Es handelt es sich um einen sogenannten *Time-resolved fluorescence energy transfer Immunoassay (TR-FRET)*, die bereits von (Nguyen et al., 2013) zur Quantifizierung von expandiertem Ataxin-3 angewendet wurde. Bei (Nguyen et al., 2013) wurde die 1H9 (Millipore, MAB5360) und MW1 Antikörper Kombination benutzt. Der Antikörper 1H9 bindet dabei an Epitope E214-L233. Die Bindung Stelle für 1H9 liegt 63 Aminosäuren vor dem CAG Repeat. Der MW1 Antikörper wurde für die Huntington Forschung entwickelt und bindet gezielt an den expandierten CAG Repeat, wobei MW1 besonders gut an längere CAG-Repeat Repeats bindet (Ko et al., 2001).

Im TR-FRET binden 2 Ataxin-3 spezifische Antikörper, welche einen Fluorophor tragen, an das zu detektierende Ataxin-3 Protein. Durch die räumliche Bindung beider Antikörper wird Energie vom Donor Molekül auf das Akzeptor Molekül übertragen. Der Donor ist dabei mit Terbiumkryptat (Tb) markiert, der Akzeptor mit D2-Cäsium (D2). Die Energieübertragung erfolgt

bei einem Abstand der beiden Moleküle von 5-9 nm. Zunächst wird ein 1 ms Puls des Lasers abgegeben. Die Hintergrundfluoreszenz des Mediums und des Akzeptors klingt nach kurzer Zeit ab, um sie nicht fälschlicherweise zu messen beginnt die Messung erst 100  $\mu$ s nach dem Puls. Die Hintergrundfluoreszenz des Donors klingt erst nach mehreren 100  $\mu$ s ab. Findet ein Energie Transfer zwischen Akzeptor und Donor statt, hält das Signal des Akzeptors auch mehrere 100  $\mu$ s an. Das Signal des Donor Molekül liegt bei einer Intensität 615 nm und das Signal des Akzeptor Molekül bei 655 nm (Cui et al., 2014). Die vom Akzeptor Molekül freigesetzte Energie kann durch Laser gemessen werden und die Menge des Proteins berechnet werden. Die Maßeinheit für die Proteinkonzentration ist beim TR-FRET  $\Delta F$  (Cui et al., 2014; Gonsior et al., 2021). Die Berechnung erfolgt mit folgender Formel (Abbildung 1.1)

$$\Delta F = \frac{\text{Ratio} \frac{665}{620} - \text{Ratio} \frac{665}{620} (\text{Hintergrund})}{\text{Ratio} \frac{665}{620} (\text{Hintergrund})} \times 100$$

**Abbildung 1.1 Formel zur Berechnung von  $\Delta F$  (Abbildung nach Promotion Patrick Pelz 2022 Tübingen):** Die Abbildung zeigt die Formel zur Berechnung von  $\Delta F$  (Proteinkonzentration) aus den Daten für das Verhältnis der Lasermessung bei 665 nm und 620 nm.

Mit einem TR-FRET Immunoassay, wo beide Antikörper im *full-length* Ataxin-3 Protein binden, kann das gesamte physiologische Ataxin-3 und das mutierte PolyQ-expandierte Ataxin-3 in PBMC (*Pheripheral Blood Mononuclear Cell*) sowie Fibroblasten, iPSCs (*induced pluripotent stem cell*) und post-mortem entnommenen zerebellarem Gewebe bestimmt werden. Ebenfalls wurde in dieser Studie ein TR-FRET Immunoassay spezifisch für PolyQ-expandiertes Ataxin-3 generiert und validiert. Dabei bindet einer der fluoreszenz-markierten Antikörper spezifisch auf der in Mutationsträgern verlängerten PolyQ-Region und bestimmt damit zuverlässig die Menge an PolyQ-expandiertem Protein (Gonsior et al., 2021). Dieser Immunoassay wurde angelehnt an einen ähnlichen bereits publizierten Immunoassay,

welcher für das Huntingtin Protein bei Chorea Huntington entwickelt wurde (Daldin et al., 2017). Leider können die Ataxin-3 spezifischen Immunoassay aufgrund einer geringen Sensitivität nicht in Serum, Plasma oder Liquor angewendet werden. Es misst zuverlässig Ataxin-3 Menge im Bereich von 0.001 bis 0.025 µg/µl (Gonsior et al., 2021). Für die Messung des *full-length* ataxin-3 wurden Antikörper 1H9 (Millipore, MAB5360) and ataxin-3 N-term (Abcam, ab96316) verwendet. 1H9 wurde mit D2 gelabelt und n-Term mit Tb. Für die Messung des expandierten Ataxin-3 wurde ebenfalls der Antikörper 1H9 verwendet sowie der Antikörper MW1 (*Study Hybridoma bank*). MW1 wurde dabei mit D2 gelabelt und 1H9 mit Tb (Gonsior et al., 2021).

Die SMCPro oder Singulex (*Singulex Molecule Counting Immunoassay*) Methode ist eine hochsensitive Methode, die ebenfalls auf der Bindung von 2 fluoreszierenden Antikörpers beruht, sie verwendet jedoch zusätzlich magnetische Partikel und separate Inkubationszeiten für beide Antikörper. Die SMC-Technologie ist eine Weiterentwicklung des klassischen ELISA Assay mit zusätzlichem Elution Schritt, magnetischen Partikeln und *target capture* Antikörpern, mehreren Waschschritten und Übertragung auf eine neue Platte vor der Messung vor der Auswertung durch das SMCxPro™Gerät. Die Technik ermöglicht eine Messung von Proteinen in einem breiten Feld aus sehr niedrigen Konzentrationen und sehr hohen Konzentrationen (Hwang et al., 2019). Mit der SMC-Technologie wurde bereits für die Bestimmung von mutiertem Huntingtin im CSF von Chorea Huntington Patienten mit der Antikörper Kombination MW1 und 2B7 entwickelt (Wild et al., 2015). Die verwendete Singulex Plattform entspricht dem Versuch in (Hubener-Schmid et al., 2021). Auch in dieser Methode werden die bereits oben erwähnten Antikörper 1H9 und MW1 verwendet. Dieser Assay ist für die Singulex Messung in Plasma und CSF etabliert, wurde aber in der vorliegenden Arbeit nur für Plasma Messungen verwendet. Diese Analysen wurden für diese Arbeit durch die Firma Evotec (Hamburg) durchgeführt.

Der *Single Molecule Assay* (Simoa) ist eine weitere hochsensitive Methode um Proteine auch in sehr geringen Konzentrationen zu quantifizieren. Für die Messung der Proteine werden paramagnetische Partikel und spezifische Antikörper verwendet, wobei der technische Vorteil vor allem darin besteht, dass die Moleküle und ihr einzeln digital gezählt werden. Dafür werden mit Antikörper beschichtete *Beats* in so hoher Konzentration zu den Proben gegeben, sodass nur 1 Molekül an eines *der Beats* bindet. Nach Zugabe eines weiteren Antikörpers wird ein Immunkomplex gebildet, dessen Fluorescence dann als Signal ausgewertet wird (Cohen et al., 2019). Die Simoa Technik wurde von (Wilke et al., 2020) verwendet um NfL in SCA3 Patienten zu messen. Auch (Li et al., 2019) verwendeten einen Simoa Assay zur Messung von NfL in Serum und CSF. Weitere Anwendungsgebiete dieser Technik ist auch das Messen von NfL in Alzheimer Patienten (Sahrai et al., 2023). Diese Analysen wurden für diese Arbeit durch das NMI Reutlingen durchgeführt und analysierten das expandierte Ataxin-3 in Plasmaproben mit der Antikörper Kombination 1H9 und MW1. Der Singulex und der Simoa Assay für Ataxin-3 sind ultrasensitive Methoden, welche auch in CSF, Plasma und Serum Ataxin-3 messen können (Gonsior et al., 2021).

## 1.9 SNP im ATXN3 Gen

Es gibt im menschlichen Genom zahlreiche *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), bei der nur eine einzelne Base vertauscht wurde. Dies hat in den meisten Fällen keinen Krankheitswert. Im *ATXN3* Gen sind bereits zahlreiche SNP bekannt. Für das *ATXN3* Gen spielen im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich 3 SNP eine Rolle: das SNP 1118, SNP 987 sowie SNP 669.

Das *ATXN3* BP 1118 liegt auf Chromosom 14 auf Exon 10 des *ATXN3* Gens (ch14:92070879) (dBSNP rs7158733). Es liegt ca. 132 Basenpaare hinter dem CAG Repeat. Aus dem Tausch TAC>TAA entsteht aus einem Tyrosin Codon an Position 349 eines Stopcodons, was zu einem Abbruch und eine

verkürzte Isoform des Ataxin-3 führt (Prudencio et al., 2020). Daraus ergeben sich 3 mögliche Varianten an Kombinationen von Allelen: A/A;A/C;C/C (Goto et al., 1997). Es gibt auch noch eine weitere Variante. durch den Tausch TAC>TAT kommt es zur Bildung eines Tyrosin Codon, damit bleibt ursprüngliche Länge des Ataxin-3 erhalten. Das SNP 1118 führt zur Entstehung der ataxin-3aL Form und der ataxin-3aS Form (ataxin-3a Uniprot ID P54252-1). Der ataxin-3aS Form fehlen durch das Stopcodon 16 Aminosäuren am C-terminalen Ende im Vergleich zur Referenzform ataxin-3c (UniProt ID P54252-2) (Weishaupl et al., 2019). Studien zeigten, dass das TAA-Codon, was dann wiederum zu Ataxin-3aS führt in den Mutationsträgern, mit einem Anteil von 87 %, sehr häufig ist (Prudencio et al., 2020). Die TAA-Variante ist mit der weitverbreiteten Joseph-Linie verbunden (Martins & Sequeiros, 2018; Prudencio et al., 2020). Das ATXN3 BP 1118 ist damit ein sehr interessanter Ansatzpunkt für spezifische *Gene Silencing* Ansätze (Prudencio et al., 2020).

Das ATXN3 BP 987 ist am 3' Ende des CAG Repeats gelegen (Maciel et al., 1999). Das SNP 987 liegt auf Chromosom 14 in Exon 10 (dbSNP: rs12895357) (Position: ch14:92071010). Beim SNP 987 handelt es sich um einen Austausch von CGG>GGG. Durch diesen Austausch wird ein Glycin statt eines Arginins eingefügt an Aminosäuren Position 318 (Goto et al., 1997; Kawaguchi et al., 1994). Das SNP 987 kann auf Grund seiner starken Häufung in SCA3 Patienten ebenfalls für spezifische *RNA Silencing* Therapiestudien verwendet werden (Hauser et al., 2022). Die Kombination aus den Haplotypen CCG und TAA ist vor allem unter den japanischen Mutationsträgern sehr häufig (Goto et al., 1997).

Das ATXN3 BP 669 liegt auf dem Chromosom 14 auf Exon 8 (Position: 14:92071010) (dbSNP: rs1048755). Beim SNO 669 handelt es sich um einen Austausch von ATG>GTG. Durch diesen Austausch wird an Aminosäuren Position 212 Valin statt Methionin eingefügt (Goto et al., 1997). Eine Studie

an SCA3 Mutationsträgern zeigte, dass 70 % aller SCA3 Patienten den ACA-Kombination der 3 untersuchten SNP aufweisen (Gaspar et al., 2001).

### 1.10 ESMI-Kohorte

Die Probanden dieser Arbeit stammen aus der ESMI-Kohorte. ESMI steht für *European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative*. Die ESMI-Studie wird durch das EU-Programm JPND in Zusammenarbeit mit der EU-Kommission (Jpco-fuND) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert. Weitere Förderer auf nationaler Ebene sind das Medical Research Council (MRC, Vereinigtes Königreich), Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT; Portugal) und die Niederländischen Organisation für Gesundheitsforschung und -entwicklung (ZonMw, Niederlande). Die ESMI-Kohorte besteht aus Mutationsträgern und erstgradigen Angehörigen von Mutationsträgern, die selbst ein Erkrankungsrisiko von 50% haben, sowie gesunden Kontrollen. Es umfasst Standorte in Deutschland (Bonn, Tübingen, Aachen, Essen, Frankfurt), Portugal, Großbritannien und den Niederlanden, mit Kooperationen in Frankreich, Brasilien und den USA. Es sind noch weitere Kooperationen mit anderen Standorten geplant. Prof. Thomas Klockgether vom Universitätsklinikum Bonn und dem DZNE koordiniert die Studie. Die zweite Studienkordinatorin ist Dr. Jennifer Faber vom Universitätsklinikum Bonn. Ziel der Studie ist das Kreieren einer *Trial-Ready* Kohorte, welche groß genug ist um Medikamentenstudien an ihr durchzuführen. Ein weiteres wichtiges Ziel ist die Etablierung von prognostisch relevanten Biomarkern. Die Studie sowie die Abnahme und Untersuchung der Biomaterialien sind hoch standardisiert und umfasst neben Blut bzw. CSF-Entnahmen, eine klinische Untersuchung des Probanden was Krankheitsprogression und Lebensqualität angeht und eine Bildgebung durch ein MRT. Die hier erhobenen Daten sollen wegweisend für die Planung weiterer Studien und Therapiekonzepte sein. Die ESMI-Kohorte umfasst mehr als 800 Probanden ([www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi](http://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi), 2024)/ ([www.ataxia-study-group.net/html/studies/esmi](http://www.ataxia-study-group.net/html/studies/esmi), 2024)

## 1.11 Ziele dieser Arbeit

Die SCA3 ist eine autosomal dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung aus der PolyQ-Familie. Grundlegend für die Pathologie ist der expandierte CAG Repeat im *ATXN3* Gen, welcher zur Produktion von expandiertem Ataxin-3 Protein führt. Ataxin-3 wurde in Studien als vielversprechender Biomarker für Krankheitsprogression und für die Anwendung in Therapiestudien identifiziert. Die Anwendung als Surrogate Marker für Therapiestudien ist besonders in einer so seltenen Erbkrankheit wie der SCA3 wichtig. Werden klinische Endpunkte wie der SARA Score oder der INAS Score verwendet, sind lange Laufzeiten und eine hohe Probandenzahl nötig um statistisch eine signifikante Aussage treffen zu können. Gleichzeitig fehlen diese Probanden dann für weitere parallel ablaufende Studien, sodass die Anzahl an möglichen Studien dadurch verringert wird. Der Bedarf an einem zuverlässigen Biomarker ist also groß: zum einen ist die SCA3 die häufigste autosomal dominante SCA, zum anderen ist der Leidensdruck der Patienten und ihrer Familien enorm groß. Die Krankheit hat eine 100% Penetranz und verläuft letztendlich letal für Betroffene. Ziel dieser Arbeit ist die Betrachtung von Ataxin-3 im longitudinalen Studiendesign. Es wurden Blutproben aus der ESMI-Kohorte verwendet, die zusammen mit Daten der Patienten wie Alter, AAO und Erkrankungsdauer zur Verfügung gestellt wurden. Die Probanden wurden über mehrere Jahre beobachtet, klinisch im Rahmen der ESMI-Studie beurteilt und es wurde Biomaterial entnommen. Ziel dieser Promotion ist erstens der Vergleich von 3 unterschiedlichen Methoden Ataxin-3 zu quantifizieren: Es wurden die hochsensitive TR-FRET Technologie verwendet um das *full-length* Ataxin-3 aus PBMCs zu bestimmen (Gonsior et al., 2021). Diese Technik wurde von mir selbst durchgeführt, für die Auswertung wurde aber auch auf bereits bestehende Daten aus der Arbeitsgruppe für die bereits analysierten ESMI-Probanden zurückgegriffen. Die zweite zu vergleichende Technik war der ultrasensitiven Singulex-Technologie aus Plasma durch Firma Evotec für expandiertes Ataxin-3 (Hubener-Schmid et al., 2021). Die

dritte verwendete Technik, die ultrasensitive Simoa-Technologie, die an Plasma-Proben durch das NMI Reutlingen durchgeführt wurde, maß das expandierte Ataxin-3. Ziel dieser Promotion war neben dem Vergleich der Ataxin-3 Konzentrationen in den verschiedenen Methoden und Biomaterialien, die Beurteilung der Stabilität des Ataxin-3 Protein im 4 Jahres Verlauf und während der Krankheitsprogression.

Das dritte Ziel dieser Promotion war die Korrelation der Ataxin-3 Daten mit klinischen Daten der Probanden. Die Level an *full-length* Ataxin-3 und expandiertem Ataxin-3 wurden im Rahmen dieser Arbeit mit dem SARA Score, dem INAS Score, dem Age at Onset (AAO) und der Erkrankungsdauer (DD) korreliert. Neben diesen Analysen wurden im Verlauf dieser Arbeit die bereits vorliegenden Daten der SNP-Analyse der ESMI-Kohorte für die SNP 1118, SNP 987 und SNP 669 um weitere Analysen neu eingetroffener Proben ergänzt und die Verteilung der 3 genannten SNPs in der ESMI-Kohorte nochmal neu analysiert.

## **2 Material und Methoden**

Die in dieser Doktorarbeit analysierten Proben und Daten wurden im Rahmen der European Spinozerebelläre Ataxia Type 3/Machado Josephs Disease Initiative (ESMI) erhoben. Neben der Uniklinik Tübingen gibt es noch 6 weitere Studienzentren in London, Groningen, Nijmegen, Bonn und Coimbra und den Azoren in denen Patienten untersucht und Biomaterial gewonnen wurde. Das Ethikvotum für die Verarbeitung der Proben an der Universität Tübingen findet sich unter dem Eintrag 598/2011BO1 und für die Aufarbeitung mit dem TR-FRET unter 911/2019BO2.

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Gewinnung der Biomaterialien und klinischen Daten**

In der ESMI-Kohorte befinden sich Merkmalsträger der SCA3 sowohl im präataktischen als auch im ataktischen Stadium ihrer Krankheit. Kontrollprobanden ohne expandiertes ATAXIN3 Gen befinden sich ebenfalls in der ESMI Kohorte. Der klinische Verlauf wird während der Studie erfragt sowie im SARA und INAS Score an allen Studienzentren vergleichbar quantifiziert. Auch die aktuelle und frühere Medikation wird während der Studie protokolliert. Die Gewinnung von Biomaterialien (Vollblut, PMCS, CSF etc.) erfolgt hochstandardisiert nach dem ESMI *Manual of Biosampling* Version 3 (August 2020) um so die Proben auch zwischen den verschiedenen Studienzentren möglichst unter einheitlichen Bedingungen abnehmen zu können. Für diese Doktorarbeit wurde EDTA Vollblut verwendet sowie PBMC Proben, die vor der weiteren Verarbeitung lysiert wurden. Traten Unstimmigkeiten zwischen Genotyp und klinischen Daten des Probanden auf oder zwischen den Genotyp zwischen zwei Proben eines Probanden wurde versucht in Kommunikation mit dem Studienzentrum, das den Probanden betreut

diese Unstimmigkeit aufzuklären andernfalls wurden die Proben des Probanden von der Auswertung ausgeschlossen.

Mit allen in dieser Arbeit eingeschlossenen Methoden TR-FRET, Simoa (durchgeführt durch das NMI Reutlingen), sowie Singulex (durchgeführt durch die Firma Evotec) wurden longitudinale Analysen gemacht. Da die klinische Beurteilung und Biomaterial Gewinnung so hochstandardisiert ist, war es möglich die Proben eines Probanden die im Verlauf mehrerer Jahre entnommen wurden miteinander zu vergleichen.

*Tabelle 1 Chemikalien einschließlich der Hersteller und deren Hauptsitz*

<b>CHEMIKALIEN</b>	<b>HERSTELLER, HAUPSITZ, LAND</b>
<b>SODIUM NITRITE</b>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
<b>AMPUWA H2O</b>	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
<b>SIZESTANDARD KIT 600 GENOME LAB</b>	Beckman Coulter, Brea, USA
<b>QIAGEN PROTEASE</b>	Qiagen, Hilden, USA
<b>SEPERATION GEL-LPA 1 GENOMELAB</b>	Beckman Coulter, Brea, USA
<b>TRIS</b>	Roche, Basel, Schweiz
<b>GLYCERIN</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>NATRIUMHYDROGENCARBONAT</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>NATRIUMDIHYDROGENPHSPHAT-MONOHYDRAT ≥98%, USO, BP</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>ETHANOL 99%</b>	SAV Liquid Produktion GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
<b>BSAS</b>	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
<b>COMPLETE MINI, EDTA FREE</b>	Roche, Basel, Schweiz
<b>SPEREATION GEL GENOME LAB</b>	Beckman Coulter, Brea, USA
<b>NATRIUMFLUORID</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>PEQGOLD DANN LADDER MIX</b>	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
<b>6 X ORANGE DANN LOADING DYE 1ML</b>	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
<b>PCR GRADE NUCLEOTIFR MIX</b>	Roche, Basel, Schweiz
<b>Q-SOLUTION (5X)</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>TAQ DNA POLYMERASE 10 X 5UNITS/μL</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>TRITIN X 100</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>TWEEN-20</b>	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
<b>BIO-RAD PROTEIN ASSAY DYE REAGENT CONCENTRATE</b>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

<b>SLS SAMPLE LOADING SOLUTION</b>	Beckman Coulter, Brea, USA
<b>ETHIDIUMBROMID</b>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>PCR BUFFER ,10 X</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>LIGHT CYCLER 480 HIGH RESOLUTION MELTING MASTER H20 PCR GRADE</b>	Roche, Basel, Schweiz
<b>LIGHT CYCLER 480 HIGH RESOLUTION MELTING MASTER MGCL 25 MM</b>	Roche, Basel, Schweiz
<b>DPBS DULBECCO`S PHOSPHATE BUFFERED SALINE</b>	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

*Tabelle 2 Verwendete Kits, sowie deren Hersteller*

<b>KITS</b>	<b>FIRMA, HAUPSITZ, LAND</b>
<b>LIGHTCYCLER 480 HIGH RESOLUTION MELTING MASTER VERSION 05</b>	Roche, Basel, Schweiz
<b>FLEXIGENE DNA-KIT (250) FÜR 250 ML OF BLODD CAT.NO 51206</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>GENOMELAB DCTS-QUICK START KIT REF 608120</b>	Beckman Coulter, Brea, USA

*Tabelle 3 Verwendete Primer, sowie deren 5´-3´Sequenz und Produktlänge, sowie Hersteller*

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUENZ (5´-3´)</b>	<b>PRODUKTLÄNGE (BP)</b>	<b>HERSTELLER</b>
<b>ATXN3 SNP 669 VORWÄRTS (T979) 10 µM</b>	TAC TAG AGC TTA TTT GCC AG	221	Metabion, Planegg, Deutschland
<b>ATXN3 SNP 669 RÜCKWÄRTS (T980) 10 µM</b>	CAG AGC CCT CTG CAA AZC CT	221	Metabion, Planegg, Deutschland
<b>ATXN3 CAG VORWÄRTS (U897) 10 µM</b>	CCA GTG ACT TTG ATT CG	159 + 3 X repeat	Metabion, Planegg, Deutschland
<b>ATXN3 CAG RÜCKWÄRTS (U898) 10 µM</b>	TGG CCT TTC ACA TGG ATG TGA A	159 + 3 X repeat	Metabion, Planegg, Deutschland
<b>ATXN3 SNP 1118 +987 VOWÄRTS (T982) 10µM</b>	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG	212	Metabion, Planegg, Deutschland
<b>ATXN3 SNP 1118 RÜCKWÄRTS (V145)</b>	GCA AAA ATC TGG AGC TCT	321*	Metabion, Planegg, Deutschland
<b>ATXN3 SNP 1118 RÜCKWÄRTS (V146)</b>	GCA AAA ATC ACA TGG AGC TCG	321*	Metabion, Planegg, Deutschland
<b>ATXN3 SNP 987 RÜCKWÄRTS (312) 10µM</b>	ACT CTG TCC TGA TAG GTC CCC	181*	Metabion, Planegg, Deutschland
<b>ATXN SNP 987 RÜCKWÄRTS(V144) 10µM</b>	ACT CTG TCC TGA TAG GTC CCG	181*	Metabion, Planegg, Deutschland

\*Angaben pro 10 CAG Repeats

Tabelle 4 Antikörper, Beschreibung was man sieht

ANTIKÖRPER	FIRMA, HAUPTSITZ, LAND
ATAXIN3 1H9 D2	Cisbio Bioassays, Codolet, Frankreich
ATAXIN3 N- TERM	Cisbio Bioassays, Codolet, Frankreich

Tabelle 5 Lösungen und Puffer, Beschreibung was man sieht

DETECTION	50 mM $NaH_2PO_4$
BUFFER	400 mM $NaF$ 0,1 % BSA 0,05 % Tween 20
DELUTION	DPBS
BUFFER	4 % Complete
COMPLETE	1 Tablette Complete mini EDTA free 2 ml $ddH_2O$ auffüllen
LYSE	1 % Triton 100
PUFFER	40 $\mu$ l Complete DPBS zu 1 ml auffüllen
ORANGE G	0,044 mM Orange G 0,35 mM Ficoll PM400 $ddH_2O$ zu 50 ml auffüllen
TBE (10X)	890 mM TRIS Base 890 mM Borsäure 4 % 0,5 M EDTA- $Na_2$ pH 8,0 $ddH_2O$ zu 1 l auffüllen
TBE (1X)	TBE (10X) $ddH_2O$ zu 2l auffüllen
BSA 1 %	10 % BSA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) + $ddH_2O$

Tabelle 6 Geräte, Beschreibung was man sieht

PCR-MASCHINE GS-07	G-Storm AplhaMetrix Biotech, Rödermark, Deutschland
BIOPHOTOMETER	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CENTRIFUGE5420	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
VORTEXER HEIDOLPHNREAX CONTROL	Heidloph Instruments, Schwabach, Deutschland

<b>CENTRIFUGE 5418</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>WASSERBAD</b>	GFL, Burgwedel, Deutschland
<b>THERMOSTAT PLUS</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Beckman Coulter, Brea, USA
<b>MULTIMODE PLATE READER ENVISION</b>	PerkinElmer, Waltham, USA
<b>VORTEX-GENIE 2</b>	Scientific Industries, Bohemia, USA
<b>WAGE</b>	Pescala Wägetechnik, Bisingen, USA
<b>PIPETUS-AKKU</b>	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
<b>CEQ8000 GENETIC ANALYSIS SYSTEM</b>	Beckman Coulter, Brea, USA
<b>LIGHT CYCLER 480 REAL TIME PCR SYSTEM</b>	Roche, Basel, Schweiz
<b>CONSORT ELECTROPHORESIS POWER SUPPLY E833</b>	Consort, Turnhout, Belgien
<b>UVP GELSTUDIO PLUS</b>	Analytic Jena, Jena, Deutschland
<b>PERFECT BLUE GELKAMMER</b>	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
<b>BIOTEK SYNERGY HT MICROPLSTE READER</b>	Marshall Scientific, Hampton, USA
<b>PIPETTEN</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>MULTIPETTE PLUS</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

*Tabelle 7 Verbrauchsmaterialien, Beschreibung was man sieht*

<b>FALCON</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>PCR CONSUMABLES 0.2ML 8-STRIP PCR TUBE</b>	Star Lab, Hamburg, Deutschland
<b>PIPETTENSPIZTEN</b>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Star lab, Hamburg, Deutschland
	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>LANZETTEN</b>	Becton, Dickinson & Co LTD, Drogheda Ireland
<b>PIPETTEN EPPENDORG RESEARCH PLUS</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>PROXIPLATE 384 TC PLUS, WHITE, SHALLOW 384-WELL, TISSUE-CULTURE TREATED, WITH LID</b>	PerkinElmer, Waltham, Deutschland
<b>REAKTIONSGEFÄßE 1,5 ML</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>EPT.I.P. S RELOADS 0.1-10µL</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>EPT.I.P. S RELOADS 2-200µL</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>LIGHT CYCLER 480 MULTIWELL PLATTE,384</b>	Roche, Basel, Schweiz
<b>SAFE-LOCK REAKTIONSGEFÄß 1,5 ML AMBER, UV-TUBE</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

<b>REAKTIONSGEFÄßE 2ML, PP, GRADUATED, ATTACHED CAP, NATURAL</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>COMBITIPS ADVANCES 50 ML</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>MICROPLATE,96 WELL, PS, F-BOTTOM.CLEAR</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>PCR-PLATE 96X0,2 ML, HALF.SKIRTED, NATRURAL</b>	Nerbe plus, Winsen, Deutschland
<b>NIRTRIL HANDSCHUE GRÖßE S</b>	Joza Medic, Frankfurt, Deutschland
<b>STRIPETTE 10 ML</b>	Costar, Corning, USA
<b>DALCON STRIPETTE 25 ML</b>	Betcon Dickinson, Heidelberg, Deutschland

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 DNA-Isolation aus Blutproben

In allen ESMI Probanden wurden die CAG-Wiederholungsanzahl und die 3 Polymorphismen SNP 987, SNP 1118 und SNP 669 im Ataxin-3 Gen aus EDTA-Vollblut bestimmt. Um die DNA aus dem EDTA Vollblut zu bestimmen, wurden das FlexiGene DNA-Kit von der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet (Kithandbuch, Versionsnummer und Datumangabe). Das bei -80°C gelagerte EDTA-Vollblut wurde zunächst im vorgeheizten Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Es wurde 500 µl Vollblut genutzt, das zu 1250 µl FG 1 Puffer in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert wird. Danach wird das Reaktionsgefäß 5-mal invertiert und 3 Minuten bei 13.5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nun abgekippt und auf ein sauberes Tuch zum Trocknen gestellt. Zu 250 µl FG 2 wurde jeweils 2,5 µl Qiagen Protease gegeben. Nachdem das FG2 Puffer-Protease Gemisch zu jeder Probe gegeben wurde, wurde es sofort gevortext und danach kurz zentrifugiert. Darauf wurde das Blut-Puffer-Gemisch für 5 Minuten auf 65 °C inkubiert. Anschließend wurde 250 µl Isopropanol in das Reaktionsgefäß hinzugegeben und 5-mal invertiert. Sollte kein Pellet oder DNA Stränge zu sehen sein, wurde das Invertieren wiederholt. Danach wurden die Proben 3 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird auf ein Tuch abgekippt und es werden 250 µl 70 % Ethanol hinzugegeben. Das

Reaktionsgefäß wird 5 Sekunden gevortext und erneut 3 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und das Reaktionsgefäß umgedreht für 5 Minuten auf ein sauberes Tuch zum Trocknen gestellt. Nach weiteren 30 Minuten, in denen der Rest des Ethanol verdampft war, wurde 100 µl FG 3 Puffer hinzugefügt und die Proben über Nacht im Schrank bei Raumtemperatur gelagert, um die isolierte DNA im Puffer zu lösen. Am nächsten Tag wurden die Proben 10 Minuten bei 65 °C auf dem Thermomixer inkubiert.

### **2.2.2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung**

Da bei den folgenden PCR-Reaktionen die DNA jeweils in einer Konzentration von 50 ng/µl eingesetzt werden soll, wurde die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA photometrisch ermittelt. Zunächst musste das Photometer auf den Elutionspuffer (FG3 Puffer des Qiagen DNA-Isolation Kit), in welcher die DNA gelöst ist, genormt werden. Dafür wurde dieser als erstes auf eine Glasküvette gegeben und gemessen. Auf dem Photometer wurde als zu messende Substanz dsDNA (doppelsträngige DNA) eingestellt. Nachdem das Eppendorf Photometer auf den FG3 Puffer normalisiert wurde, konnte die DNA-Konzentration der Proben bestimmt werden. Die DNA-Proben werden gevortext und dann wurde ebenfalls 1,5 µl entnommen und wie der FG 3 Puffer auf die Eppendorf Glasküvette aufgetragen. Die Konzentration der dsDNA wurde bei 260 nm gemessen und in ng/µl angegeben. Außerdem wurde die Reinheit der DNA mittels der Absorptions-Ratio 230/280 und 260/320 bestimmt, dafür wird die Absorption noch für die Wellenlängen 230, 260 und 320 gemessen. Der Quotient 230/280 ist ein Indikator für Proteinverunreinigungen. Bei einem Quotienten von  $\geq 1,8$  geht man von reiner DNA aus. Der Wert für die Absorption Ratio 260/230 sollte zwischen 2,0-2,2 liegen, bei niedrigeren Werten geht man von einer Kontamination aus, die bei 230 nm absorbiert. Nach der Isolation wurde die DNA bei -20°C gelagert.

### **2.2.3 Bestimmung der CAG Wiederholungsanzahl im *Ataxin-3* Gen**

Um die Länge des CAG Repeats sowie die SNPs 1118 und 987 zu bestimmen wurden zunächst mit der isolierten DNA eine PCR mit Fluoreszenz markierten Primern durchgeführt, sodass der gewünschte Abschnitt im *Ataxin-3* Gen amplifiziert und mit einem Fluoreszenzsignal markiert wurde. Die Markierung mit Fluoreszenzsignal ist entscheidend für die auf die PCR folgende Fragmentlängenanalyse. Diese wurde mit dem CEQTM8000 Genetic Analysis System der Firma Beckmann durchgeführt. Das Gerät misst die Fluoreszenz der Primer an den PCR Produkten und errechnet im Vergleich zum im Mastermix vorhandenen Size Standard 600 die Größe des PCR Produkts.

### **2.2.4 PCR CAG Bestimmung**

Zur Bestimmung der CAG-Wiederholungsanzahl des *ATXN3* der isolierten DNA wurde eine PCR (Polymerase Kettenreaktion) durchgeführt. Die Anwendung der PCR Methode dient dazu, mithilfe für ein DNA-Abschnitt spezifischer Primer diesen Abschnitt zu amplifizieren.

Die DNA, deren Konzentration vorher photometrisch bestimmt wurde, wurde auf 50 ng/ $\mu$ l verdünnt. Es wird ein Mastermix für die jeweilige Probenmenge hergestellt (siehe Tabelle 8). Die Taq Polymerase wird dabei als letztes hinzugegeben, damit diese möglichst kurz der Raumtemperatur ausgesetzt ist. Da die Primer fluoreszenzmarkiert sind, ist der Mastermix in einem UV-Tube anzusetzen. Davon werden jeweils 22  $\mu$ l in einen PCR Stripes pipettiert sowie 3  $\mu$ l der isolierten DNA, sodass die PCR Bestimmung mit einer Gesamtmenge von jeweils 25  $\mu$ l durchgeführt wird. Tabelle 9 zeigt das Thermocyclerprogramm für die PCR der Fragmentlängenanalyse des CAG Repeat.

Tabelle 8 Mastermix für PCR für die Fragmentlängenanalyse des CAG Repeat

<b>10X PCR BUFFER QIAGEN</b>	<b>2,5 µL</b>
<b>WATERS PCR GRADE</b>	12,8 µl
<b>5X Q-SOLUTION QIAGEN</b>	4,0 µl
<b>DNTP MIX PCR GRADE (10MM)</b>	0,5 µl
<b>PRIMER U897 (10µM)</b>	1,0 µl
<b>PRIMER U898 (10µM)</b>	1,0 µl
<b>TAQ POLYMERASE (50 NG/µL)</b>	0,2 µl
<b>DNA (50 NG/µL)</b>	3 µl
<b>TOTAL</b>	25 µl

Tabelle 9 Thermocyclerprogramm für die Fragmentlängenanalyse des CAG Repeat

<b>THERMOCYCLER PROGRAMM</b>	<b>TEMPERATUR</b>	<b>ZEIT</b>	<b>ZYKLEN</b>
<b>INITIAL DENATURATION</b>	94	5 min	1
<b>DENATURATION</b>	94	1 min	1
<b>ANNEALING</b>	66	1 min	30
<b>ELONGATION</b>	72	2 min	30
<b>FINAL ELONGATION</b>	72	10 min	1
<b>STORE</b>	10	∞	1

Die PCR wurde für jede Probe in zweimal vorgenommen: Zum einen für die interne Analyse und zum anderen für das Diagnostiklabor des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik. Um zu überprüfen, ob ein PCR Produkt entstanden ist, wird eine Gelelektrophorese durchgeführt.

### 2.2.5 PCR für SNP 1118 und SNP 987

Die Genotypisierung für das SNP 1118 und SNP 987 erfolgte - wie auch die Bestimmung des CAG Repeats - durch eine Fragmentlängenanalyse mit fluoreszenzmarkiertem Primern. Für den SNP 1118 wurden die Genotypen A/A A/C und C/C bestimmt. Für den SNP 987 wurden die Genotypen C/C G/C und G/G unterschieden. Die verschiedenen Genotypen unterscheiden sich jeweils nur in einer einzigen Base.

Dafür wurde ein Vorwärts Primer verwendet sowie zwei unterschiedliche, jeweils mit einer unterschiedlichen Fluoreszenz markierte Rückwärts Primer, die sich nur in einer Base unterscheiden. Die beiden rückwärts Primer wurden unterschiedlich Fluoreszenz markiert (IRD 700 und Cy5) um die Genotypen in der Fragmentlängenanalyse anhand der unterschiedlichen Floreszenz Signale voneinander abgrenzen zu können. Zunächst wurde ein Mastermix hergestellt (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11) und die DNA, die amplifiziert werden sollte, auf 50 ng/µl verdünnt. Die Taq Polymerase wird abschließend auf Eis dazu pipettiert. Der Mastermix wurde, um die Fluoreszenz Markierung der Primer zu erhalten, in einem UV-Tube angesetzt. In einen PCR Stripes wird jeweils pro Reaktionsgefäß 19 µl Mastermix pipettiert sowie 1 µl DNA ergänzt. Der PCR Stripe wurde in einen Thermocycler gestellt und für SNP 1118 als Programm Tabelle 12 und für SNP 987 als Programm Tabelle 13 eingestellt.

Danach kann eine Gelelektrophorese durchgeführt werden.

*Tabelle 10 Mastermix für PCR für SNP 1118*

<b>REAGENZ</b>	<b>VOLUMEN (µL)</b>
<b>10X PCR PUFFER, QIAGEN</b>	2 µl
<b>WASSER, PCR GRADE</b>	7,6 µl
<b>5X Q-SOLUTION, QIAGEN</b>	4,0 µl
<b>DNTP MIX, PCR GRADE (2 MM)</b>	1,6 µl
<b>PRIMER T982 (10 µM) (VORWÄRTS)</b>	1,2 µl
<b>PRIMER V145 (10 µM) (RÜCKWÄRTS)</b>	1,2 µl
<b>PRIMER V146 (10 µM) (RÜCKWÄRTS)</b>	1,2 µl
<b>TAQ DNA-POLYMERASE, QIAGEN (250 U)</b>	0,2 µl
<b>DNA (50 NG/µL)</b>	1,0 µl
<b>TOTAL</b>	20 µl

Tabelle 11 Mastermix für PCR für SNP 987

REAGENZ	VOLUMEN (µL)
10X PCR PUFFER, QIAGEN	2,0 µl
WASSER, PCR GRADE	13,4 µl
FORMAMIDE	0,5 µl
DNTP MIX, PCR GRADE (10 MM)	0,5 µl
PRIMER T982 (10 µM) (VORWÄRTS)	0,8 µl
PRIMER G654 (10 µM) (RÜCKWÄRTS)	0,8 µl
PRIMER G655 (10µM) (RÜCKWÄRTS)	0,8 µl
TAQ POLYMERASE, QIAGEN (250 U)	0,2 µl
DNA (50 NG/µL)	1,0 µl
TOTAL	20 µl

Tabelle 12 Thermocycler Programm für PCR Amplifizierung SNP 1118

THERMOCYCLER PROGRAMM	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
INITIAL DENATURATION	94	4 min	1
DENATURATION	94	15 s	35
ANNEALING	58	30 s	35
ELONGATION	72	1 min	35
FINAL ELONGATION	72	6 min	1
STORE	10	∞	1

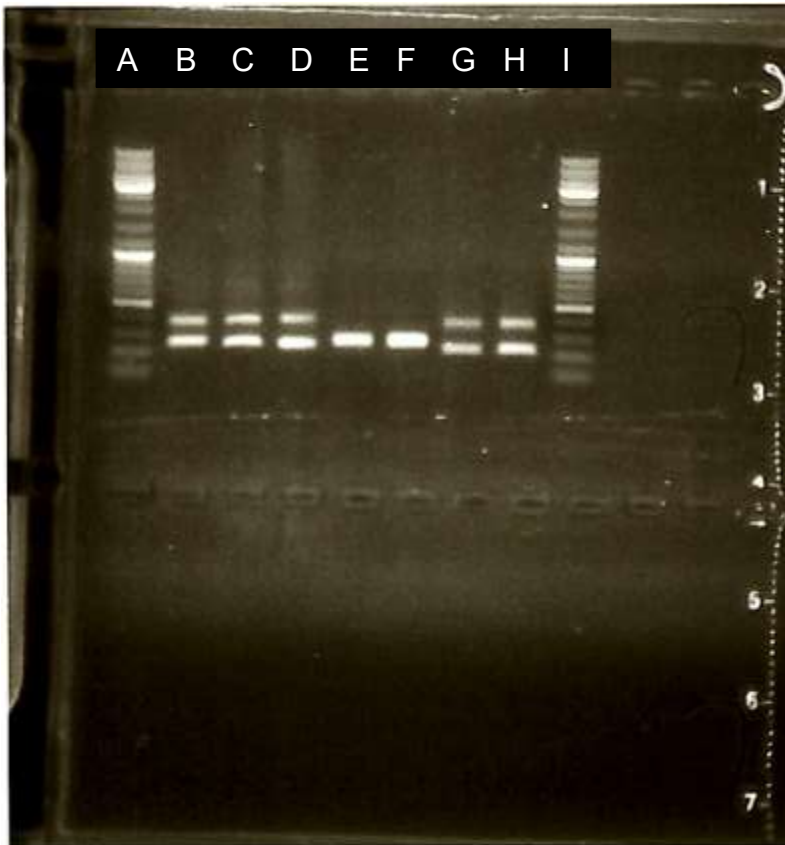
Tabelle 13 Thermocycler Programm für PCR Amplifizierung SNP 987

THERMOCYCLER PROGRAMM	TEMPERATUR	ZEIT	ZYKLEN
INITIAL	94	4	1
DENATURATION		min	
DENATURATION	94	15 s	35
ANNEALING	59,5	30 s	35
ELONGATION	72	1	35
		min	
FINAL	72	6	1
ELONGATION		min	
STORE	10	∞	1

### 2.2.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient dazu Moleküle mit Hilfe eines elektrischen Feldes nach Größe aufzutrennen. Sie wurde vor der Fragmentlängenanalyse durchgeführt um zu überprüfen, ob ein PCR Produkt entstanden ist. Es wurde ein 1% Agarose Gel hergestellt, indem 0,6 g Agarose abgewogen und zu 60 ml TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) hinzugefügt werden. Das Agarose Gel Gemisch wurde nun in der Mikrowelle für 1 Minute bei 800 W erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Es wurden darauf 3 µl Ethidiumbromid hinzugefügt, um später die DNA unter UV-Licht darstellen zu können. Das Gel wurde in eine Gel Form gegossen, in die 2 Kämme eingehängt werden, wo es 20 Minuten aushärtet. 5 µl vom PCR Produkt wurden zu 5 µl Orange G pipettiert und gevortext und dann in eine nach dem Ziehen der Kämme entstandene Tasche pipettiert. Als Kontrolle wurde 1,5 µl des GeneRulerMix der Firma Peqlab in die erste Tasche des Gels pipettiert. Das Gel wird dann bei 100 V in einer mit TBE (1X) gefüllten Kammer unter Spannung gestellt. Da die DNA negativ geladen ist, bewegt sie sich unter Spannung auf die Anode zu. Nach 20 Minuten kann das Gel durch ein unter UV-Licht ausgewertet werden. Wenn ein PCR Produkt entstanden ist, sollte in jeder Tasche, in der PCR Produkt pipettiert wurde, eine Bande zusehen sein. Bei einer Kontrolle sollte man eine Bande sehen,

entsprechend der zwei ähnlich Großen PCR Produkte bei der CAG Analyse. Bei einem heterozygoten Mutationsträger sollten 2 Banden entsprechen der unterschiedlich großen PCR Produkte, dem expandierten *ATAXN3* Gen und dem nicht expandierten. Bei einem homozygoten Mutationsträger war ebenfalls nur eine Bande zu erwarten, diese jedoch auf Höhe eines Expandierten *CAG-Repeats* (Abbildung 2.1). Waren keine Banden zu sehen sprach das dafür, dass die PCR Amplifizierung nicht erfolgreich war und die PCR wurde wiederholt. Wenn ein PCR Produkt entstanden war wurde ein Foto unter UV-Licht (UV-Gelstudio Plus, Analytik Jena) gemacht. Es ist notwendig das Foto unter UV-Licht zu machen, da das im Gel enthaltene und mit der DNA interkalierende Ethidiumbromid unter UV-Licht zerfällt und sichtbare Fluoreszenz entsteht. Im Anschluss wurde eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt, welche nachfolgend beschrieben wird.



*Abbildung 2.1: Foto der Gelelektrophorese unter UV-Licht der CAG PCR der Proben Tübingen 40, 41, 42, 43, 44, 45 (2 X) sowie an erster und letzter Position den Gene RulerMix der Firma Peqlab. Bei den Proben Tübingen 40 (B), 41(C), 42 (D) sowie 45 (G und H) sind zwei Banden zuerkennen, es handelt sich um Mutationsträger für SCA3, Bei Tübingen 43 (E) und 44 (F) ist nur eine Bande zuerkennen (bzw. zwei sehr nah beieinander eigene Banden). Diese Probenanden tragen kein expandiertes ATXN3 Gen. Der Gene RulerMix (A und I) ermöglicht die Abschätzung des molekularen Gewichts der PCR-Produkte.*

### **2.2.7 Fragmentlängenanalyse**

Die Fragmentlängenanalyse erfolgt mithilfe des Fragmentlängenanalysegeräts CEQ8000 Genetic Analysis System der Firma Beckman Coulter durchgeführt um nun die unterschiedlichen Genotypen anhand ihres Floreszenz Peak zu identifizieren.

Die Größenbestimmung findet anhand einer Kapillarelektrophorese statt. Das Prinzip der Kapillarelektrophorese beruht darauf ,dass Moleküle sich durch ein flüssiges Medium (hier Genome Lab Separation Gel, Beckman Coulter) unter

Einfluss eines elektrischen Feldes bewegen, wobei Ladung und Größe die Geschwindigkeit der Moleküle bestimmt. Der beigefügte fluoreszenzmarkierte Size Standard dient der Größenbestimmung des PCR-Produkts durch die Software des Gerätes. Der Genotypen der PCR Produkte kann bei der Fragmentlängenanalyse anhand der unterschiedlich farbigen Fluoreszenzmarkierungen der unterschiedlichen Rückwärtsprimer unterschieden werden. Mit dieser Methode lässt sich auch feststellen welches der beiden Allel welchen Genotyp trägt, denn durch die verschiedene Größe der PCR Produkte kommt es zu verschiedenen Durchlaufzeit durch die Kapillare und deswegen werden die PCR-Produkte je nach Größe zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt durch die Laser-Detektoreinheit detektiert.

Zuerst wird - abhängig von der jeweiligen Zahl an zu analysierenden Proben - ein Mastermix wie in Tabelle 14 erläutert hergestellt.

*Tabelle 14 Mastermix für Fragmentlängenanalyse im Beckman Gerät*

REAGENZ	VOLUMEN (µL)
SIZE STANDARD BECKMAN	0,5 µl
STANDARD LOADING SOLUTION BECKMAN	34,5 µl
PCR PRODUKT	5 µl
TOTAL (PRO WELL)	40 µl

Sollte das PCR Produkt so stark konzentriert sein, dass in der Fragmentlängenanalyse der Size Standard nicht mehr dargestellt werden konnte, wurde ein erneuter Durchlauf durchgeführt , bei dem das PCR Produkt 1:20 mit *H<sub>2</sub>O Ampuwa* verdünnt wurde.

Die Probenplatte wird mit 35 µl des Mastermix und 5 µl des PCR Produkt befüllt. Zusätzlich wird noch eine Leerreihe vor den eigentlichen Proben mit *H<sub>2</sub>O Ampuwa* befüllt. Auf jedes befüllte well wird nun ein Tropfen des *mineral oil* von Beckman gegeben. Auf der Puffer Platte werden darauf die entsprechenden

Reihen, die mit Proben bzw. *H<sub>2</sub>O Ampuwa* befüllt wurden, mit *Separation Buffer* von Beckman versehen. Die Matrix für die Platte wird nun am Desktop des an das Fragmentlängenanalysegeräts angeschlossenen Computers beschriftet und die beiden Platten in das Gerät gestellt. Für die Fragmentlängenanalyse des CAG Repeats wird die Einstellung Frag 3 (Tabelle 16) ausgewählt. Für die Fragmentlängenanalyse der SNP 1118 und SNP 987 wird die Einstellung Frag 2 (Tabelle 15) gewählt.

*Tabelle 15 Einstellungen des Frag 2 Programmes*

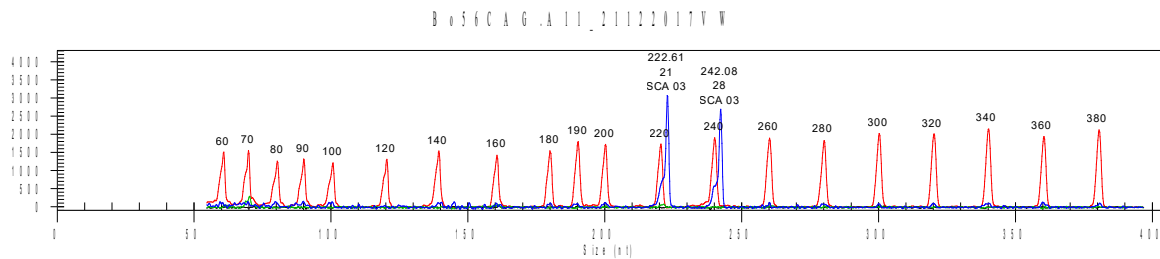
	KAPILLARE	DENATURIEREN	INJEKTION	TRENNUNG
<b>TEMPERATUR °C</b>	35°C	90°C		
<b>SPANNUNG IN KV</b>			2,0	6,0
<b>DAUER IN SEC</b>	Auf Erreichen der Ausgangstemperatur warten	120	30	60 min

*Tabelle 16: Einstellungen des Frag 3*

	KAPILLARE	DENATURIEREN	INJEKTION	TRENNUNG
<b>TEMPERATUR °C</b>	57 °C	90 °C		
<b>SPANNUNG IN KV</b>			2,0 kV	6,0 kV
<b>DAUER IN SEC</b>	Auf Erreichen der Ausgangstemperatur warten	120	30	60 min

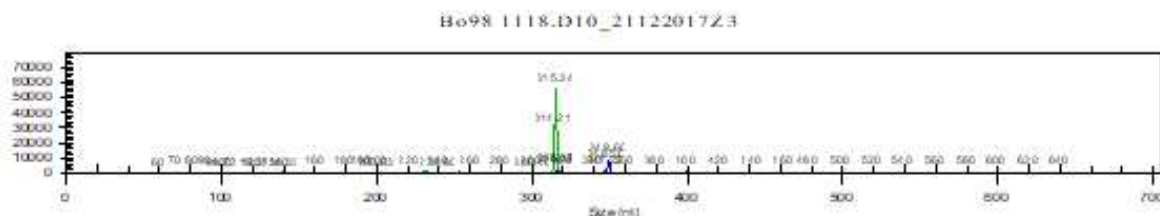
Die Auswertung für die CAG Repeatlängen Analyse erfolgt mit dem Programm SCA 3 Diagnostik, die den dargestellten Peaks die CAG Repeatlängen

automatisch zuordnet (siehe Abbildung 2.2). Die Peaks entstehen durch die Fluoreszenzmarkierung der verwendeten Primer.



**Abbildung 2.2 CAG Fragmentlängenanalyse der Probe Bo56 mit Genotyp 21/28:** Die blauen Peaks zeigen das Fluoreszenzsignal der PCR-Produkte. Die roten Peaks sind Fluoreszenzsignale des Size Standard 600.

Die Auswertung für die SNP 1118 und SNP 987 erfolgt mithilfe des Programms Standard 600. Ausgewertet wird anhand der unterschiedlichen Farben der Peaks wie in Abbildung 2.3 dargestellt.



**Abbildung 2.3: Auswertung der Fragmentlängenanalyse der PCR zu Amplifizierung für SNP 1118:** Die Probe Bo98 zeigt einen grünen Peak der für Genotyp C und einen blauen Peak für den Genotyp A, was für Genotyp spricht C/A.

### 2.2.8 High Resolution Melting SNP 668

Das *High Resolution Melting* ist eine Post PCR Methode, die auf doppelsträngige DNA angewendet wird, zur Bestimmung genetischer Varianten durch Unterschiede in der *PCR Melting Curve* (Schmidt et al.; U. Schmidt et al., 2016). Zuerst wird die isolierte DNA in einer PCR amplifiziert, dann findet eine langsame Erwärmung von 50 auf 95 Grad statt. Wenn in diesem Prozess die *Melting*

*temperature* des DNA-Strangs erreicht wird, beginnt dieser auseinanderzuschmelzen.

Diese Schmelzkurven werden mithilfe von Fluoreszenz gemessen. Beim Schmelzen wird die mit der DNA interkalierende Fluoreszenz der Primer freigesetzt und kann vom Lightcycler gemessen werden.

Bei diesem Verfahren nutzt man aus, dass zwischen Adenin und Thymin 2 H-Brücken sind zwischen Guanin und Cytosin 3 H-Brücken sind, was zu einem minimalen Unterschied in der Schmelzkurve führt. Im Falle des SNP 669 führt der Austausch der Base Adenin gegen die Base Guanin zur Unterscheidung dreier Genotypen: A/A A/G G/G. Aufgrund der Bestimmungsmethode kann hier nicht zwischen dem normalen und expandierten Allel unterschieden werden, im Gegensatz zur Fragmentlängenanalyse für SNP 1118 und SNP 987.

Zuerst wird ein Mastermix angesetzt nach Tabelle 17 aus den Chemikalien, die sich im Melting Master Kit der Firma Roche (Version 5) befinden. Der 2X Melting Master ist aufgrund der Polymerase, die er enthält, auf Eis zu pipettieren. Die zu amplifizierende DNA wird auf 50 ng/µl verdünnt. In eine 384 well Platte wird pro Probe jeweils 7,5 µl des Mastermix pipettiert und dazu jeweils 2,5 µl DNA.

Diese Platte wird dann im Lightcycler von Roche platziert und das Programm *Melting Aminoacidposition V2* ausgewählt (siehe Tabelle 18).

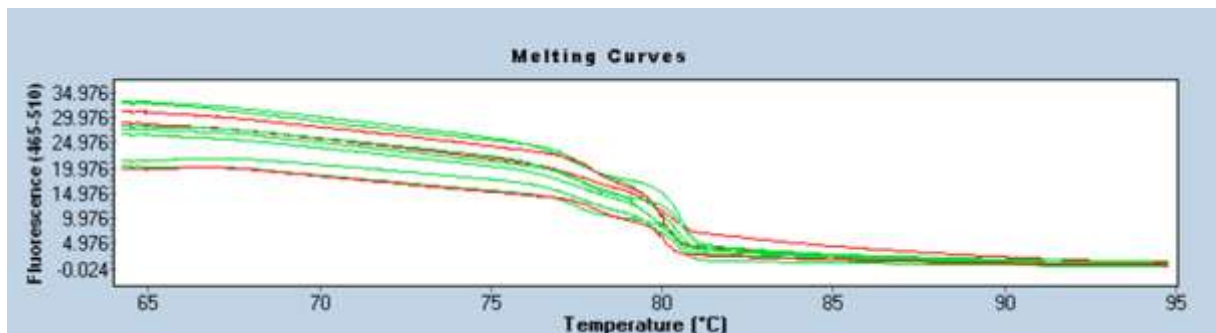
Tabelle 17 Mastermix für HRM für SNP 669

REAGENZ	VOLUMEN (µL)
2X MELTING MASTER	5 µl
WASSER PCR GRADE	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> PCR GRADE (25 MM)	1,5 µl
PRIMER MIX (T987+T980) PCR GRADE (JE 4 µM)	0,5 µl
DNA (50 NG/µL)	2.5 µl
TOTAL	10 µl

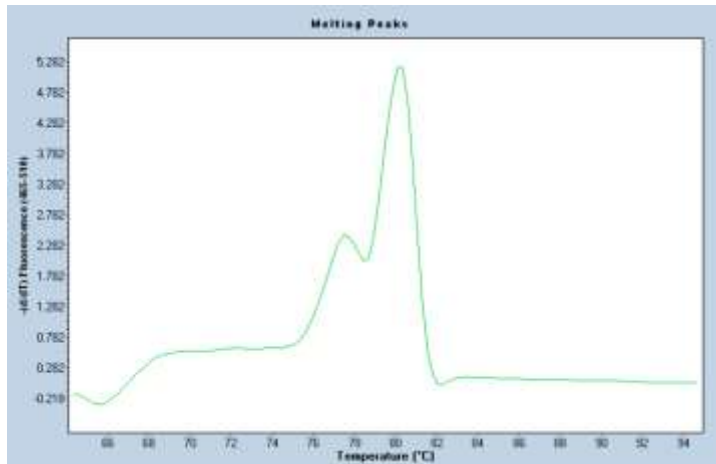
Tabelle 18 Programm Lightcycler für HRM für SNP 669

SCHRITT	TEMPERATUR (°C)	TIME (MIN)	RATE	MODE OF ACQUISITION	NUMMER OF ACQUISITION
<b>PRÄNKUBATION</b>	95	10	4.4	<i>none</i>	-
<b>AMPLIFIKATION</b>	95	0.17	4.4	<i>none</i>	-
	56	0.25	2.2	<i>none</i>	-
	72	0.17	4.4	<i>Onefold</i>	-
<b>MELTING</b>	95	1	4.4	<i>None</i>	-
	40	1	4.4	<i>None</i>	-
	65	0.017	1/1	<i>None</i>	-
	95	-	-	<i>continual</i>	25
<b>STORE</b>	40	0.17	2.2	<i>None</i>	-

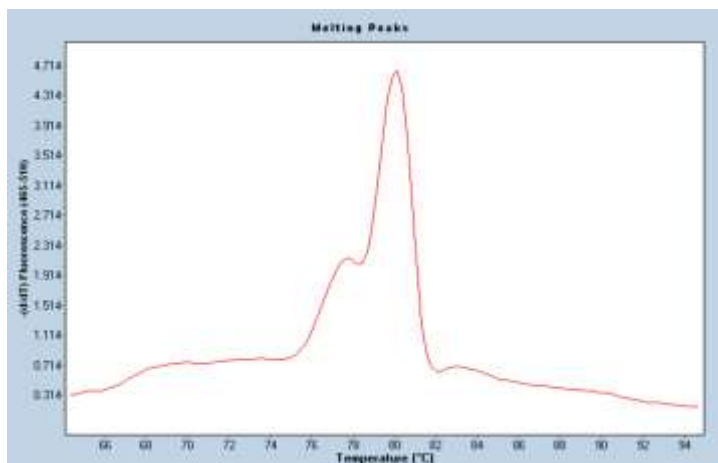
Die Auswertung erfolgt anhand der vom Lightcycler (Roche) gemessenen *Melting curves* (siehe Abbildung 2.4) und der daraus berechneten *Melting peaks* (siehe Abbildungen 2.5-2.7). Die *Melting curves* und *Melting peaks* weisen jeweils eine charakteristische Form auf an der sie voneinander unterschieden werden können.



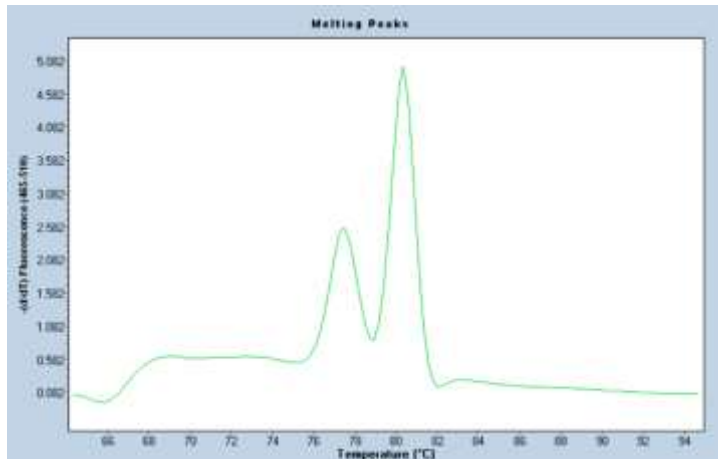
**Abbildung 2.4: Melting Curve SNP 669:** Auswertung der auf dem Lightcycler gemessenen Melting Curves von ESMI Probanden.



**Abbildung 2.5: Melting Peak SNP 669 Genotyp A/A:** Die Abbildung zeigt die aus der Melting Curve errechneten Melting Peaks für einen Probanden mit dem Genotyp A/A für den SNP 669.



**Abbildung 2.6: Melting Peak Genotyp SNP 669 A/G:** Die Abbildung zeigt die aus der Melting Curve errechneten Melting Peaks für einen Probanden mit dem Genotyp A/G für den SNP 669.



**Abbildung 2.7: Melting Peak Genotyp SNP 669 G/G:** Die Abbildung zeigt die aus der Melting Curve errechneten Melting Peaks eines Probanden mit dem Genotyp G/G für den SNP 669.

### 2.2.9 Lyse der PBMCs

Zuerst wird ein Lyse Puffer aus PBS, Complete und 10% Triton X hergestellt und nach der Herstellung sofort auf Eis gestellt oder bei -20 Grad eingefroren bis zur weiteren Verwendung.

Die vorher bei minus 80 Grad eingefrorenen PBMCs werden vorsichtig auf Eis aufgetaut um die darin enthaltenen Proteine nicht zu beschädigen und die späteren TR-FRET Messungen nicht zu verfälschen. Unter der Steril Bank der Zellkultur wird das PBMC Pellet mittels wiederholtem Pipettieren mit dem Lyse Puffer vermischt.

Für ein durchschnittlich großes Pellet wurden 50 µl Lyse Puffer verwendet, für ein kleineres Pellet 30 µl und für ein größeres Pellet 70 µl. Die Größe des Pellet - und damit die zu verwendenden Menge an Lyse Puffer - wurde im Vergleich mit den anderen Proben abgeschätzt. Bei makroskopisch sichtbarer Verunreinigung der Proben durch Erythrozyten oder wenn die Proben nicht zentrifugiert eintrafen, wurden folgende Schritte durchgeführt gemäß dem ESMI Manual for Biosampling (Version 3, August 2020) : Waschen der Probe in 500 µl sterilem PBS unter der Steril Bank, danach wurden sie 5 Minuten in Mikrozentrifuge bei 300 ruf bei Raumtemperatur zentrifugiert .Nachdem das PBS

unter der Steril Bank abgesaugt wurde, wurde mit dem pipettieren des Lyse Puffers zur PBMC Probe wie oben beschrieben fortgeföhren.

Nach Zugabe des Lyse Puffer wurden die Proben aus der Steril Bank genommen und gevortext. Sie wurden nun 30 Minuten auf Eis inkubiert und alle 10 Minuten gevortext. Danach wurden sie wieder bei - 80 Grad eingefroren.

### **2.2.10 Bradford Assay**

Der Bradford Assay wird verwendet, um die Gesamtproteinmenge vor dem TR FRET zu bestimmen, da die Gesamtproteinkonzentration für die Auswertung der TR-FRET Messergebnisse benötigt wird.

Dabei wird zuerst wird die Standardreihe hergestellt, in dem in 7 Reaktionsgeföhßen 1 % BSA und MilliQ Wasser in aufsteigender Konzentration pipettiert werden. In dem ersten Reaktionsgeföhß der Standardreihe befinden sich 800 µl und kein BSA, in den 6 darauffolgenden Reaktionsgeföhßen befinden sich jeweils 1,2,5, 15 und 20 µl, die jeweils zu 800 µl aufgefüllt wurden. Danach wurden die Proben gevortext. Die bei -80 Grad eingefrorenen PBMC Proben werden auf Eis aufgetaut.

Von den PBMC Proben wurden jeweils 1 µl unverdünnt auf 799 µl pipettiert und gevortext. In jedes Reaktionsgeföhß wurde nun 200 µl des Bradford Reagenz mit einer Multipipette hinzugefügt und das Reaktionsgeföhß sofort invertiert. Sowohl die Standardreihe als auch die Proben werden nun im Duplikat 100µl auf eine 96 Wells Platte pipettiert. Die Standardreihe ist in Tabelle 19 zu sehen. Die Platte wurde anschließend mit einem Photometer mit einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Aus den Werten der Standardreihe kann eine Eichkurve erstellt werden, um die Proteinkonzentration in den Proben zu ermitteln. Diese werden als Referenzwerte für die weiteren Messungen im TR FRET verwendet.

Tabelle 19 Standardreihe Bradford Assay

	1	2	3	4	5	6	7
<b>BSA</b> (1	0 µl	1 µl	2 µl	5 µl	10	15	20
<b>NG/µL)</b>					µl	µl	µl
<b>H<sub>2</sub>O Milli Q</b>	800	799	798	795	790	785	780
	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl

### 2.2.11 Herstellung der Positiv Kontrollen

Beim TR-FRET sollen die PBMC-Proben mit Proben verglichen werden, die sicher eine hohe Konzentration an ataxin-3 enthalten. Zum einen um einen Vergleichswert für die Ergebnisse zu haben, aber auch um einen Hook-Effekt auszuschließen. Wenn sich in den vorliegenden Proben mehr ataxin-3 als Antikörper, die sich an dieses binden könnten, befinden kommt es zum Hook Effekt, bei diesem würde  $\Delta F$  der Proben falsch zu niedrig ausfallen. Dafür wurden HEK Zellen mit 15 Q und 62 Q Vektoren transfiziert und aus diesen Homogenate hergestellt.

Zur Herstellung von Positiv Kontrollen mit einem CAG-Repeat von jeweils 15 Q und 62Q wurden Plasmid Glycerol Stocks mit Ampicillin Resistenz verwendet. Zur Aufreinigung der Plasmide wird das HiSpeed Plasmid Purifikation Midi Kit der Firma Qiagen verwendet.

Zunächst wurden autoklavierte Erlenmeyer Kolben mit je 100 ml LB Medium, 100 µl Ampicillins und 100µl 15Q ataxin-3 Plasmid oder 62 Q ataxin-3 Plasmid befüllt und bei 37 ° C über Nacht inkubiert. Dem Handbuch entsprechend wurde weiter verfahren bis die Plasmide isoliert vorliegen. Die Konzentration der Plasmide wird mithilfe eines Photometers bestimmt, diese wurde für die Berechnung der für die Transfizieren der Zellen nötige Konzentration benötigt.

Die HEK T293 wurden mit Trypsin vom Boden ihrer Zellkulturflasche gelöst und neues Medium in die Flasche gegeben. Mit einer Neubauer Zählkammer wurde die Konzentration an Zellen im Medium aus einer 50 µl Probe des Zell-Medium Suspension bestimmt. In einer 6 Wells Platte wurden pro well auf 2 ml Medium 400 000 HEK Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen jeweils mit dem 15 Q Vektor oder dem 62 Q Vektor transfiziert .Dafür wurden pro Vektor jeweils 3 1,5 ml Reaktionsgefäße beschriftet und mit jeweils 100 µl Optimen befüllt .Es wurde die vorher für den Vektor berechneten Konzentration der Vektor Plasmide dazu pipettiert. Danach wurde in jedes Reaktion Gefäß 4,5 µl Attractene als Transfektion Reagenz pipettiert und durch wiederholtes Pipettieren vermischt und 15 Minuten unter der Bench bei Raumtemperatur inkubiert.

Während das DNA-Attractant-Optimen Gemisch inkubierte, wurde das Medium der 6-well Platte abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

Pro well wurden 115 µl des Tranfizierungs Reagenz pipettiert, dabei wurde die Platte geschwenkt, um das Attractne gleichmäßig zu verteilen, da dies, wenn nur an einer Stelle aufgetragen wird, die HEK Zellen schädigen kann. Nach 2 Tagen im Inkubator wurden transfizierten HEK Zellen abgeerntet und in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Sie wurden für 5 Minuten bei 500 gpm zentrifugiert. Danach wurde das Medium vom Zellpellet abpipettiert und mit 500 µl PBS gewaschen und dann erneut für 5 Minuten bei 500 gpm zentrifugiert. Das PBS wurde abgesaugt und das Reaktionsgefäß mit dem Zellpellet danach sofort auf Eis gestellt. Es wurde 30 µl des Lyse-Puffers dazu pipettiert und durch wiederholtes pipettiert miteinander vermischt. Nun wurden die Homogenate eine halbe Stunde lang alle 10 Minuten gevortext. Für die 15 Q und 62 Q Homogenate wurden Bradford Assays angefertigt. Als Positiv Kontrollen verwendet wurden jeweils eine 1:5 Verdünnung der Homogenate in einem 1:8 Verhältnis mit PBS und Complete.

## 2.2.12 TR FRET

Time Resolved Fluorescent Energy Transfer (TR-FRET) ist eine hoch sensitive Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Sie wurde im Rahmen dieser Promotion an PBMC von Patienten der ESMI Kohorte durchgeführt. Die Funktionsweise des Assays beruht auf der Bedingung zweier für ataxin-3 spezifischen Antikörper, die durch die Firma „Cisbio Bioassays“ Floreszenz markiert wurden, an einem ataxin-3 Protein. Dabei kommt es zu einem Energietransfer von Donor (Terbiumkryptat) auf Akzeptor-Fluorophor(D2-Fluorophpne), wenn sie in der Nähe (5-9 nm) binden und der Donor angeregt wird.

Die dabei freigesetzte Energie wird durch einen Laser detektiert und korreliert mit der in der Probe enthaltenen Proteinkonzentration. Der Donor sendet ein längeres Fluorsenzsignal mit 615 nm Wellenlänge aus. Der Akzeptor ,ohne Energietransfer des Donor, sendet nur ein kurzes Signal aus. Nach Energieübertragung durch den Donor sendet der Akzeptor ebenfalls ein längeres Signal von 665 nm aus. Die Messung wird zweimal mit einem Laser mit einer Intensität von 665 nm ( hier Channel 2) und 615 nm (hier Channel 1) durchgeführt um das Signal des Donor und des Akzeptors zu erfassen (Cui et al. 2014).Es wurden bisher 3 verschiedene Assays zur Quantifizierung von ataxin-3 in der Arbeitsgruppe verwendet : Zum einen Assay zur Bestimmung des full length ataxin-3 (1H9 D2 und n term Tb) und zum anderen 2 verschiedene Assays für das expandierte ataxin-3 (MW1 und 1H9tb ;1C2 D2 und 1H9 Tb) (Gonsior et al., 2021).Im Rahmen dieser Promotion wurde hauptsächlich zur Bestimmung des full length Proteins (expandiertes und Physiologisches ataxin-3) mit der Kombination des 1H9 D2 Antikörpers und n-term Tb Antikörpers gearbeitet, die bereits bei Gonsior et al. 2020 etabliert wurde. Abbildung 2.8 zeigt die Bindungsdomänen der Antikörper n-term und 1H9 am ataxin-3 Protein. Die Messung erfolgt mit 100  $\mu$ s Verzögerung, da das kurze Signal der Akzeptors vor Energietransfer und Hintergrundsignale sonst die Messung verfälschen würden (Gonsior et al.). Die Messung selbst dauert 300  $\mu$ s.

Die vorher lysierten PBMC Proben werden im Verhältnis 1:8 mit PBS +40% Complete verdünnt. Die vorher aus transfizierten HEK Zellen mit 15 Q und 62 Q Proteine gewonnen Homogenate wurden 1:16 im selben Puffer verdünnt zur Überprüfung des HOOK Effekt. Als Negativkontrolle dienen 2-6 PBS Kontrollen. Es werden jeweils 5 µl der Probe in ein well einer 384er-well-Platte (PerkinElmer ProxiPlate-384 Plus) pipettiert.

Die Proben werden immer im Duplikat pipettiert, um nach der Durchführung aus den Ergebnissen den Pipettiere Fehler berechnen zu können. Proben die eine Differenz von über 10 % in ihren Ergebnissen zeigen werden wiederholt.

Es wurde ein MasterMix mit beiden Antikörpern vorbereitet. Der Antikörper-Stock wurde immer auf Eis aufgetaut, dabei wurde der Stock nie ganz aufgebaut. Der Antikörper wurde bei -80 C gelagert.

Das full-length ataxin-3 wurde durch die Antikörper Kombination n-term TB und 1H9 D2 gemessen. Dabei sollten pro µl je 0,5 ng n-term Tb sowie 10 ng 1H9 D2 verwendet werden. Diese zu verwenden Menge Antikörper wird für die Stock-Konzentration sowie für die gebrauchte Menge an Master Mix berechnet. Der vorbereitete und bei -20 C gelagerte Detektion Buffer wurde auf Eis aufgetaut und in ein beschriftetes UV-Tube pipettiert. Da die Antikörper fluoreszenzmarkiert sind ist es notwendig den MasterMix in einem UV-Tube zu pipettieren und zu lagern. Danach wurden die Antikörper zum Detektion Buffer pipettiert. Zum Pipettieren des MasterMix und der Proben werden gesonderte Pipettierten verwendet die in der Arbeitsgruppe ausschließlich für den TR-FRET verwendet wurden. Es wird in jedes Well das eine Probe enthält 1 µl MasterMix pipettiert. Wurden mehr als 20 Proben auf einer Platte pipettiert wurde auf Eis pipettiert, um zu verhindern, dass es durch die längere Inkubation der Antikörper bei Raumtemperatur der zuerst pipettiert Proben im vergleich zu den zu letzten pipettierten Proben zu relevanten Unterschieden bei der Messung kommt.

Direkt nach auftragen den MasterMix erfolgte die erste Messung der Platte mit dem TR-FRET Gerät (PerkinElmer Envision) um sicherzustellen, dass in alle Wells, in die eine Probe aufgetragen wurde, auch MasterMix aufgetragen

wurden. War dies nicht der Fall wurde MasterMix nach pipettiert und erneut gemessen. Im Anschluss an die erste Messung wurde die Platte mit Alufolie abgedeckt und für 24 h bei -4 Grad inkubiert. Nach 24 h Erfolgte dann die zweite Messung.

*Tabelle 20 Einstellungen des TR-FRET Geräts:*

<b>NAME</b>	<b>TR-FRET MIT LASER UNIT</b>
<b>PLATTENTYP</b>	Copy of 384 ProxiPlate
<b>GREIFER</b>	Benutz einheitliche Greifhöhe
<b>GREIFHÖHE</b>	2.5 Benutzt einheitliche Messhöhe
<b>MESSHÖHE</b>	6.5
<b>MESSMODUS</b>	Nach Reihe, Zwei Richtungen
<b>PLATTENANZAHL</b>	Festgelegt

*Tabelle 21 Einstellungen der TR FRET Laser Unit*

<b>NAME</b>	<b>COPY OF HOMOGENEOUS TRF LASER</b>
<b>SPIEGEL:</b>	
SPIEGEL MODUL NAME	LANCE/DELFLIA Bias
<b>FILTER:</b>	
<b>EXCITATION FILTER NAME</b>	UV2 (TRF) 320
<b>EMISSION FILTER NAME</b>	Europium 615
<b>2TER EMISSION FILTER NAME</b>	APC 665

Tabelle 22 Stockangabe der Antikörper

FULL-LENGTH ATAXIN-3	ANTIKÖRPER	MARKIERUNG	STOCKKONZENTRATION	EINGESETZTE ANTIKÖRPER MENGE
	n-term	Tb	161 µl/ml	0,5 ng
	1H9	D2	167 µl/ml	10 ng

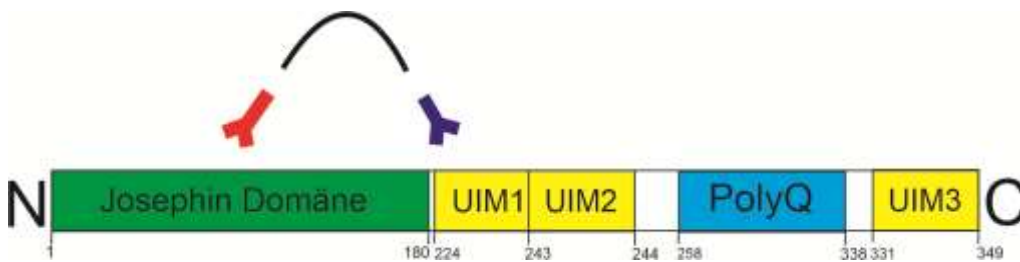


Abbildung 2.8.: Schematische Darstellung des Ataxin-3 Proteins mit Bindungsdomäne der Antikörper 1H9 D2 (lila) und n-term Tb (rot). Der n-term 1H9 Assay misst sowohl, dass physiologische als auch das expandierte Ataxin-3, da beide Antikörper außerhalb des PolyQ-Abschnittes binden, N-term bindet innerhalb der hochkonservierten Josephin Domäne und 1H9 im UIM1. (Gonsior et al.)

Die Auswertung erfolgte mittels einen Excel Sheets: Zunächst wird aus den Rohdaten das Verhältnis aus Channel 2 (665 nm) und Channel 1 (615 nm) berechnet.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Channel 2 (665nm)}}{\text{Channel 1 (615 nm)}}$$

Von diesem Ergebnis wird der Mittelwert der Negativ-Proben subtrahiert, um das Hintergrundsignal aus der Messung rauszurechnen.

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

Dieser Wert wird dann durch das Vorher mit einem Bradford Assay bestimmte in der Probe enthaltene Proteinkonzentration geteilt.

Der Mittelwert der Duplikate wird als Messergebnisse der Probe angegeben und weiterverwendet.

$$\Delta F = \frac{Ratio - Ratio(Negativprobe)}{Proteinkonzentration}$$

### **2.2.13 Statistische Methoden**

Alle statistischen Auswertungen wurden mit Graph Pad Prism 8 durchgeführt. Zunächst wurden die vorliegenden Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung getestet. Für einen nicht normal verteilten Datensatz wurde die Korrelation Spearman r durchgeführt, für einen normal verteilten Datensatz der Pearson Test.

Danach wurde jeweils auf eine lineare Korrelation getestet. Für den Varianztest von 3 oder mehr Gruppen eines Datensatzes, bei denen der Einfluss einer unabhängigen Variablen überprüft werden sollte wurde bei Normalverteilung eine One Way ANOVA durchgeführt bei nicht Normalverteilung ein Kruskal-Wallis Test.

Für die deskriptive Statistik wurde bei nicht normalverteilten Proben der Median und der Interquartilenabstand, also die 25 und 75 Perzentile bestimmt. Die Einteilung der Signifikanz wurde  $p \leq 0,05$  als signifikant,  $p \leq 0,01$  als deutlich signifikant (\*\*) und  $p \leq 0,001$  als hoch signifikant (\*\*\*) als signifikant definiert.

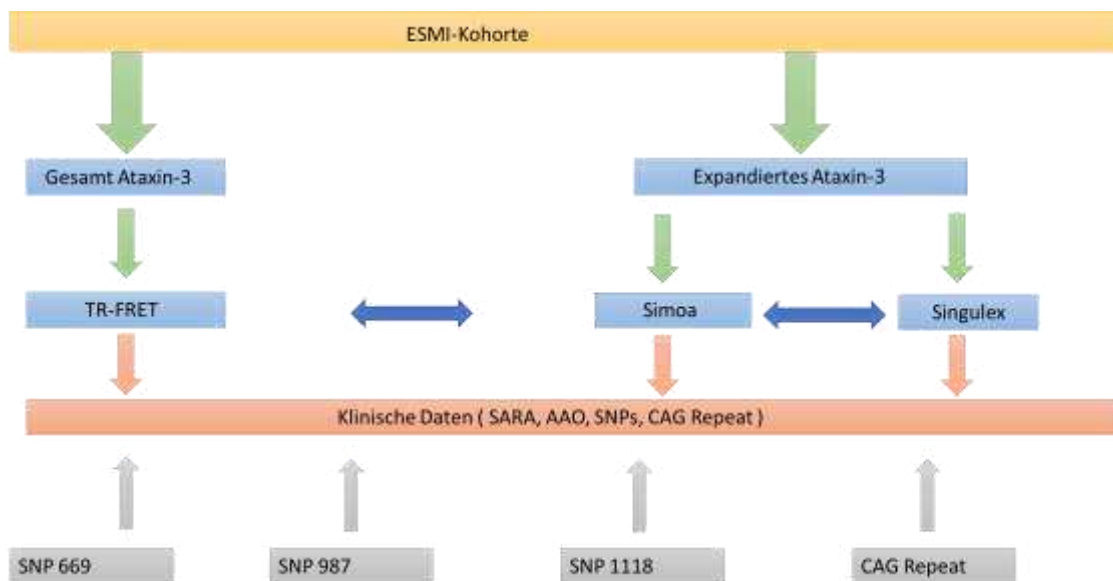
### 3 Ergebnisse

Die SCA3 ist eine autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Krankheit, die durch eine progressive Ataxie gekennzeichnet ist. Charakteristisch für die Erkrankung ist die Produktion von PolyQ-expandiertem Ataxin-3 Protein und Aggregation des Proteins vor allem in Pons, Kleinhirn und Hirnstamm, Basalganglien, Hirnnerven sowie Rückenmark (Durr et al 1996). Das lösliche expandierte Ataxin-3 Protein wurde bereits als potenzieller Marker für die Diagnostik und Progression für die SCA3 etabliert. Im Rahmen der europäischen ESMI-Studie wurde hochstandardisiert Biomaterial von SCA3-Mutationsträgern und gesunden Kontrollen an verschiedenen Standorten in Deutschland, Niederlande, UK und Portugal gewonnen (Santana et al., 2023). Zur Beschreibung der Krankheitsprogression ist der bislang verwendete SARA Score als klinischer Parameter eher subjektiv und eher langfristig beobachtbar, was dazu führt, dass viele Patienten für einen Studienarm benötigt werden, um einen signifikanten Effekt auf die Krankheitsaktivität zu zeigen. Ataxin-3 als Marker auf molekularer Ebene bietet die Möglichkeit, objektiver und genauer die Wirkung von Therapiestudien zu untersuchen mit weniger Patienten. Die für eine Studie benötigte Patientenanzahl ist hochrelevant, da SCA3 eine sehr seltene Erkrankung ist. Es ist also wichtig, die sensitivste Methode für die Messung der Ataxin-3-Proteinkonzentration im Krankheitsverlauf in verschiedenen biologischen Proben zu bestimmen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 3 unterschiedliche Methoden zur Messung des Ataxin-3 Proteins an 2 unterschiedlichen Biomaterialien verglichen. Der bereits von Gonsior et al., 2020 publizierte TR-FRET- Immunoassay wurde in dieser Arbeit an PBMCs ausgeführt. Der Simoa Assay (durch das NMI Reutlingen durchgeführt) und der Singulex Assay (durch die Firma Evotec durchgeführt) wurde an Plasma durchgeführt. Der TR-FRET Assay, der für diese Arbeit verwendet wurde, misst das *full-length* Ataxin-3 bzw. Gesamt Ataxin-3 (expandiertes und physiologisches Ataxin-3), während der Simoa Assay und der Singulex Assay spezifisch das expandierte Ataxin-3 messen. Die gemessenen

Proteinkonzentrationen wurden anschließend mit klinischen Daten wie dem SARA Score, dem INAS Score und dem *Age of Onset* (AAO) korreliert.

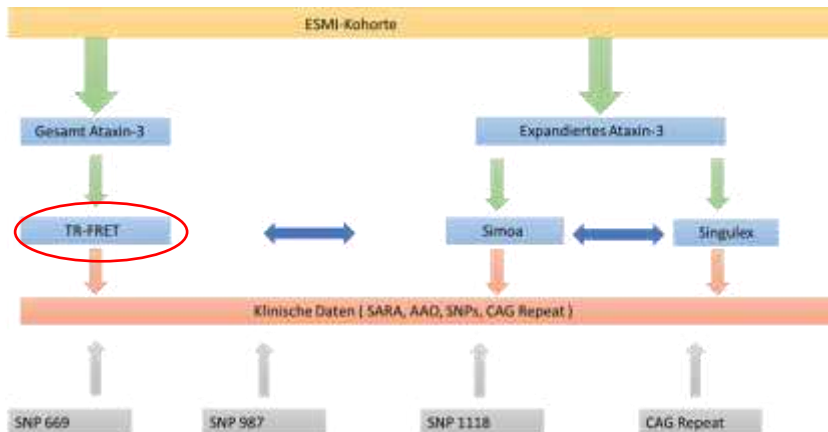
Ziel dieser Promotion ist der Vergleich der unterschiedlichen Assays und Biomaterialien. Eine weitere Fragestellung, die in dieser Doktorarbeit bearbeitet werden soll, ist die Dynamik der Proteinkonzentration von Ataxin-3 im Krankheitsverlauf. Dafür wurden longitudinal klinische Daten erhoben und Biomaterialien von Probanden der ESMI-Kohorte standardisiert aufgearbeitet. Die Auswertung der Biomaterialien erfolgte jeweils mit den 3 sensitiven Immun-Assays TR-FRET, Simoa und Singulex. Im Rahmen dieser Promotion wurde ebenfalls aus EDTA-Vollblut DNA isoliert und die Anzahl der CAG-Repeat sowie die SNPs 669, 987 und 1118 in *ATXN3* bestimmt und ebenfalls mit den vorhandenen klinischen Daten korreliert. Eine Übersicht über den Aufbau einschließlich der verwendeten Techniken ist schematisch in Abb. 3.1 dargestellt.



**Abbildung 3.1: Darstellung der Arbeitsschritte dieser Promotion in einem Flussdiagramm:** Es wurde das Ataxin-3-Proteinlevel mit dem TR-FRET Assay, dem Simoa Assay und dem Singulex Assay bestimmt. Der TR-FRET Assay wurde an PBMCs angewendet, der Simoa und der Singulex Assay an Plasma-Proben. Der Simoa und Singulex Assay sind beide ebenfalls an CSF etabliert, dieses Biomaterial wurde aber im Rahmen dieser Promotion nicht untersucht. Die Ergebnisse der Proteinlevel-Analyse wurde mit klinischen Daten wie dem AAO oder SARA Score korreliert. Ziel ist es, Ataxin-3 als Biomarker für die Krankheitsprogression und im weiteren Verlauf auch für die Quantifizierung des Therapieerfolgs zu etablieren.

### 3.1 Full-length Ataxin-3 mit TR-FRET

Für diese Promotion wurden 3 verschiedene Assays zur Messung des Ataxin-3 verwendet. Der erste Assay, der hier dargestellt werden soll, ist der TR-FRET Assay zur Messung des full-length Ataxin-3. Die Abbildung 3.2 veranschaulicht und strukturiert den Ablauf der Auswertung und ordnet das Kapital in den Ergebnisteil ein.



**Abbildung 3.2 Darstellung der Arbeitsschritte der Promotion:** Im kommenden Abschnitt wird der Teil des Arbeitsprozesses behandelt, der unter TR-FRET im Flussdiagramm vermerkt ist.

#### 3.1.1 Kohortenanalyse

Für die Baseline-Kohorte wurden 243 ESMI-Probanden mit dem TR-FRET Assay untersucht. Davon waren 70 Kontrollen ohne verlängerte CAG-Wiederholungszahl in *ATXN3*, 31 waren prä-ataktische Merkmalsträger (SARA kleiner 3) und 142 ataktische Merkmalsträger. Demografische Daten der in diesem Teil analysierten ESMI-Probanden ist in Tabelle 23 dargestellt. Zur Charakterisierung der untersuchten klinischen Daten wurde für die deskriptive Statistik der Median und der Interquartilenabstand verwendet (Tabelle 23).

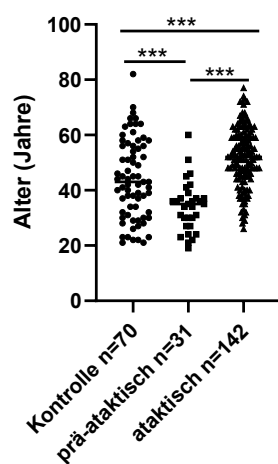
Die 70 Kontrollen haben im Median ein Alter von 43 Jahren (IQA: 31,75-56). Am jüngsten sind, wie zu erwarten war, die prä-ataktischen Probanden mit einem medianen Alter von 35 Jahren (IQA: 27-37), diese sind damit sowohl signifikant jünger (*One-Way Anova*) als die Kontrollprobanden ( $p=0,002$ ) als auch die ataktischen Mutationsträger ( $p\leq 0,001$ ) wie in Abbildung 3.3 A dargestellt.

Tabelle 23 Kohortenanalyse der mit dem TR-FRET Assay untersuchten Probanden mit Median und Interquartilenabstand.

TR-FRET	KONTROLLE	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL (ANTEIL WEIBLICH)</b>	70 (55,7 %)	31 (58,1 %)	142 (49 %)
<b>ALTER</b>	43 (31,75-56)	35 (27-37)	52 (46-60)
<b>AAO</b>	-	-	40 (34-47)
<b>CAG- WIEDERHOLUNGEN IM EXPANDIERTEN ALLEL</b>	-	69 (65-71)	69 (67-71)
<b>SARA</b>	0 (0-1)	1 (0,5-2)	11,5 (3-20,63)
<b>INAS</b>	1 (0-1)	1 (0-2)	5 (3-7)

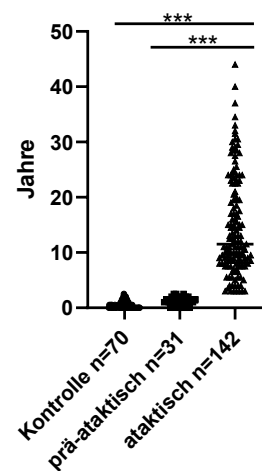
**A**

Alter der Baseline Kohorte



**B**

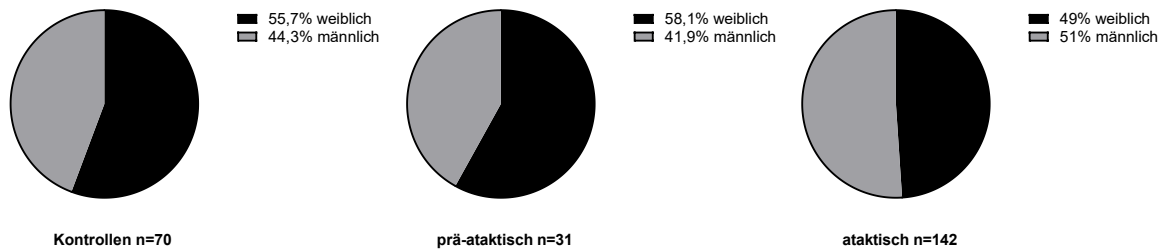
SARA der Baseline Kohorte



**Abbildung 3.3 A Alter der Baseline Kohorte:** Die prä-ataktischen Mutationsträger sind statistisch signifikant jünger (One-Way Anova) als die Kontrollprobanden und die ataktischen Mutationsträger. Die ataktischen Mutationsträger sind mit einem durchschnittlichen Alter von 51 Jahren statistisch signifikant älter als die Kontrollprobanden und die prä-ataktischen Mutationsträger. **B SARA der Baseline Kohorte:** Der SARA Score in der ataktischen Gruppe ist statistisch signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe und der prä-ataktischen Gruppe (Kruskal-Wallis-Test).

Da es sich bei SCA3 um eine Erkrankung handelt, die sowohl Männer als auch Frauen betrifft, wurde die Geschlechterverteilung der Probanden analysiert. Von den Kontrollprobanden waren 39 weiblich, die Kontrollprobanden haben also einen Frauenanteil von 55,7%. In der Gruppe der prä-ataktischen

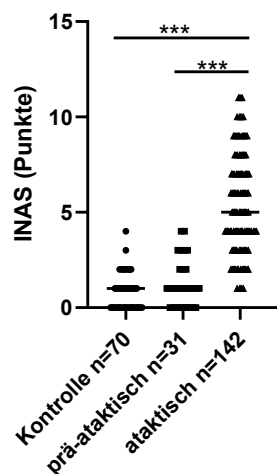
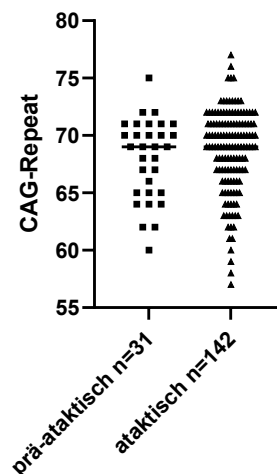
Mutationsträger war der Frauenanteil mit 58,1% geringfügig höher. Von den 31 prä-ataktischen Probanden sind 18 weiblich. Von den 142 ataktischen Mutationsträgern sind 70 weiblich, diese Gruppe hat mit 49% im Vergleich den niedrigsten Frauenanteil (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4: Geschlechterverteilung der Baseline Kohorte der TR-FRET-Gruppe:** Den höchsten Frauenanteil hat die prä-ataktische Gruppe mit 58,1 %. Die Kontroll-Gruppe hat einen Frauenanteil von 55,7 % und die ataktische Gruppe einen Frauenanteil von 49 %. Dargestellt wurde die Geschlechterverteilung mithilfe eines Tortendiagramms.

Betrachtet man den klinischen Score SARA, welcher eine Gesamtpunktzahl von 0 (keine Symptome) bis 40 Punkten (schwerste Ausprägung) abbildet, so werden Werte  $\leq 3$  Punkten als nicht ataktisch definiert, Werte von 3-12 als leicht ataktisch, Werte von 13-24 als moderat ataktisch und Werte von  $\geq 25$  als schwer ataktisch. In der Gruppe der ataktischen Probanden waren die Probanden im Durchschnitt im Alter von 40 Jahren (IQA: 34-47) ataktisch geworden (definiert mit einem SARA von 3 und größer). Das Alter, in dem die Probanden erstmals ataktisch werden, wird als *Age of Onset* (AAO) bezeichnet. Es gab in der Gruppe der ataktischen Probanden 3 Probanden, die vor ihrem 20. Lebensjahr jeweils mit 15, 16 und 18 bereits erste Krankheitssymptome zeigten. Den höchsten SARA Score hat demnach in der Kohorte die ataktische Gruppe mit einem durchschnittlichen SARA Score von 11,5 Punkten (IQA: 3-20,63). Der Proband in der Kohorte mit dem höchsten SARA Score (40 Punkte) war seit 15 Jahren symptomatisch mit einem AAO von 40 Jahren. Der weite Interquartilenabstand spricht dafür, dass in der Kohorte Probanden in vielfältigen Stadien ihrer Erkrankung vorhanden sind. Die prä-ataktischen Probanden haben im Durchschnitt einen SARA Score von 1 Punkt mit einem Interquartilenabstand von

0,5-2 Punkten. Die Kontrollprobanden haben im Durchschnitt einen SARA Score von 0 Punkten (IQA: 0-1). Die Gruppe der ataktischen Probanden hat also einen statistisch signifikant höheren SARA Score als die Kontrollen ( $p \leq 0,0001$ ) und die prä-ataktischen Mutationsträger ( $p \leq 0,0001$ ) (Kruskal-Wallis Test, siehe Abbildung 4.3 B). Ergänzend zum SARA Score wurde der INAS Score erhoben, der die nicht-ataktischen Symptome der SCA3 misst, wie z.B Doppelbilder und Störungen der Augenmotorik. Die Kontrollen hatte im Median einen INAS Score von 1 Punkt mit einem Interquartilenabstand von 0-1 Punkten. Die Gruppe der prä-ataktischen Probanden hat ebenfalls einen INAS Score von 1 Punkt, aber mit einem Interquartilenabstand von 0-2 Punkten. Die Gruppe der ataktischen Mutationsträger zeigte einen statistisch signifikant höheren INAS Score als die Kontroll-Gruppe ( $p \leq 0,0001$ ) und der prä-ataktischen Gruppe ( $p \leq 0,0001$ ) (Kruskal-Wallis Test). Der Median des INAS Score der ataktischen Gruppe ist 5 mit einem Interquartilenabstand von 3-7 (Abbildung 3.5 A). Der maximale INAS Score in der vorliegenden Kohorte betrug 11 Punkte. Der Proband mit dem höchsten SARA Score (40) in der Kohorte hatte einen INAS Score von 7, war also auch zusätzlich zu den ataktischen Symptomen weitergehend neurologisch auffällig und lag über dem Median der ataktischen Gruppe.

**A****INAS der Baseline Kohorte****B****CAG-Repeat der Baseline Kohorte**

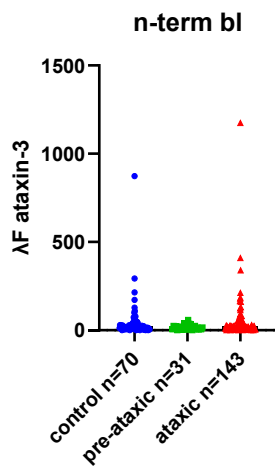
**Abbildung 3.5: A INAS der Baseline Kohorte:** Der INAS Score der ataktischen Probanden ist statistisch signifikant höher als der INAS Score der Kontroll-Gruppe und der prä-ataktischen Mutationsträger (Kruskal-Wallis Test). **B CAG-Repeat des expandierten Allels der Baseline Kohorte:** Die CAG-Repeats des expandierten Allels der prä-ataktischen und der ataktischen Gruppe unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander (Mann-Whitney Test).

Die Anzahl an CAG-Repeats für das PolyQ-expandierte Allel des *ATXN3* Gens wurde in der Kohorte der Mutationsträger untersucht. In der Gruppe der prä-ataktischen Mutationsträger wies das expandierte Allel im Median 69 CAG-Repeats auf, mit einem Interquartilenabstand von 65-71. In der Gruppe der ataktischen Mutationsträger lag der Median für die CAG-Repeats ebenfalls bei 69 CAG-Repeats, mit einem Interquartilenabstand von 67-71 (Abbildung 3.5 B). Die CAG-Repeats der beiden Gruppen sind demnach also vergleichbar, auch der durchgeführte Mann-Whitney Test war nicht signifikant ( $p=0,2822$ ).

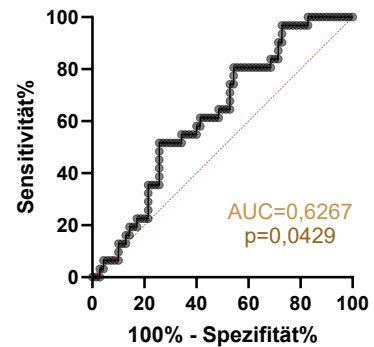
### 3.1.2 Statistische Analyse der Ataxin-3 Proteinlevel und klinischen Parameter

Die vorliegende Baselinekohorte wurde mit dem TR-FRET Assay mit der Antikörerkombination ATXN3 n-Term-Tb und ATXN3 Klon 1H9-D2 untersucht,

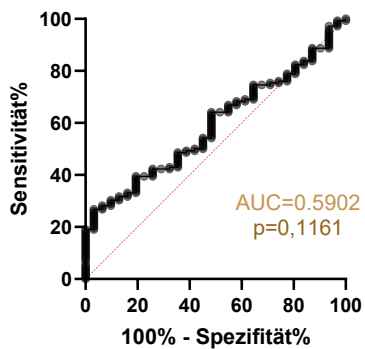
dabei wurde das *full-length* Ataxin-3 Protein gemessen, d. h. sowohl das physiologische als im Weiteren das expandierte Ataxin-3. Auf der Abbildung 3.6 A ist zu sehen, dass anhand der *full-length* Ataxin-3 Proteinkonzentration keine statistische Differenzierung zwischen ataktischen Mutationsträgern und Kontrollen als auch prä-ataktischen Mutationsträgern und Kontrollen vorgenommen werden konnte. Zunächst wurde ein Kruskal-Wallis-Test für die Ergebnisse der in den PBMCs gemessenen Konzentrationen durchgeführt, der für Kontrolle vs. ataktischen Mutationsträgern nicht signifikant war ( $p > 0,9999$ ). Auffällig war jedoch, dass in der prä-ataktischen Gruppe die Tendenz zu sehen war, dass diese Gruppe niedrigere Ataxin-3 Werte zeigte als sowohl die Kontroll-Gruppe ( $p = 0,1772$ ) wie auch die ataktische Gruppe ( $p = 0,2972$ ). Es wurden *ROC Curves* (*Receiver-Operating-Characteristics*) erstellt, um die diagnostische Güte des Assay zu bewerten. Die *Area under the curve* (Gonsior et al.), die daraus berechnet wird, steht für die Trennschärfe, mit der der Assay zwei Gruppen voneinander unterscheiden kann. Für die *ROC Curve* der beiden Kohorten Kontroll-Gruppe und prä-ataktische Probanden lag die  $AUC = 0,627$  und damit bei 62,7 % mit einem P-Wert von 0.0429 (Abbildung 3.6 B. Bei der *ROC Curve*, die die Kohorten prä-ataktischer und ataktischer Probanden vergleicht, ist die  $AUC = 0,5902$  und  $p = 0,1161$  (Abbildung 3.6 C. Die niedrigste Trennschärfe hat mit einer  $AUC = 0,5213$  und einem P-Wert von 0,6146 der Assay bei der Differenzierung der Kontroll-Gruppe von der ataktischen Gruppe (Abbildung 3.6 D.



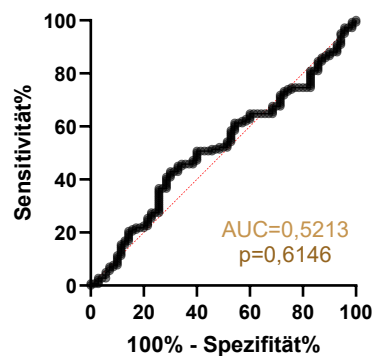
**ROC curve: Kontrolle vs prä-ataktisch**



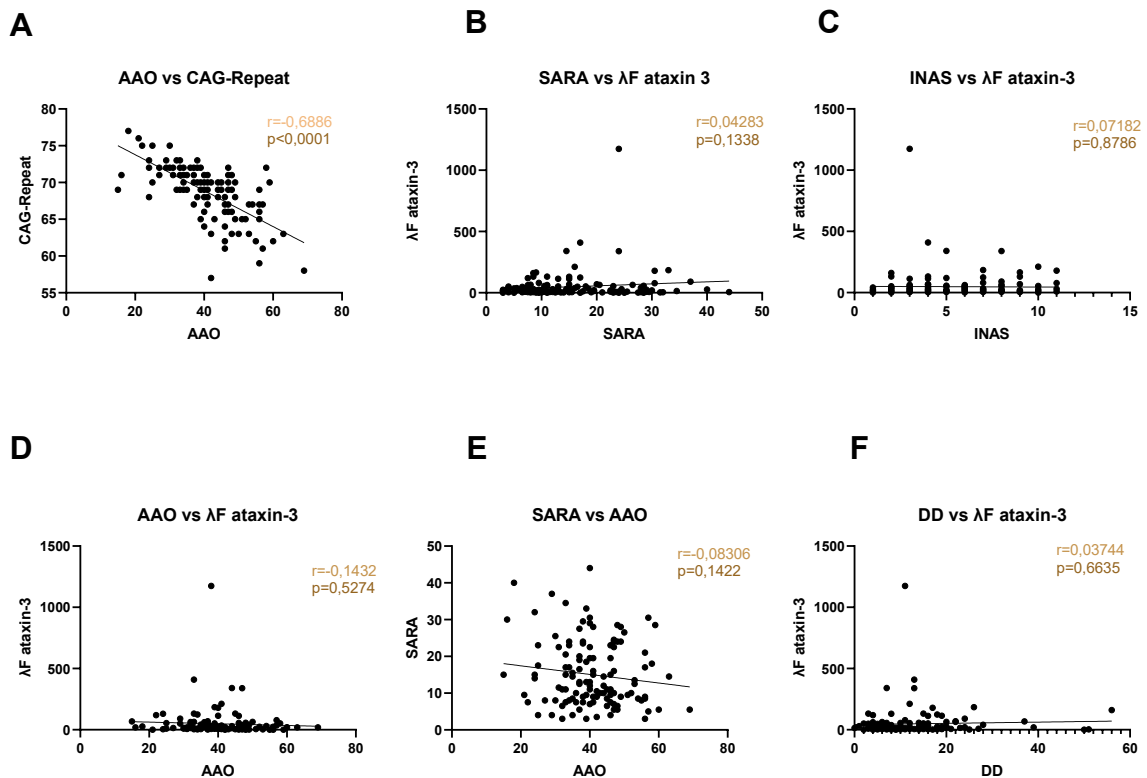
**ROC curve: prä-ataktisch vs ataktisch**



**ROC curve: Kontrolle vs ataktisch**



**Abbildung 3.6 A Vergleich der Gesamt Ataxin-3 Protein-Konzentrationen:** Die full-length-Ataxin-3-Konzentration der Kontroll Gruppe, der prä-ataktischen Gruppe und der ataktischen Gruppe der Kohorte unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis Test). **B ROC Curve Kontrolle vs. prä-ataktische Gruppe:** Die Trennschärfe des Assays für die Unterscheidung der beiden Gruppen liegt bei einer AUC=0,6267. **C ROC Curve prä-ataktisch vs. ataktisch:** Die Trennschärfe des Assays für die Unterscheidung der beiden Gruppen liegt bei einer AUC =0,5902. **D ROC Curve Kontrollen vs. ataktisch:** Die Trennschärfe des Assays für die Unterscheidung der beiden Gruppen liegt bei AUC=0,5213.



**Abbildung 3.7:** **A AAO vs. CAG Repeat:** Das AAO und die Anzahl der CAG Repeats zeigen einen statistisch signifikanten Zusammenhang ( $p < 0,0001$ ). **B SARA vs.  $\Delta F$  Ataxin-3** der SARA Score der ataktischen Probanden und die full-length Ataxin-3 Konzentration zeigen in der linearen Regression keinen signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,1338$ ). **C INAS vs.  $\Delta F$  Ataxin-3:** Der INAS Score der ataktischen Probanden und die full-length Ataxin-3 Konzentration zeigen in der linearen Regression keinen signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,5274$ ). **D AAO vs.  $\Delta F$  Ataxin-3:** Das AAO und die full-length Ataxin-3 Konzentration zeigen keinen signifikanten statistischen Zusammenhang ( $p = 0,5274$ ). **E SARA vs. AAO:** Der SARA Score und der AAO zeigen statistisch keinen signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,1422$ ). **F DD vs.  $\Delta F$  Ataxin-3:** Die Erkrankungsdauer (Disease Duration) und die full-length Ataxin-3 Proteinkonzentration zeigen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,6635$ ).

Im Nachfolgenden wurde die gemessenen Ataxin-3 Proteinlevel in  $\Delta F$  mit den im Rahmen der ESMI Kohorte erhobenen klinischen Daten korreliert und zeigen die im folgenden dargestellten Ergebnisse (Abb. 3.7).

### Signifikante Korrelation des AAO mit dem CAG-Repeat

Bei der Untersuchung der vorliegenden Kohorte mit dem Shapiro-Wilks-Test lag keine Normalverteilung vor ( $p = 0,0002$ ). Es wurde eine lineare Regression durchgeführt, um den bereits bekannten Zusammenhang zwischen der AAO und der CAG-Repeatlänge in der ESMI-Kohorte zu analysieren; diese war statistisch

signifikant ( $p < 0,0001$ ). Der Korrelationskoeffizient nach Spearman lag bei  $r = -0,6886$ , ein größerer CAG-Repeat ist demnach mit einem früheren AAO korreliert (Abbildung 3.7 A).

### **Keine signifikante Korrelation des Ataxin-3-Proteinlevels mit dem SARA Score**

Bei der Untersuchung der vorliegenden Kohorte mit dem Shapiro-Wilks-Test lag keine Normalverteilung vor ( $p < 0,0001$ ). Es wurde eine lineare Regression durchgeführt, um zu untersuchen, ob es einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Ataxin-3 Proteinlevel und dem klinischen SARA Score gibt. Die lineare Regression war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,1138$ ). Die Korrelation zwischen dem SARA Score und dem Ataxin-3 Proteinlevels wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman getestet und es gab keinen signifikanten Zusammenhang ( $r = 0,04283$ ) (Abbildung 3.7 B).

### **Keine signifikante Korrelation des Gesamt Ataxin-3 Proteinlevels mit dem INAS Score**

Bei der Untersuchung des INAS Scores der ataktischen Probanden mit dem Shapiro-Wilks-Test lag keine Normalverteilung vor ( $p < 0,0001$ ). Es wurde eine lineare Regression durchgeführt um auf einen Zusammenhang zwischen der Gesamt Ataxin-3 Proteinkonzentration und dem INAS Score zu testen. Das Ergebnis war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,08786$ ). Die Korrelation zwischen dem INAS Score und dem Ataxin-3 Proteinlevel lag nach dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman bei  $r = 0,7182$  und war statistisch nicht signifikant (Abbildung 3.7 C)3.

### **Keine signifikante Korrelation des Gesamt Ataxin-3 Proteinlevels mit dem AAO**

Bei der Untersuchung der AAO der ataktischen Probanden mit dem Shapiro-Wilks-Test lag keine Normalverteilung vor ( $p < 0,0001$ ). Es wurde eine lineare Regression durchgeführt um den Zusammenhang zwischen der Gesamt Ataxin-3 Proteinkonzentration und dem AAO näher zu betrachten. Die Statistik war nicht signifikant ( $p = -0,1432$ ). Die Korrelation zwischen dem AAO und dem Ataxin-3-

Proteinlevel wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman getestet und war nicht signifikant ( $r=-0,1432$ ) (Abbildung 3.7 D).

### **Keine signifikante Korrelation zwischen dem SARA Score und dem AAO**

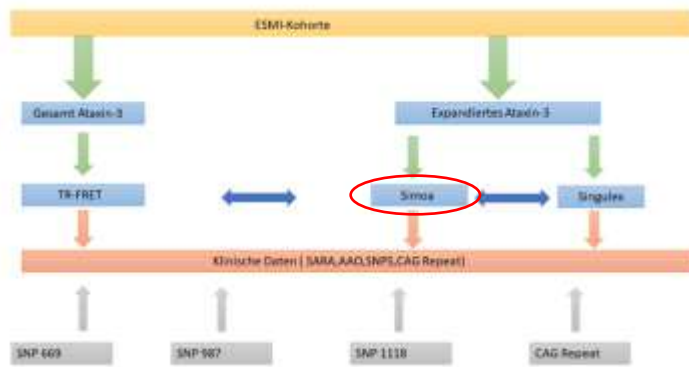
Bei der Untersuchung des SARA Scores der ataktischen Probanden mit dem Shapiro-Wilk-Test lag keine Normalverteilung vor ( $p<0,0001$ ). Es wurde eine lineare Regression durchgeführt, um auf einen statistischen Zusammenhang zwischen dem SARA Score der Probanden und dem AAO zu testen, die statistisch nicht signifikant war ( $p=0,1422$ ). Die Korrelation zwischen dem AAO und dem SARA wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman getestet und war nicht signifikant ( $r=-0,08306$ ). Jedoch war wie in Abbildung 3.7 E zu sehen, eine Tendenz zu erkennen, dass ein niedrigeres AAO mit einem höheren SARA Score, also auch einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert ist (Abbildung 3.7 E).

### **Keine signifikante Korrelation des Gesamt Ataxin-3 Proteinlevels und der Disease Duration (DD)**

Bei der Untersuchung der Kohorte der ataktischen Probanden mit dem Shapiro-Wilks-Test lag keine Normalverteilung vor ( $p<0,0001$ ). Es wurde eine lineare Regression durchgeführt, die Korrelation zwischen der Gesamt Ataxin-3 Konzentration und der Disease Duration zu untersuchen, die statistisch nicht signifikant war ( $p=0,6635$ ). Die Korrelation zwischen der *Disease Duration* und dem Ataxin-3-Proteinlevel wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman getestet und war nicht signifikant ( $r=0,03744$ ) (Abbildung 3.7 F).

## **3.2 Expandiertes Ataxin-3 im Simoa**

Als zweiter Assay soll in diesem Abschnitt nun die Messung des expandierten Ataxin-3 mit dem Simoa Assay ausgewertet werden. In Abbildung 3.3 sieht man die Struktur des Ergebnisteils.



**Abbildung 3.8 Darstellung der Arbeitsschritte der Promotion:** Im kommenden Abschnitt wird der Teil des Arbeitsprozesses behandelt, der unter Simoa im Flussdiagramm vermerkt ist.

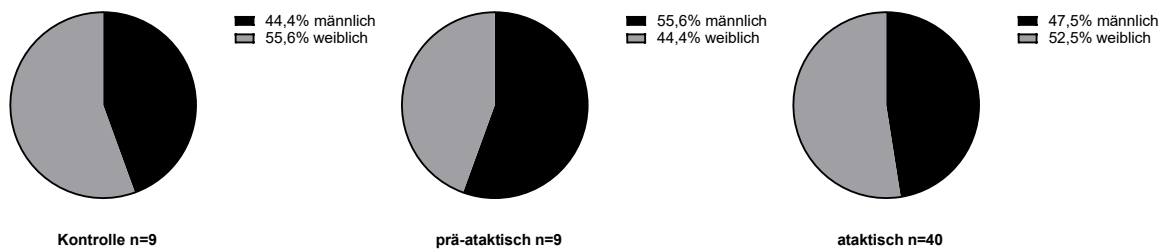
### 3.2.1 Kohortenanalyse

Mit dem Simoa Assay wurden insgesamt 58 Probanden durch das naturwissenschaftlich-mathematische Institut (NMI) Reutlingen untersucht, da uns das Gerät leider nicht zur Verfügung stand und der Assay zusammen mit dem NIM entwickelt wurde. In der Baseline Kohorte wurden 9 Kontrollen, 9 prä-ataktische Probanden und 40 ataktische Probanden untersucht. Von 2 ataktischen Probanden fehlt jedoch das AAO, weswegen hier nur 38 Datenpunkte vorhanden sind. Für die deskriptive Statistik wurden der Median und der Interquartilenabstand (IQA) verwendet (Tabelle 24).

*Tabelle 24 Kohortenanalyse der mit dem Simoa Assay untersuchten Probanden der Baseline Kohorte.*

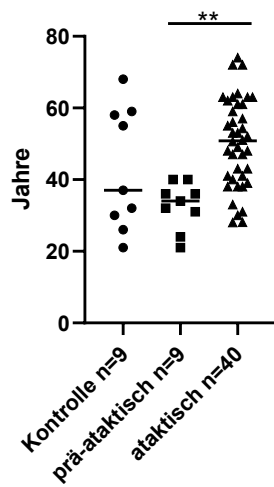
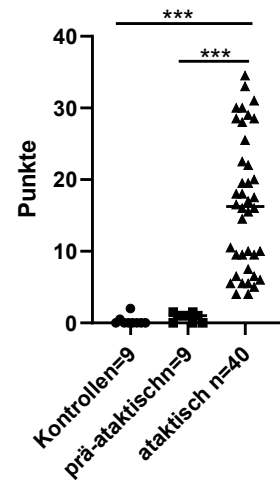
SIMOA	KONTROLLE	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL</b>	9	9	40
<b>(ANTEIL WEIBLICH)</b>	(55,6 %)	(44,4 %)	(52,5 %)
<b>ALTER</b>	37	34	50,8
	(28-58)	(27,5-38)	(40,25-61)
<b>AAO</b>	-	-	38,5
			(3,25-47,5)
<b>CAG- WIEDERHOLUNGEN IM EXPANDIERTEN ALLEL</b>	-	69	70
		(64-70,5)	(65,25-72)
<b>SARA</b>	0	1	16,25
	(0-0,25)	(0-1,25)	(8-24.75)
<b>INAS</b>	0	2	5
	(0-1)	(0.5-3,5)	(4-8)

Es wurde 9 gesunde Kontrollprobanden untersucht, davon waren 5 weiblich (55,6%). Von den prä-ataktischen Probanden waren 44,4% weiblich und von den 40 ataktischen Probanden waren 52,5% weiblichen Geschlechts, womit das Geschlechterverhältnis in allen 3 untersuchten Gruppen relativ ausgeglichen war (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9: Geschlechterverteilung in der Baseline-Kohorte in der Simoa-Gruppe: Der Anteil weiblicher Probanden liegt in der Kontroll-Gruppe bei 55,6 %, in der prä-ataktischen Gruppe bei 44,4 % und in der ataktischen Gruppe bei 52,5 %. In der Abbildung wurden die Daten als Tortendiagramm dargestellt.**

Statistisch am jüngsten sind, wie zu erwarten die prä-ataktischen Probanden mit einem mittleren Alter von 34 und einem Interquartilenabstand von 27,5-38. Etwas älter sind mit einem mittleren Alter von 37 (IQA=28-58) die Kontrollprobanden. Am ältesten sind im Durchschnitt die ataktischen Probanden mit einem Median von 50,8 (IQA=(40,25-61)) (Abbildung 3.10 A). Die Daten waren laut dem Shapiro-Wilks Test normalverteilt. Es wurde eine *one-way ANOVA* durchgeführt, die zeigte, dass die prä-ataktischen Probanden statistisch signifikant jünger sind als die ataktischen Mutationsträger ( $p=0,0011$ ) (Abbildung 3.10 A).

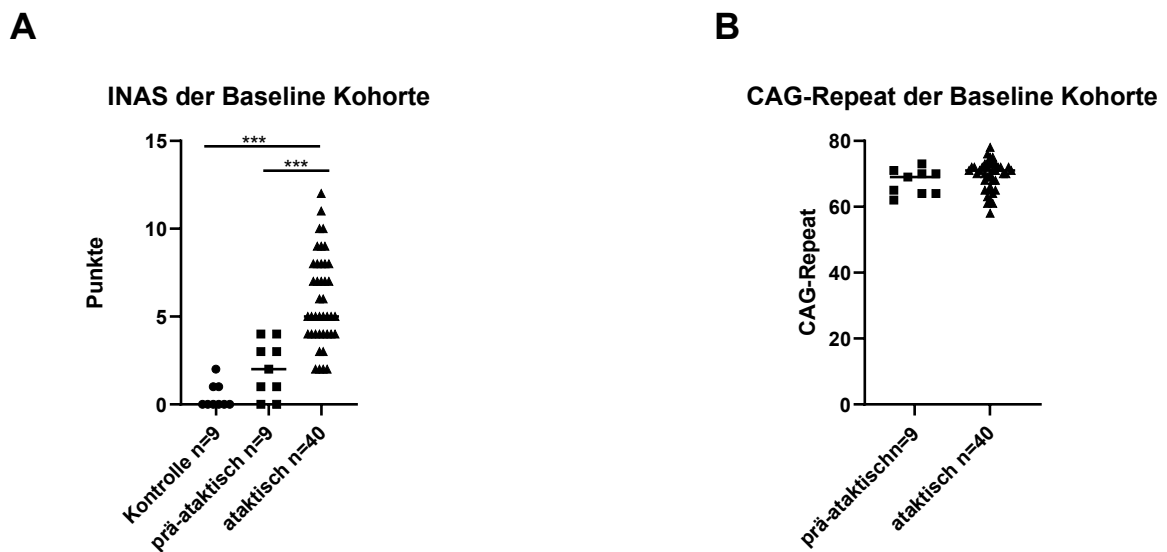
**A****Alter der Baseline Kohorte****B****SARA der Baseline Kohorte**

**Abbildung 3.10: A Alter in der Baseline Kohorte in der Simoa-Gruppe:** Statistisch signifikant am ältesten sind die Probanden der ataktischen Gruppe (Median 50,8 Jahre) und statistisch signifikant am jüngsten sind die Probanden der prä-ataktischen Altersgruppe (Median 34 Jahre). **B SARA in der Baseline Kohorte in der Simoa-Gruppe:** Die Gruppe der ataktischen Probanden hat statistisch signifikant den höchsten SARA Score (Median 16) gegenüber den niedrigeren SARA Scores der Kontrollen (Median 0) und der prä-ataktischen Probanden (Median 1).

Der höchste SARA Score wurde in der Gruppe der ataktischen Probanden gemessen. Im Median lag der SARA Score bei 16,25 mit einem Interquartilenabstand von 8-24,75. Der höchste SARA Score lag bei 34,5. Der SARA Score der prä-ataktischen Probanden lag im Mittel bei 1 (IQA=0-1,25) und bei den Kontrollprobanden bei 0 (IQA=0-0,25). Damit war der SARA Score der ataktischen Probanden signifikant höher als der SARA Score der Kontrollen und prä-ataktischen Mutationsträger (beide  $p < 0,0001$ ; Kruskal-Wallis Test). Die Daten sind nach dem Shapiro-Wilks Test nicht normalverteilt. In Abbildung 3.10 B ist die Auswertung der SARA Score Daten der Baseline Kohorte dargestellt.

Der INAS Score der ataktischen Probanden ist statistisch signifikant höher als der INAS Score der Kontrollen ( $p < 0,0001$ ) und als der prä-ataktischen Probanden ( $p = 0,0011$ ). Dies wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test getestet (Abbildung 3.11 A).

Die prä-ataktischen Probanden hatten im Median ein expandiertes Allel mit 69 CAG Repeats und einem IQA von 64 – 70,5. Das expandierte CAG-Repeat der ataktischen Probanden hatte im Median eine Länge von 70 CAG Wiederholungen (IQA=65,25-72). Die Differenz zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant  $p=0,1559$ , wie mit dem Mann-Whitney Test ermittelt wurde (Abbildung 3.11 B).

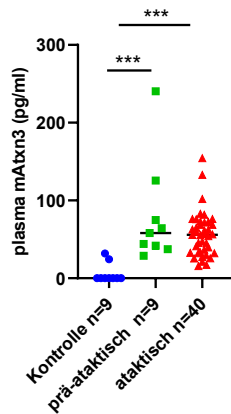


**Abbildung 3.11 A INAS Score der Baseline Kohorte der mit dem Simoa Assay untersuchten Probanden:** Der INAS Score der ataktischen Probanden ist statistisch signifikant höher als der INAS Score der Kontrollen und prä-ataktischen Probanden. **B expandierte CAG Repeat Länge der Baseline Kohorte der mit dem Simoa Assay untersuchten Probanden:** Die Anzahl an CAG Repeats in den expandierten Allelen der prä-ataktischen und der ataktischen Gruppe unterscheidet sich statistisch nicht signifikant voneinander (Mann-Whitney Test).

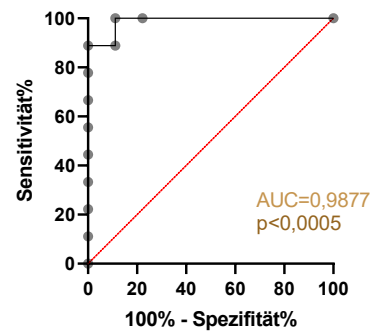
### 3.2.2 Statistische Analyse der Ataxin-3-Konzentration und der klinischen Parameter

Die 62 Probanden der beschriebenen Baseline Kohorte in Tabelle 4.2 wurden vom NMI Reutlingen mit dem Simoa Assay mit der Antikörperkombination MW1 und 1H9 untersucht. Diese Antikörperkombination analysiert spezifisch das expandierte Ataxin-3 Protein. Der MW1-Antikörper bindet dabei ab einem CAG-Repeat von 15 CAG Repeats, wobei er eine Präferenz für längere Repeats aufweist (Klein et al., 2013). Wie in Abbildung 3.12 A dargestellt ist, ist eine sehr

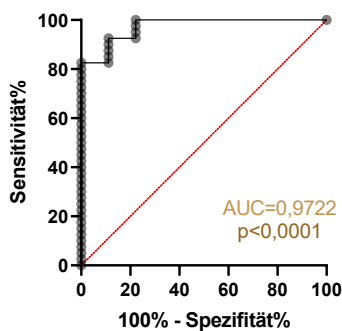
gute Differenzierung zwischen den 3 Gruppen einschließlich gesunder Kontrollen, prä-ataktischen Mutationsträgern und ataktischen SCA3 Patienten/Mutationsträgern in der Baseline Kohorte anhand der PolyQ-expandierte Ataxin-3 Proteinmengen möglich. Die Ataxin-3-Konzentration wird in pg/ml angegeben. Da in den gesunden Kontrollprobanden kein expandiertes Ataxin-3 vorkommt, hat die prä-ataktische Gruppe eine statistisch signifikant höhere Ataxin-3-Konzentration als die Kontroll-Gruppe ( $p=0,0004$ ; Kruskal-Wallis Test). Mit einem P-Wert  $<0,0001$  ist die Differenzierung zwischen Kontroll-Gruppe und ataktischer Gruppe statistisch noch signifikanter (Kruskal-Wallis Test). Zwischen den Ataxin-3-Proteinkonzentrationen der prä-ataktischen und der ataktischen Mutationsträger gibt es statistisch keinen signifikanten Unterschied ( $p>0,999$ ; Kruskal-Wallis Test). Die ROC *Curves* zeigen ebenfalls eine sehr gute Trennschärfe zwischen der Kontroll-Gruppe und der prä-ataktischen Gruppe bzw. der Kontroll-Gruppe und der ataktischen Patienten-Gruppe und eine schlechtere Trennschärfe zwischen den prä-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern. Die ROC *Curve* für die Kontrollen vs. die prä-ataktische Gruppe hat eine AUC=0,9877 mit  $p<0,0005$  (Abbildung 4.12 B). Die ROC *Curve* für die Kontrollen vs. die ataktische Gruppe hat eine AUC=0,9722 mit  $p<0,0002$  (Abbildung 3.12 C). Die ROC *Curve* für die prä-ataktische vs. die ataktische Gruppe hat eine AUC=0,5667 mit  $P=0,5355$  (Abbildung 3.12 D).

**A****B**

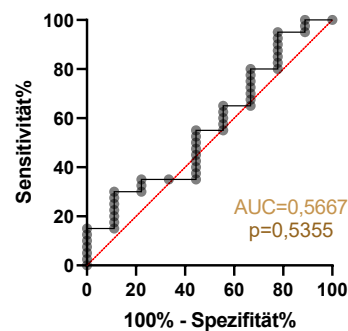
ROC curve: Kontrolle vs prä-ataktisch

**C**

ROC curve: Kontrolle vs ataktisch

**D**

ROC curve: ROC prä-ataktisch vs ataktisch



**Abbildung 3.12 A Vergleich der Ataxin-3-Proteinkonzentrationen:** Die Konzentration von expandiertem Ataxin-3 wurden in den prä-ataktischen und in der ataktischen Gruppe gemessen **B ROC Curve Kontrolle vs. prä-ataktisch:** Die ROC Curve demonstriert eine AUC=0,9877 und damit eine sehr gute Diskriminierung des Assays zwischen Kontrollen und prä-ataktischen Mutationsträgern **C ROC Curve Kontrolle vs. ataktisch:** Die ROC Curve zeigt eine AUC=0,9722 und damit eine sehr gute Differenzierung zwischen Kontrollen und ataktischen Mutationsträgern. **D ROC Curve prä-ataktisch vs. ataktisch:** Die ROC Curve zeigt eine AUC=0,5355 und somit eine deutlich schlechtere Differenzierung zwischen den prä-ataktischen und den ataktischen Probanden als zwischen den Kontrollen und den prä-ataktischen und ataktischen Probanden.

### 3.2.3 Korrelation der klinischen Daten mit der expandierte Ataxin-3 Konzentration im Plasma.

Im Anschluss erfolgte die Korrelation der Proteinkonzentration des expandierten ATXN3 mit den bekannten klinischen Parametern AAO, SARA Score und INAS Score.

Die gemessenen Konzentrationen an PolyQ-expandiertem Ataxin-3 im Plasma der ataktischen Probanden wurden mit dem SARA Score dieser Probanden

korreliert. Der Shapiro-Wilks-Test für die Daten der Ataxin-3 Konzentration zeigte keine Normalverteilung ( $p=0,0023$ ).

Es wurde eine lineare Regression durchgeführt, die statistisch nicht signifikant war ( $p=0,6320$ ). Es wurde der Korrelationseffizient nach Spearman bestimmt  $r=0,2022$  (Abbildung 3.13 A). Der Proband mit dem in dieser Kohorte höchsten gemessenen Ataxin-3 Proteinlevel von 154,33 pg/ml hatte einen SARA Score von 6. Statistisch konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem SARA Score und der expandierten Ataxin-3 Konzentration in der Simoa-Kohorte festgestellt werden.

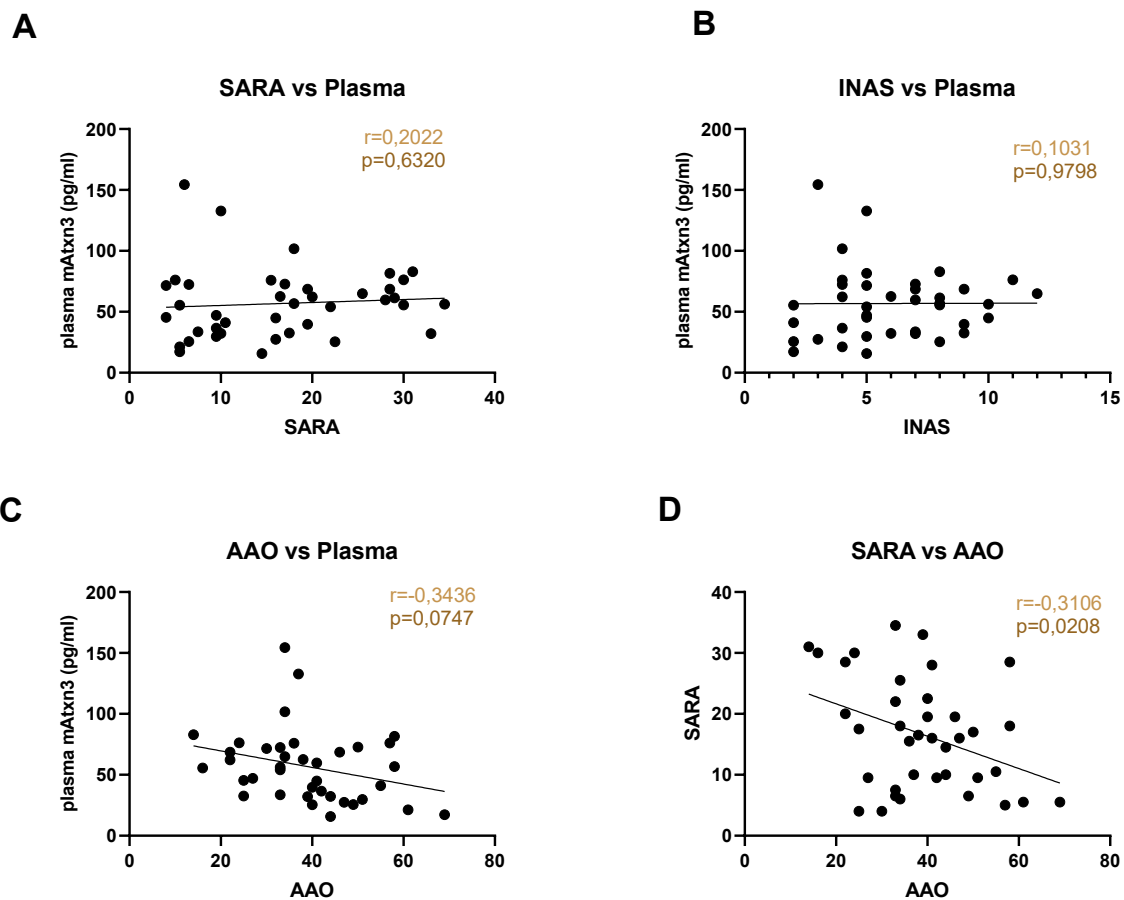
Im nächsten Schritt wurden die gemessenen Ataxin-3 Plasma Werte mit dem INAS Score der Baseline Kohorte verglichen. Der Shapiro-Wilks-Test ergab mit  $p=0,0023$  keine Normalverteilung. Darauf wurde eine lineare Regression durchgeführt, die statistisch nicht signifikant war ( $p=0,9798$ ). Der Korrelationskoeffizient Spearman  $r =0,1301$  wurde bestimmt. Sowohl aus der linearen Regression als auch aus der Korrelation war kein signifikanter Zusammenhang zwischen INAS Score und der Konzentration des expandierten Ataxin-3 in den Proben abzuleiten (Abbildung 3.13. B). Der Proband mit dem höchsten gemessenen Ataxin-3 Konzentration (154,33 ng/ml) hat einen eher niedrigen INAS Score von 3, was zusammen mit dem SARA Score von 6 auf ein gemäßigtetes klinisches Bild der SCA3 hindeutet.

Die Ataxin-3-Werte wurden mit dem Datensatz der AAO verglichen. Da lediglich von 38 und nicht von allen 40 ataktischen Patienten das AAO bekannt war, wurde in dieser Auswertung auch nur mit 38 Probanden gearbeitet. Der Shapiro-Wilks-Test ergab keine Normalverteilung ( $p= 0,0030$ ). Es wurde eine lineare Regression durchgeführt, die statistisch nicht signifikant war ( $p=0,0747$ ). Die Abbildung 4.13 C zeigt jedoch die Tendenz, dass ein früheres AAO mit einer höheren Konzentration an expandiertem Ataxin-3 verbunden ist. Der Spearman-Koeffizient liegt bei  $r=-0,3436$ .

Nun wurde das AAO im Bezug zum SARA Score betrachtet. Der Shapiro-Wilks-Test ergab eine Normalverteilung ( $p=0,9017$ ) es wurde eine lineare Regression durchgeführt, die statistisch signifikant war ( $p=0,0208$ ). Ein niedrigeres AAO war

also statistisch gesehen eindeutig mit einem höheren SARA Score korreliert. Auch hier wurden aufgrund der fehlenden Daten für das AAO nur 38 Probanden ausgewertet.

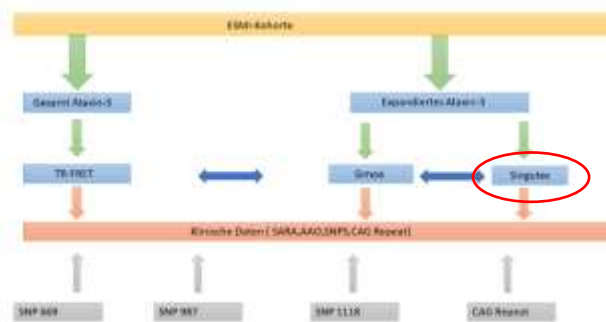
Probanden mit einem früheren AAO hatten also einen signifikant höheren SARA Score als Probanden mit einem späteren AAO. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt  $r=-0,3106$  (Abbildung 3.13 D).



**Abbildung 3.13 A SARA Score vs. expandierte Ataxin-3 Konzentration im Plasma:** Der statistische Zusammenhang zwischen dem SARA Score der ataktischen Probanden und der Konzentration an expandiertem Ataxin-3 im Plasma ist nicht signifikant (lineare Regression,  $p=0,6320$ ). **B INAS Score vs. expandierte Ataxin-3 Konzentration im Plasma:** Der statistische Zusammenhang zwischen dem INAS Score der ataktischen Probanden und der Konzentration an expandiertem Ataxin-3 im Plasma ist nicht signifikant (lineare Regression,  $p=0,9798$ ). **C AAO vs. expandiertes Ataxin-3 Konzentration im Plasma:** Der statistische Zusammenhang zwischen der Konzentration an expandiertem Ataxin-3 im Plasma und dem AAO der ataktischen Probanden ist nicht signifikant (lineare Regression,  $p=0,0747$ ). Es konnte allerdings eine Tendenz einer negativen Korrelation von AAO und expandierten ATXN3 festgestellt werden. **D SARA vs. AAO:** Der statistische Zusammenhang zwischen dem SARA Score und dem AAO ist statistisch signifikant (lineare Regression,  $p=0,0208$ ).

### 3.3 Expandiertes Ataxin-3 im Singulex

Als dritter Assay soll in diesem Abschnitt nun die Messung des expandierten Ataxin-3 mit dem Singulex Assay ausgewertet werden. In Abbildung 3.14 sieht man die Struktur des Ergebnisteils.



**Abbildung 3.14 Darstellung der Arbeitsschritte der Promotion:** im kommenden Abschnitt wird der Teil des Arbeitsprozesses behandelt, der unter Simoa im Flussdiagramm vermerkt ist.

#### 3.3.1 Kohortenanalyse

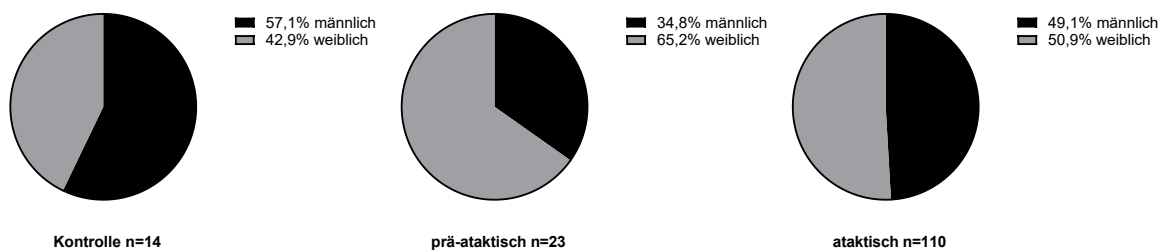
Mit dem Singulex Assay wurde für die Baseline Kohorte insgesamt 147 Probanden untersucht, davon waren 14 gesunde Kontrollen, 23 prä-ataktische Mutationsträger und 110 waren ataktische Mutationsträger. Die Analysen mit dem Singulex Assay wurden von der Firma Evotec durchgeführt (Assay beschrieben in Hübener-Schmid et al. 2021). Es wurde für die deskriptive Statistik der Median und der Interquartilenabstand der personen-bezogenen und klinischen Daten bestimmt (Tabelle 25). Bei den ataktischen Mutationsträgern war nur von 108 die Länge des expandierten Allels bekannt und nur von 97 das klinisch beobachtete AAO.

*Tabelle 25 Kohortenanalyse der Singulex Baseline Kohorte*

SINGULEX	KONTROLLEN	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL (ANTEIL WEIBLICH)</b>	14 (42,9 %)	23 (65,2 %)	110 (50,9 %)
<b>ALTER</b>	38 (29,75-55,25)	34 (27,5-38,5)	52 (43,75-61)
<b>AAO</b>	-	-	40 (33,5-47)
<b>CAG-WIEDERHOLUNGEN IM</b>	-	70 (65-71)	69 (65-71)

EXPANDIERTEN ALLEL	0	1	
SARA	(0-0,5)	(0-1,5)	10,75 (7,5-17)
INAS	(0-1)	(0-2)	4 (3-7)

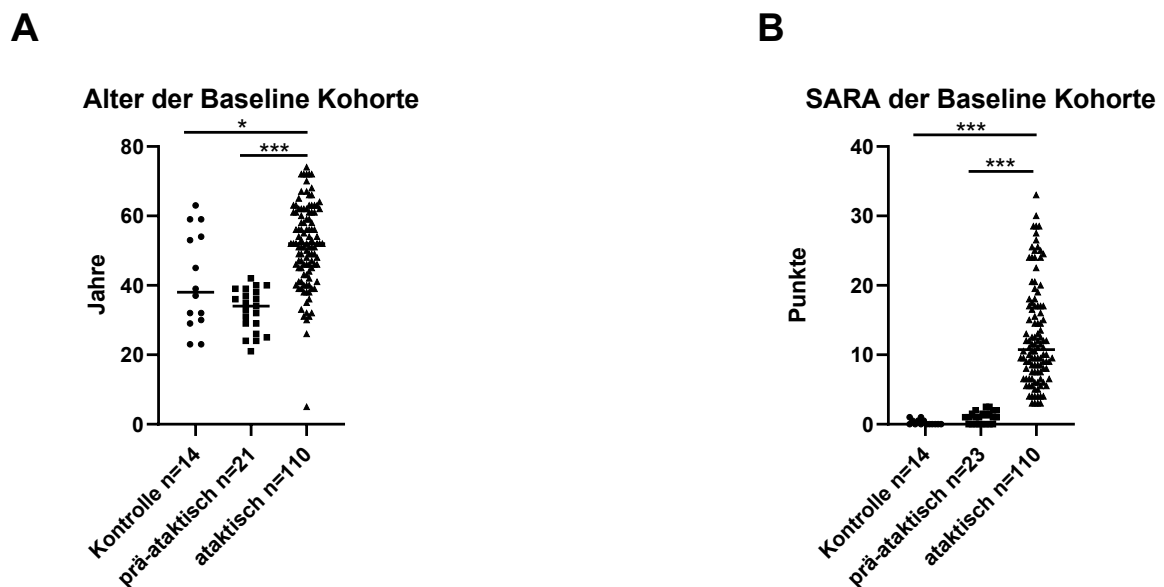
In der Gruppe der Kontrollen sind 42,9% der Probanden weiblich und 57,1% der Probanden männlich. Von den 23 prä-ataktischen Probanden sind 65,2% weiblich und 34,8% männlich, während in der Gruppe der ataktischen Probanden 50,9% weiblich sind und 49,1% männlich. Den höchsten Frauenanteil hat demnach die prä-ataktische Gruppe (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15: Geschlechterverteilung der Baseline Kohorte der Singulex Gruppe** den höchsten Anteil weiblicher Probanden hat die Gruppe der prä-ataktischen Probanden mit 65,2%. Die ataktische Gruppe hat einen Frauenanteil von 50,9% und die Kontroll-Gruppe 42,9%. Das Geschlechterverhältnis wird in der Abbildung durch Tortendiagramme dargestellt.

Das durchschnittliche Alter der ataktischen Probanden lag bei 52 Jahren mit einem IQA von 43,75-61. Die ataktischen Probanden sind damit im Median die älteste Probandengruppe, die Differenz zur prä-ataktischen Gruppe ist statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ; Kruskal-Wallis Test). Ebenfalls statistisch signifikant ist die Differenz zur Kontroll-Gruppe ( $p = 0,0231$ ; Kruskal-Wallis Test). Bei den prä-ataktischen Mutationsträgern gab es für 2 Probanden keine Altersangabe, daher gilt für dies Analysen  $n = 21$ . Die prä-ataktischen Probanden sind im Durchschnitt die jüngsten Probanden mit einem Median von 34 Jahren und einem IQA von 27,5-38,5. Das maximale Alter eines prä-ataktischen Probanden war dabei 42 Jahre, während der älteste Proband in der ataktischen Gruppe 74 Jahre alt war. Die Kontrollen haben ein medianes Alter von 38 Jahren (IQA=29,75-55,25). Die Altersverteilung der Baseline Kohorte ist in Abbildung 3.16 A dargestellt.

Der SARA Score der ataktischen Gruppe ist mit 10,75 Punkten am höchsten. Der breite Interquartilenabstand von IQA=7,5-17 zeigt, dass Patienten in sehr unterschiedlichen Stadien der SCA3 in der Gruppe vertreten sind. So lag der niedrigste SARA Score bei 3 Punkten, während der höchste SARA Score eines Probanden bei 33 Punkten lag. Der Unterschied zu der Kontroll-Gruppe und der prä-ataktischen Gruppe war statistisch signifikant ( $p < 0,0001$  und  $p < 0,0001$ ; Kruskal-Wallis Test). Die Kontroll-Gruppe hat einen durchschnittlichen SARA Score von 0 (IQA=0-0,5) und die prä-ataktische Gruppe hat einen durchschnittlichen SARA Score von 1 (IQA=0-1,5) (Abbildung 3.16 B).

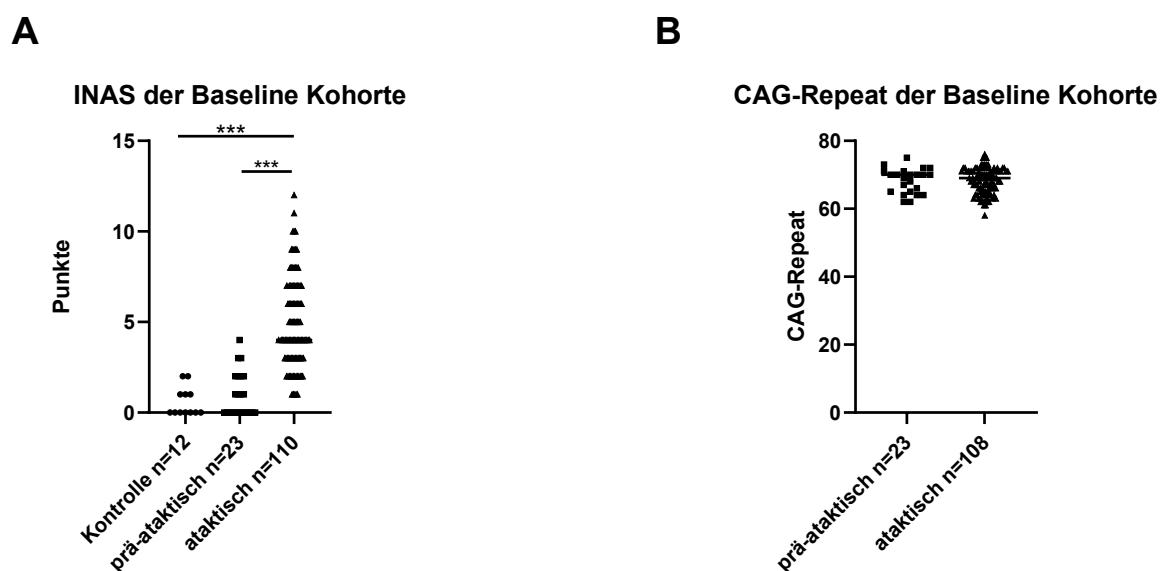


**Abbildung 3.16 A Alter der Baseline Kohorte der Singulex Gruppe:** Statistisch signifikant am ältesten sind die ataktischen Probanden im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ( $p=0,0234$ ) und zur prä-ataktischen Gruppe ( $p < 0,0001$ ). Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert. **B SARA Score der Baseline Kohorte der Singulex Gruppe:** Der SARA Score lag für die Kontroll-Gruppe im Median bei 0 Punkten, für die präataktische-Gruppe bei 1 Punkt und bei den ataktischen Probanden bei 10,75 Punkten. Der SARA Score der ataktischen Gruppe war damit statistisch signifikant am höchsten ( $p < 0,0001$ ; Kruskal-Wallis Test).

In der Gruppe der Kontrollen fehlten von 2 Probanden die Angaben zum INAS Scores, daher wurde die deskriptive Analyse mit  $n=12$  durchgeführt (Abbildung 3.17 A). Die Gruppe der Kontrollen hat im Median einen INAS Score von 0 Punkten (IQA=0-1). Die Gruppe der prä-ataktischen Probanden haben im Median

ebenfalls einen INAS Score von 0 Punkten mit einem Interquartilenabstand von 0-2 Punkten. Den höchsten INAS Score haben im Durchschnitt die ataktischen Probanden mit 4 Punkten und einem Interquartilenabstand von 3-7 Punkten. Der INAS Score der ataktischen Probanden ist statistisch signifikant höher als der INAS Score der Kontrollen und prä-ataktischen Probanden (beide  $p < 0,0001$ ; Kruskal-Wallis Test). Der Proband mit dem höchsten SARA Score in der Kohorte hat einen INAS Score von 7 Punkten, ist also außerhalb der Ataxie Symptomatik zusätzlich neurologisch deutlich auffällig.

Für den Vergleich der CAG-Repeats der ataktischen und prä-ataktischen Gruppe konnte nur auf die Daten von 108 ataktischen Probanden zurückgegriffen werden, da diese Angabe für 2 Probanden fehlt. Für die Gruppe der prä-ataktischen Probanden waren die CAG-Repeats für alle 23 Probanden bekannt und konnten in die Auswertung miteinbezogen werden. Im Median haben die Probanden der prä-ataktischen Gruppe einen CAG-Repeat von 70 Wiederholungen und die ataktische Gruppe von 69 Wiederholungen. Der Mann-Whitney Test zeigte mit  $P = 0,9940$  keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 3.17).



**Abbildung 3.17 A INAS der Baseline Kohorte der Singulex Gruppe:** Der INAS Score der Baseline Kohorte der ataktischen Probanden ist statistisch signifikant höher, sowohl bezogen auf

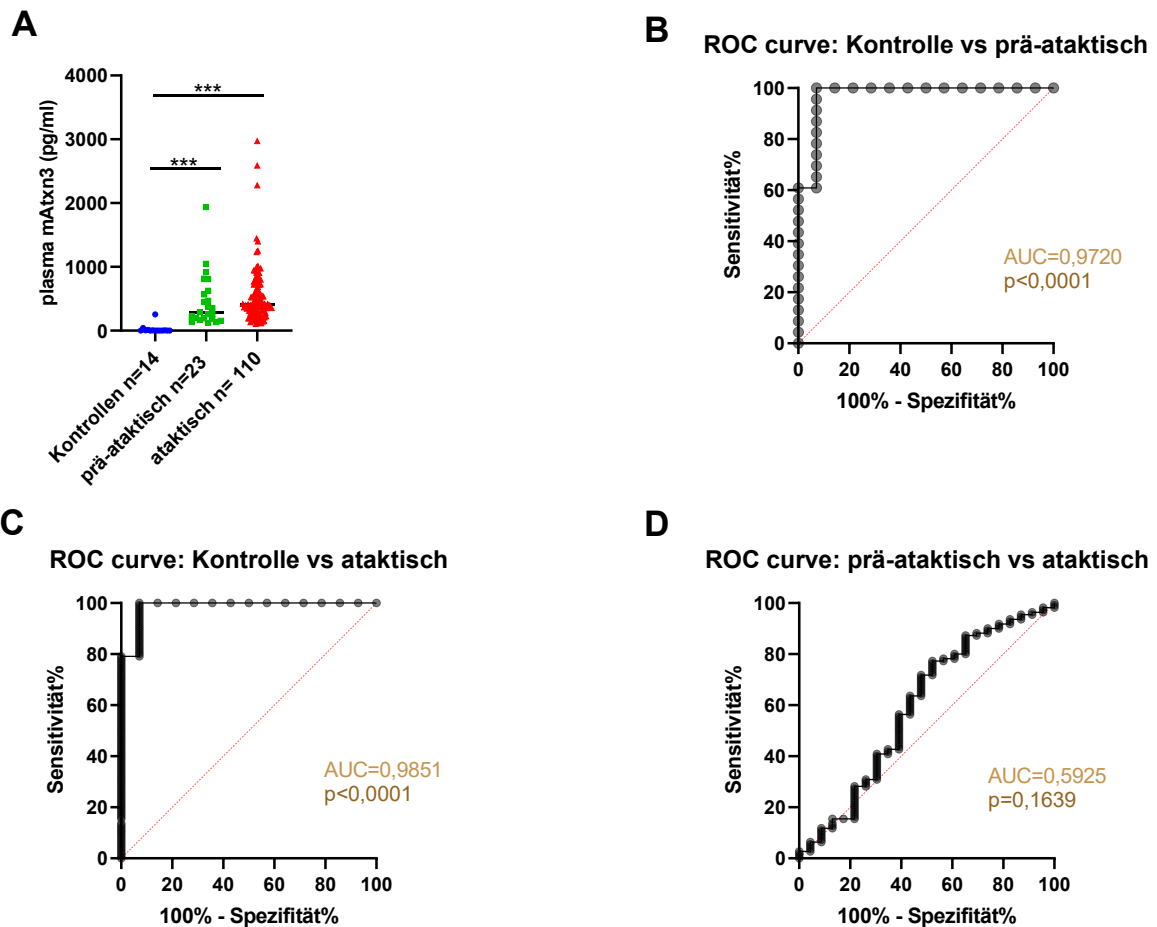
den INAS Score der Kontrollen als auch auf den der prä-ataktischen Probanden (Kruskal-Wallis Test). **B CAG-Repeat der Baseline Kohorte der Singulex Grupp:** Die Anzahl an CAG-Repeats in der prä-ataktischen Gruppe und in der ataktischen Gruppe unterscheiden sich statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney Test).

### **3.3.2 Statistische Analyse der Ataxin-3 Proteinlevel und klinischen Parameter**

Die Analyse der 147 Probanden der Baseline Kohorte wurde durch die Firma Evotec SE (Hamburg, Deutschland) mit dem Singulex Assay durchgeführt. Es wurde die Abgrenzung zwischen den Mutationsträgern und den Kontrollen durch den Assay untersucht (Abbildung 3.18). Der durchgeführte Kruskal-Wallis-Test zwischen Kontrollen und prä-ataktischen Probanden war hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ). Auch der Kruskal-Wallis-Test für die Kontrollen versus die ataktischen Probanden war bei einem P-Wert  $< 0,0001$  hochsignifikant. Der Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der medianen Werte für das Ataxin-3 in prä-ataktischen und ataktischen Probanden war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,6030$ ) (Abbildung 3.18 A-D).

Abbildung 3.18 B zeigt die ROC-Kurve der Kontrollen gegenüber den prä-ataktischen Probanden mit einer AUC=0,9720. Die ROC-Kurve der Kontrollen gegenüber den ataktischen Probanden ergab eine AUC=0,9851 (Abb 3.18 C).

Die Abbildung 3.18 D zeigt die ROC-Kurve zwischen den prä-ataktischen und den ataktischen Probanden mit einer AUC=0,5925. Zusätzlich ergab der Kruskal-Wallis-Test der Kontrollen im Bezug auf die Gruppe aller Mutationsträger ( $n=123$ ) ebenfalls einen hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ , vielleicht kannst du den ROC-Wert dazu noch in Klammern angeben Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.18 A Vergleich der Ataxin-3-Konzentrationen:** Die Ataxin-3 Konzentrationen der Kontrollen, prä-ataktischen Probanden und ataktischen Probanden wurden nebeneinander aufgetragen. Es zeigten sich zwischen Kontrollen und prä-ataktischen Probanden sowie Kontrollen und ataktischen Probanden signifikante Unterschiede in der Proteinkonzentration (Kruskal-Wallis Test mit jeweils  $p < 0,0001$ ). **B ROC Curve der Kontrollen und prä-ataktischen Probanden:** Die ROC Curve zwischen Kontrollen und prä-ataktischen Probanden zeigt eine  $AUC=0,9720$ . **C ROC Curve der Kontrollen und ataktischen Probanden:** Der Singulex Assay hat in der ROC Curve zwischen Kontrollen und ataktischen Probanden eine  $AUC=0,9851$ . **D ROC Curve der prä-ataktischen und ataktischen Probanden:** Die ROC Curve zeigt eine  $AUC=0,5925$  für die Differenzierung zwischen prä-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern.

### Korrelation der klinischen Daten mit der expandierten Ataxin-3-Konzentration im Plasma.

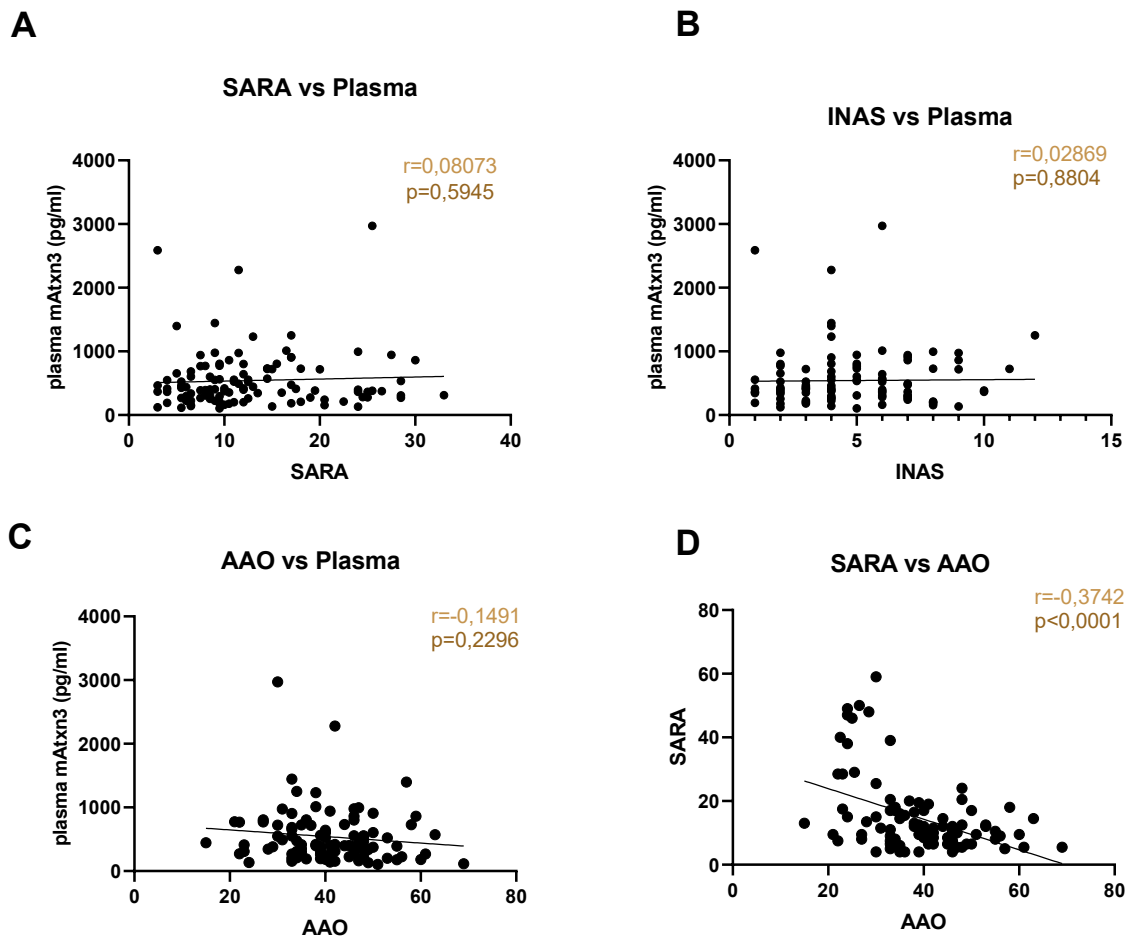
Für die Korrelation der Ataxin-3-Werte im Plasma mit den klinischen Daten wurden ausschließlich die Messwerte der ataktischen Probanden verwendet. Der SARA Score der 110 ataktischen Probanden lag im Median bei 10,75 Punkten.

Zunächst wurde für die Plasmawerte ein Test auf Normalverteilung durchgeführt, der negativ war (Shapiro-Wilks Test;  $p < 0,0001$ ). Um den Zusammenhang zwischen SARA Score und expandiertem Ataxin-3 zu untersuchen, wurde eine lineare Regression durchgeführt, deren Ergebnis nicht signifikant war ( $p = 0,5945$ ) (Abbildung 3.19 A). Der Spearman-Korrelationskoeffizient ( $r = 0,081$ ) zeigte ebenfalls keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen expandiertem Ataxin-3 und SARA Score an.

Betrachtet man die gemessenen Werte an expandiertem Ataxin-3 sowie die INAS Score Werte der Probanden, so zeigt zunächst der durchgeführte Shapiro-Wilks Test, dass die Daten nicht parametrisch verteilt sind ( $p < 0,0001$ ). Die durchgeführte lineare Regression ergab einen P-Wert von 0,8804. Der Spearman-Koeffizient wurde mit  $r = 0,0287$  berechnet (Abb 3.19 B). Weder in der linearen Regression noch in der Korrelation konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Ataxin-3-Konzentration und dem INAS Score der ataktischen Probanden nachgewiesen werden.

Das AAO war nur bei 97 von 110 Probanden protokolliert, weswegen für diese Auswertung nur mit 97 Datenpunkten gearbeitet werden konnte. Das AAO der Kohorte lag im Median bei 40 Jahren. Die Abbildung 3.19 C zeigt die Korrelation zwischen dem AAO und dem im Plasma gemessenen Ataxin-3. Zunächst wurde eine Testung auf Normalverteilung durchgeführt, die keine Normalverteilung zeigte (Shapiro-Wilks Test;  $p < 0,0001$ ). Die durchgeführte lineare Regression war nicht statistisch signifikant ( $p = 0,2296$ ); es wurde ein Spearman-Koeffizienten von  $r = -0,1491$  berechnet.

Die Punktwerte des SARA Scores wurden ebenfalls mit dem AAO korreliert. Die Daten waren nicht normalverteilt (Shapiro-Wilks Test;  $p < 0,0001$ ). Die lineare Regression war bei  $p < 0,0001$  hochsignifikant, zeigte also einen statistischen Zusammenhang zwischen SARA Score und AAO an. Es wurde ein negativer Spearman Koeffizient von  $R = -0,3742$  bestimmt (Abb 3.19 D).



**Abbildung 3.19** **A SARA vs. expandiertes Ataxin-3 im Plasma:** Der statistische Zusammenhang zwischen dem klinisch evaluierten SARA Score und der mit dem Singulex Assay gemessenen Ataxin-3 Konzentration ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,5945$ ). **B INAS vs. expandiertes Ataxin-3 im Plasma:** Die statistische Untersuchung des INAS Score und des expandierten Ataxin-3 im Plasma ergibt keinen signifikanten Zusammenhang ( $p=0,8804$ ). **C AAO vs. expandiertes Ataxin-3 in Plasma:** Der statistische Zusammenhang zwischen dem AAO und dem im Plasma gemessenen Ataxin-3 ist in der linearen Untersuchung nicht signifikant ( $p=0,2296$ ). **D SARA vs. AAO der Baseline Kohorte:** Die lineare Regression des SARA Scores und des AAO ergibt  $p<0,0001$  und ist damit hochsignifikant.

### 3.3.4 Zusammenfassung der Auswertung der Baseline Kohorte

Zum Abschluss der statistischen Auswertung der Datensätze der 3 Assays - TR-FRET Assay, Simoa Assay und Singulex Assay - wurden die Ergebnisse für die

jeweilige Baselinekohorte in Form von Tabelle 26 dargestellt, um eine Übersicht über die durchgeführten statistischen Tests zu geben.

Tabelle 26 Zusammenfassung der Auswertung der Baseline Kohorte

	<b>TR-FRET ASSAY</b>	<b>SIMOA ASSAY</b>	<b>SINGULEX ASSAY</b>
<b>DIFFERENZIERUNG KONTROLLE VS. PRÄ-ATAKTISCH VS. ATAKTISCH</b>	ROC Curve: Kontrollen vs. prä-ataktisch AUC=0,6267. Kontrollen vs. ataktisch AUC=0,5212. Prä-ataktisch vs. ataktisch AUC=0,5902.	ROC Curve: Kontrollen vs. prä-ataktisch AUC=0,9877. Kontrollen vs. ataktisch AUC=0,9722. Prä-ataktisch vs. ataktisch AUC=0,5667.	ROC Curve: Kontrollen vs. prä-ataktisch AUC=0,9720. Kontrollen vs. ataktisch AUC=0,9851. Prä-ataktisch vs. ataktisch AUC=0,5925.
<b>SARA SCORE VS. ATAXIN-3</b>	Nicht signifikant (Lineare Regression p=0,1338)	Nicht signifikant (Lineare Regression p=0,6320)	Nicht signifikant (Lineare Regression p=0,5945)
<b>INAS SCORE VS. ATAXIN-3</b>	Nicht signifikant (Lineare Regression p=0,5274)	Nicht signifikant (Lineare Regression p=0,9798)	Nicht signifikant (Lineare Regression p=0,8804)
<b>AAO VS. ATAXIN-3</b>	Nicht signifikant (Lineare Regression p=0,5274)	Nicht signifikant (Lineare Regression p=0,0747)	Nicht signifikant (Lineare Regression p=0,2296)
<b>SARA SCORE VS. AAO</b>	Nicht signifikant (Lineare Regression p=0,1422)	Signifikant (Lineare Regression p=0,0208)	Signifikant (Lineare Regression p<0,0001)

### 3.4 Gesamt Ataxin-3 im TR-FRET Assay im longitudinalen Studiendesign

#### 3.4.1 Kohortenanalyse der Follow Up 1 Kohorte

Für die longitudinale Evaluation der Ataxin-3-Konzentration wurde für 63 Patienten der Baseline-Kohorte eine erste Follow-up-Untersuchung zur Kohortenanalyse herangezogen. Die Kohorte setzte sich aus 9 Kontrollen, 9 prä-ataktischen Mutationsträgern und 45 ataktischen Mutationsträgern aus der ESMI-Kohorte zusammen. Für den vorliegenden Datensatz wurde für die 3 Gruppen jeweils der Median und der Interquartilenabstand berechnet (Tabelle 27).

Tabelle 27 Kohortenanalyse der TR-FRET Follow Up 1 Kohorte

N-TERM	KONTROLLEN	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL (ANTEIL WEIBLICH)</b>	9 (33,34 %)	9 (66,67 %)	45 (55,56 %)
<b>ALTER</b>	40 (33,5-58)	36 (24-43)	53 (42,5-61)
<b>AAO</b>	-	-	39,5 (35,25-45,75)
<b>CAG- WIEDERHOLUNGEN IM EXPANDIERTEN ALLEL SARA</b>	-	69 (68-71)	69 (66,5-71)
<b>INAS</b>	0,5 (0-1)	2 (0,5-2)	10,5 (6,75-17,5)
	1 (0-2)	0 (0-3,5)	4 (3-7)

Von der Gruppe der Kontrollprobanden waren 3 von 9 Probanden weiblich, was einem Anteil von 33,34% entspricht. Die übrigen 6 männlichen Probanden machten einen Anteil von 66,67% aus. Der Anteil weiblicher Probanden in der Gruppe der prä-ataktischen Probanden war mit 66,6 % wesentlich höher als in der Kontroll-Gruppe. Der Anteil der männlichen Probanden in der Gruppe der prä-ataktischen Mutationsträger betrug 33,3%. Von den ataktischen Probanden waren 55,56% weiblich und 44,45% männlich (Tabelle 27).

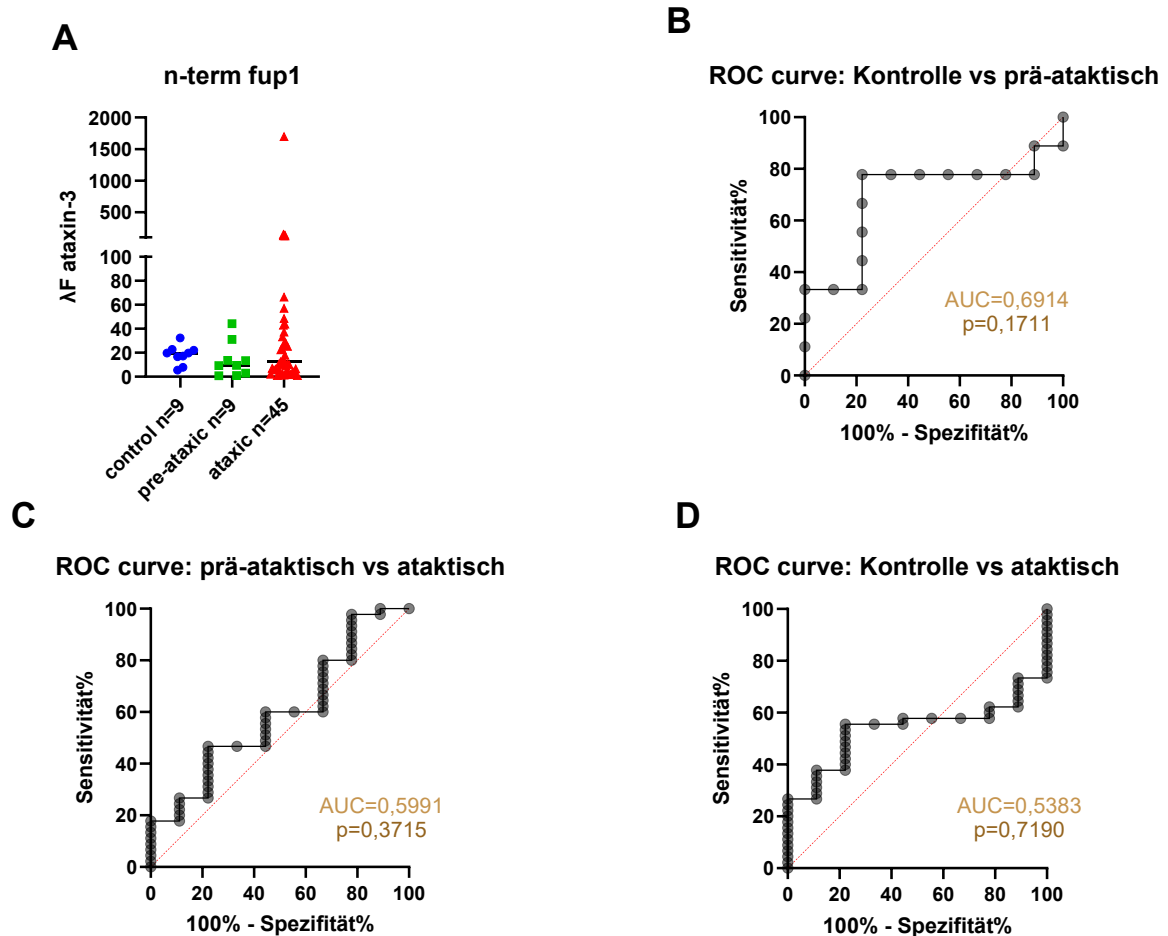
Das mediane Alter der Kontrollprobanden zum Zeitpunkt der Untersuchung lag bei 40 Jahren (IQA 33,5-58 Jahre). Das niedrigste Alter im Median hatten die prä-ataktischen Probanden mit 36 Jahren, diese Gruppe hatte auch einen relativ schmalen Interquartilenabstand von 24-43 Jahren, da sich so 50% der prä-ataktischen Probanden im Alter in dieser 9-Jahresspanne bewegen. Die ataktischen Probanden waren statistisch am ältesten mit einem Median von 53 Jahren (IQA 42,5-61 Jahre). Das AAO in dieser Gruppe lag im Median bei 39,5 Jahren (IQA 35,2-45,75 Jahre) (Tabelle 27).

Den niedrigsten SARA Score hatte im Median die Kontroll-Gruppe mit 0 Punkten (IQA 0-1 Punkte). Die prä-ataktische Gruppe hatte im Median einen SARA Score von 2 (IQA 0,5-2 Punkte), den höchsten SARA Score hatte die ataktische Gruppe mit 10,5 Punkten (IQA 6,75-17,5 Punkte) (Tabelle 27).

Im Median hatten die prä-ataktischen Probanden ein expandiertes *CAG-Repeat* von 69 Wiederholungen (IQA 68-71). Die ataktischen Probanden hatten ein expandiertes *CAG-Repeat* von ebenfalls 69 Wiederholungen (IQA 66,5-71) (Tabelle 27). Der INAS Score betrug für die Kontrollprobanden im Median 1 Punkt (IQA 0-2) für die prä-ataktischen Probanden im Median 0 Punkte (IQA 0-3,5) und für die ataktischen Probanden im Median 4 (IQA 3-7) (Tabelle 27).

### **3.4.2 Statistische Analyse der Ataxin-3 Proteinlevel und klinischen Parameter**

Für die 63 Probanden der Follow-up-1 Untersuchung, die mit dem TR-FRET Assay untersucht worden sind, wurden die *full-length* Ataxin-3 Konzentrationen für die Gruppe Kontrolle, prä-ataktische Mutationsträger und ataktische Mutationsträger verglichen (Abbildung 3. 20.A). Dafür wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Die Gruppen Kontrolle und prä-ataktische Probanden unterscheiden sich in der Konzentration an Ataxin-3 statistisch nicht signifikant voneinander ( $p=0,8232$ ). Das gilt im Weiteren für den Vergleich der Gruppen der Kontrollprobanden und der ataktischen Probanden. Auch die Differenz der prä-ataktische und ataktische Mutationsträger war nicht signifikant (Kruskal-Wallis Test;  $p=0,9920$ ). Die Gruppe der prä-ataktischen Probanden hatte im Median die niedrigste Ataxin-3 Konzentration mit 26,00  $\Delta F$ . Während die Konzentration an *full-length* Ataxin-3 in den ataktischen Probanden bei 32,51  $\Delta F$  lag, wurde in der Gruppe der Kontrollen die höchste Konzentration an *full-length* Ataxin-3 gemessen mit 35,44  $\Delta F$ . Die Abbildung 3.20 B demonstriert die ROC-Kurve der Kontrollen und prä-ataktischen Probanden. Die  $AUC=0,6914$  zeigte die Differenzierung zwischen Kontrollen und prä-ataktischen Probanden, welche jedoch mit einem  $p=0,1711$  statistisch nicht signifikant ist. Die Abbildung 3.20 C zeigt die *ROC Curve* für die Differenzierung zwischen den prä-ataktischen und den ataktischen Probanden. Die  $AUC$  für den Vergleich prä-ataktisch vs. ataktisch entspricht 0,5951. Der P-Wert war auch für diese Untersuchung nicht signifikant ( $p=0,3715$ ). Die *ROC Curve* der Kontrollen und ataktischen Probanden zeigt in Abbildung 3.20 D eine  $AUC=0,5383$  mit  $p=0,7190$ .



**Abbildung 3.20 A Vergleich der Ataxin-3 Konzentrationen:** Die full-length Ataxin-3 Konzentration der Kontroll-Gruppe, der prä-ataktischen Gruppe und der ataktischen Gruppe der Kohorte unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis Test). **B ROC Curve Kontrollen vs. prä-ataktische Probanden:** Die ROC Curve zeigt eine AUC=0,6914 für die Differenzierung zwischen den Kontrollen und den prä-ataktischen Probanden. **C ROC Curve prä-ataktische Probanden vs. ataktische Probanden:** Für die Differenzierung zwischen den prä-ataktischen und ataktischen Probanden durch den n-Term Assay zeigt die ROC Curve für diese beiden Gruppen eine AUC=0,5951. **D ROC Curve Kontrollen vs. ataktische Probanden:** Die ROC Curve für den Vergleich Kontrollen und ataktische Probanden zeigt eine AUC=0,5383 mit  $p=0,7190$ .

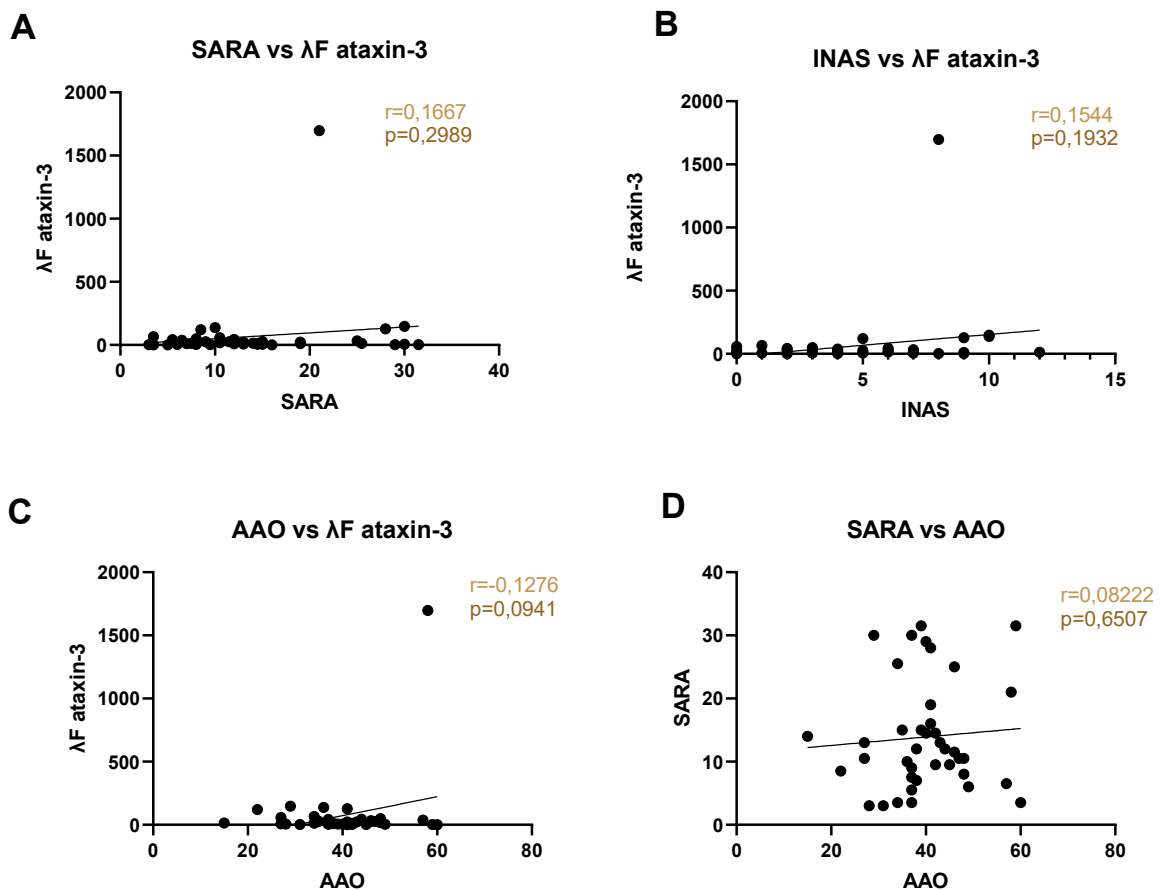
Für die Kohorte der ataktischen Follow-up-1 Probanden wurden die Konzentrationen an full-length Ataxin-3 mit klinischen Daten korreliert. Abbildung 4.21 zeigte die Ataxin-3 Konzentration (angegeben in  $\Delta F$ )R aufgetragen gegen den klinisch evaluierten SARA Score. Der für die Testung auf Normalverteilung durchgeführte Shapiro-Wilks Test ergab keine Normalverteilung ( $p<0,0001$ ). Die

lineare Regression war statistisch nicht signifikant ( $p=0,2989$ ). Der durchgeführte statistische Test auf Korrelation ergab einen Spearman-Koeffizienten von  $r=0,1667$  (Abbildung 3.21 A).

Der Shapiro-Wilks Test auf Normalverteilung der INAS Score Werte der ataktischen Probanden ergab eine Normalverteilung der Werte ( $p=0,0978$ ). Die lineare Regression ergab keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem INAS Score und der *full-length* Ataxin-3 Konzentration. Der Pearson Koeffizient beträgt  $r=0,1932$ , diese Korrelation war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p= 0,0932$ ) (Abb. 3.21 B).

Die *full-length* Ataxin-3 Konzentration wurde mit dem AAO der ataktischen Probanden korreliert. Der durchgeführte Shapiro-Wilks-Test auf Normalverteilung ergab eine Normalverteilung für die AAO Werte der ataktischen Probanden ( $p=0,2953$ ), aber keine Normalverteilung für die Ataxin-3-Werte ( $p<0,0001$ ) (Abbildung 3.21 D). Die lineare Regression war nicht signifikant ( $p=0,0941$ ). Der Spearman-Koeffizient betrug  $r=-0,1276$ , dies war jedoch statistisch nicht signifikant.

Der SARA Score wurde mit dem AAO der Probanden korreliert. Die Daten des SARA Scores waren nicht parametrisch verteilt (Shapiro-Wilks Test;  $p=0,0003$ ), während die Daten des AAO der Probanden normalverteilt sind (Shapiro-Wilks Test;  $p=0,2953$ ). Die lineare Regression von SARA Score und AAO ergibt ein P-Wert von  $0,6507$ , somit besteht kein Nachweis eines statistisch signifikanten Zusammenhanges zwischen dem SARA Score und dem AAO der 1.FUP Analyse. Auch der Spearman Korrelationskoeffizient  $r=0,08222$  zeigte keinen signifikanten statistischen Zusammenhang zwischen den beiden Variablen (Abb.3.21 D).



**Abbildung 3.21 A SARA Score vs. full-length Ataxin-3 Proteinkonzentration in PBMCs:** Der statistische Zusammenhang zwischen dem SARA Score und der full-length Ataxin-3 Konzentration ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,2989$ ). **B INAS Score vs. full-length Ataxin-3 Proteinkonzentration in PBMCs:** Für die Korrelation des INAS Score und der full-length Ataxin-3-Konzentration ergibt sich ein P-Wert=0,1932, der für die lineare Regression keine statistische Signifikanz anzeigt. **C AAO vs. full-length Ataxin-3 Proteinkonzentration in PBMCs:** Der statistische Zusammenhang zwischen dem AAO und der full-length Ataxin-3 Konzentration ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,0941$ ). **D SARA Score vs. AAO der ataktischen Probanden:** Der statistische Zusammenhang zwischen dem SARA Score und dem AAO wurde mit einer linearen Regression untersucht und ist nicht signifikant ( $p=0,6507$ ).

### 3.4.3 Kohortenanalyse der Follow Up 2 und 3 Kohorte

Für  $n=9$  der Patienten mit Baseline und Follow Up 1 waren Daten eines Follow Up 2 vorhanden, davon waren  $n=3$  prä-ataktisch und  $n=6$  ataktisch. Ein Follow Up 3 gab es für  $n=4$  Patienten,  $n=2$  prä-ataktisch und  $n=2$  ataktisch. Für die Follow Up 2 Kohorte wurde jeweils der Median und der Interquartilenabstand bestimmt, während für die Follow Up 3 Gruppe aufgrund der geringen Gruppengröße keine vollständige Kohortenanalyse erstellt wurde.

Tabelle 28 Kohortenanalyse der Follow Up 2 Kohorte

N-TERM	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL (ANTEIL WEIBLICH)</b>	3 (33,34 %)	6 (66,67 %)
<b>ALTER</b>	35 (26-37)	60 (56,75-68,75)
<b>AAO</b>	-	41 (40-46,5)
<b>CAG- WIEDERHOLUNGEN IM EXPANDIERTEN ALLEL</b>	67 (64-69)	67 (65,5-69)
<b>SARA</b>	1 (0-1,5)	18,75 (9,25-23,75)
<b>INAS</b>	1 (0-3)	5,5 (2,75-6,5)

In der Follow Up 2 Gruppe hatten die prä-ataktischen Probanden ein medianes Alter von 35 Jahren (IQA 26-37) und die ataktischen Gruppe ein medianes Alter von 60 Jahren (IQA 56,75-68,75). Im Median war das AAO für die ataktische Gruppe 41 Jahre (IQA 40-46,5). Der SARA Score betrug in der prä-ataktischen Gruppe im Durchschnitt 1 (IQA 0-1,5) und in der ataktischen Gruppe 18,75 (IQA 9,25-23,75). In der prä-ataktischen Gruppe gab es im expandierten Allel im Durchschnitt 67 CAG-Wiederholungen (IQA 64-69) und in der ataktischen Gruppe ebenfalls 67 Wiederholungen (IQA 65,5-69) (Tabelle 28). Der INAS Score beträgt in der prä-ataktischen Gruppe im Median 1 (IQA 0-3) und in der ataktischen Gruppe 5,5 Punkte (IQA 2,75-6,5).

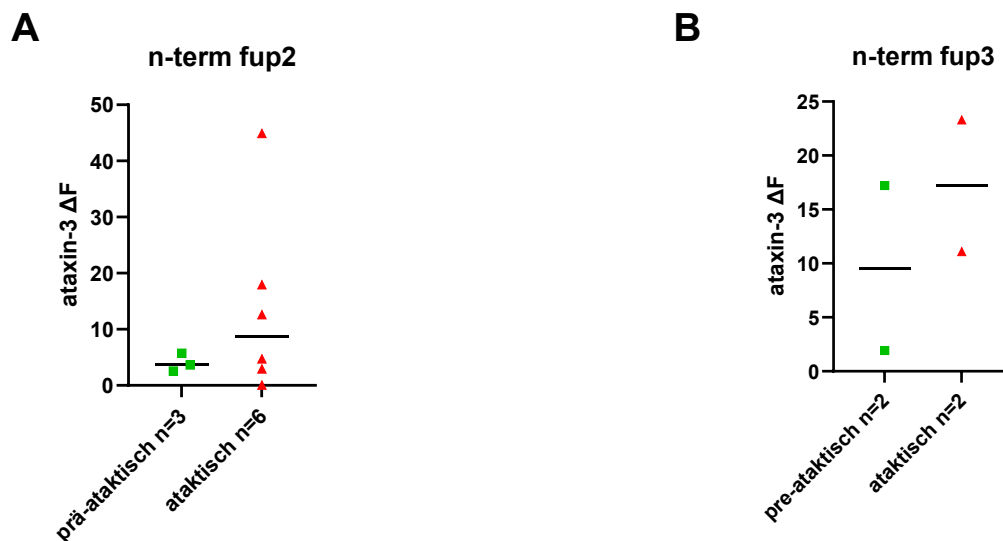
Für das Follow Up 3 setzte sich die Gruppe der prä-ataktischen Probanden aus einem männlichen 27-jährigen Probanden und einer weiblichen 36-jährigen Probandin zusammen. Die Probandin hatte einen SARA und INAS Score von jeweils 1 Punkt, der Proband von jeweils 0 Punkten. Für das *ATXN3* Gen hatte der Proband einen Genotyp 21/69 *CAG Repeats* und die Probandin von 27/67 *CAG Repeats*. Beide ataktischen Follow Up 3 Probanden waren weiblich und mit SARA Scores von jeweils 15,5 Punkten und 21,5 Punkten klinisch moderat ataktisch. Die Probanden waren 59 resp. 68 Jahre alt, also beide älter als die prä-

ataktischen Probanden. Für das *ATXN3* Gen hatten sie ein normales und expandiertes Allel mit jeweils 23/67 *CAG Repeats* und 24/67 *CAG Repeats*.

Aufgrund der geringen Gruppengröße der Kohorte erfolgte nur eine vergleichende Analyse zwischen den Genotyp, aber kein Bezug auf klinische Daten (Abbildung 3.22).

Die Daten der Follow Up 2 Kohorte waren normalverteilt (Kruskal-Wallis Test). Daher wurde ein t-Test durchgeführt, der jedoch keine signifikante Differenz in den Ataxin-3 Werten der prä-ataktischen und ataktischen Probanden ergab ( $p=0,3533$ ).

Der Datensatz für die Follow Up 3 Kohorte war für einen Shapiro-Wilks Test auf Normalverteilung zu klein. Der durchgeführte t-Test ergab keine signifikante Differenz zwischen den prä-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern ( $p=0,5177$ ).



**Abbildung 3.22 A Gesamt Ataxin-3 Konzentration des Follow Up 2 Gruppe:** Die Ataxin-3 Konzentrationen der prä-ataktischen und ataktischen Probanden wurde mit dem n-Term Assay bestimmt. Der durchgeführte t-Test ergab  $p=0,3533$ . **B Gesamt Ataxin-3 Konzentration der Follow Up 3 Gruppe:** Die gemessenen Ataxin-3 Konzentrationen in den prä-ataktischen Probanden der Follow Up 3 Kohorte unterscheiden sich statistisch nicht signifikant von den Werten der ataktischen Probanden.

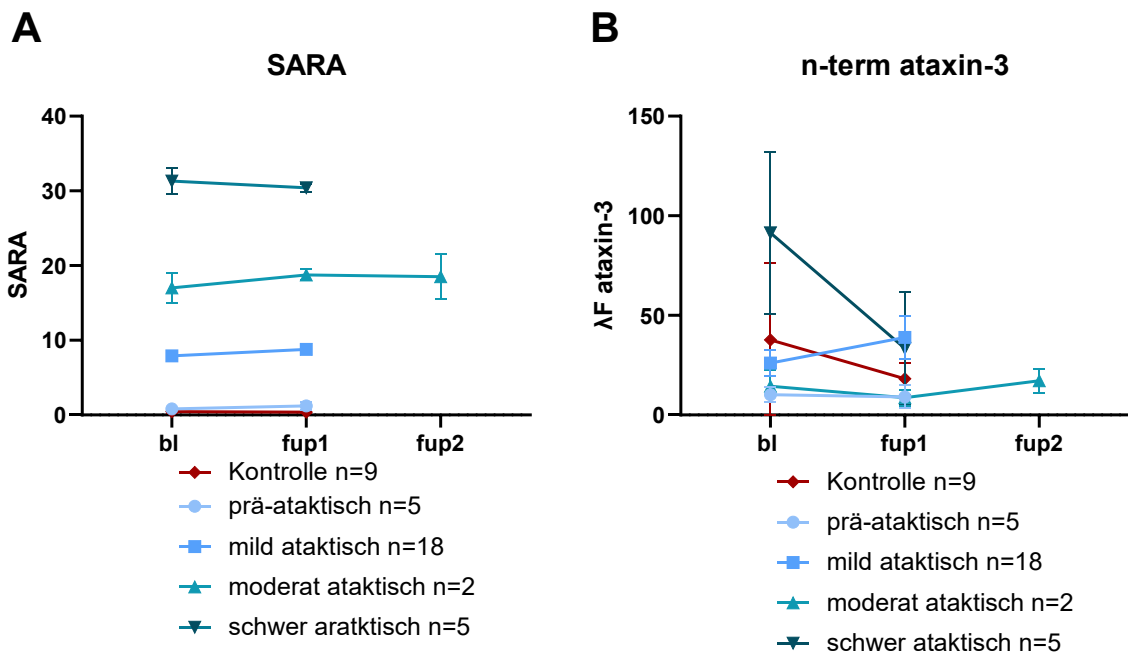
#### 3.4.4 Longitudinale Analyse in TR-FRET n-Term Kohorte

Es wurden zunächst die n=39 Probanden getrennt analysiert, welche im Verlauf des Beobachtungszeitraums nicht zwischen den Kategorien „Kontrolle“, „prä-ataktischer Mutationsträger“, „mild ataktisch“, „moderat ataktisch“ und „schwer ataktisch“ wechselten. Die 25 Konverter, die im Analysezeitraum die Kategorie ein oder mehrfach gewechselt haben, wurden anschließend analysiert.

Es wurde die Veränderung in der Proteinkonzentration des Ataxin-3 im Vergleich zum Verlauf des SARA Scores als klinisches Korrelat betrachtet. Abbildung 3.23 A zeigt zusammenfassend die SARA Score Werte für die Baseline und Follow Up 1 Werte, während in 3.23 B die *full-length* Ataxin-3 Werte für dieselben Probanden zu sehen sind. Die Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert für die Gruppe an Probanden sowie den Standardfehler (Semaka et al.).

Insgesamt gab es n=9 Kontrollprobanden mit jeweils 2 Visiten, um sie mit den Daten der Mutationsträger zu vergleichen.

Für das *full-length* Ataxin-3 ergab die Messung folgende Mittelwerte: 37,67  $\Delta F$  (SEM 12,94) in der Baseline Gruppe und 18,21  $\Delta F$  (SEM 2,670) in der Follow Up 1 Kohorte (Abbildung 3.23 B). Der SARA Score der Kontrollen war sehr niedrig, im Mittelwert in der Baseline Kohorte 0,44 Punkte mit einem Standardfehler von 0,1303 und in der Follow Up 1 Kohorte 0,375 Punkte mit einem Standardfehler von 0,157 (rote Linie, Abbildung 4.23 A. Bei einem der n=9 Kontrollprobanden war nur der SARA Score der Baseline bekannt, nicht jedoch der Score der Follow Up Visite. In der Abbildung 4.23 B lässt sich erkennen, dass der Graph der Kontrollen, der die Proteinkonzentration darstellt (dunkelrot; Raute zwischen den Graphen der schwer und mild ataktischen und oberhalb der moderat und prä-ataktischen Werte verläuft.



**Abbildung 3.23 A SARA Score der n-Term Kohorte im longitudinalen Verlauf:** Die Abbildung zeigt den Verlauf des SARA Scores vom Zeitpunkt der Baseline Untersuchung bis zu Follow Up 1 und Follow Up 2 für die Gruppen der Kontrollen und Mutationsträger. **B Ataxin-3 Konzentration der n-Term Kohorte im longitudinalen Verlauf:** Die gemessenen Konzentrationen an full-length Ataxin-3 der Kontrollen und Mutationsträger wird longitudinal im Verlauf von der Baseline Untersuchung bis zu Follow Up 1 bzw. 2 dargestellt.

Im longitudinalen Studiendesign wurden n=5 prä-ataktische Probanden (SARA kleiner drei) untersucht, mit jeweils einem Baseline Visit und einem Follow Up Visit. Der Mittelwert für den Baseline Visit lag bei 10,15  $\Delta F$  (SEM 3,614) und für die Follow Up Visite bei 9,051  $\Delta F$  (SEM 5,726) (hellblaue Linie Abb 4.23 B). Der SARA Score betrug im Mittelwert 0,8 Punkte in der Baseline Untersuchung (SEM 0,3391) und 1,2 Punkte (SEM 0,4899) im Follow Up 1 (4.23 A). Bei n=2 der Probanden verblieb der SARA Score bei 0 Punkten, bei den übrigen n=3 Probanden der Gruppe stieg er um 0,5-1 Punkt an.

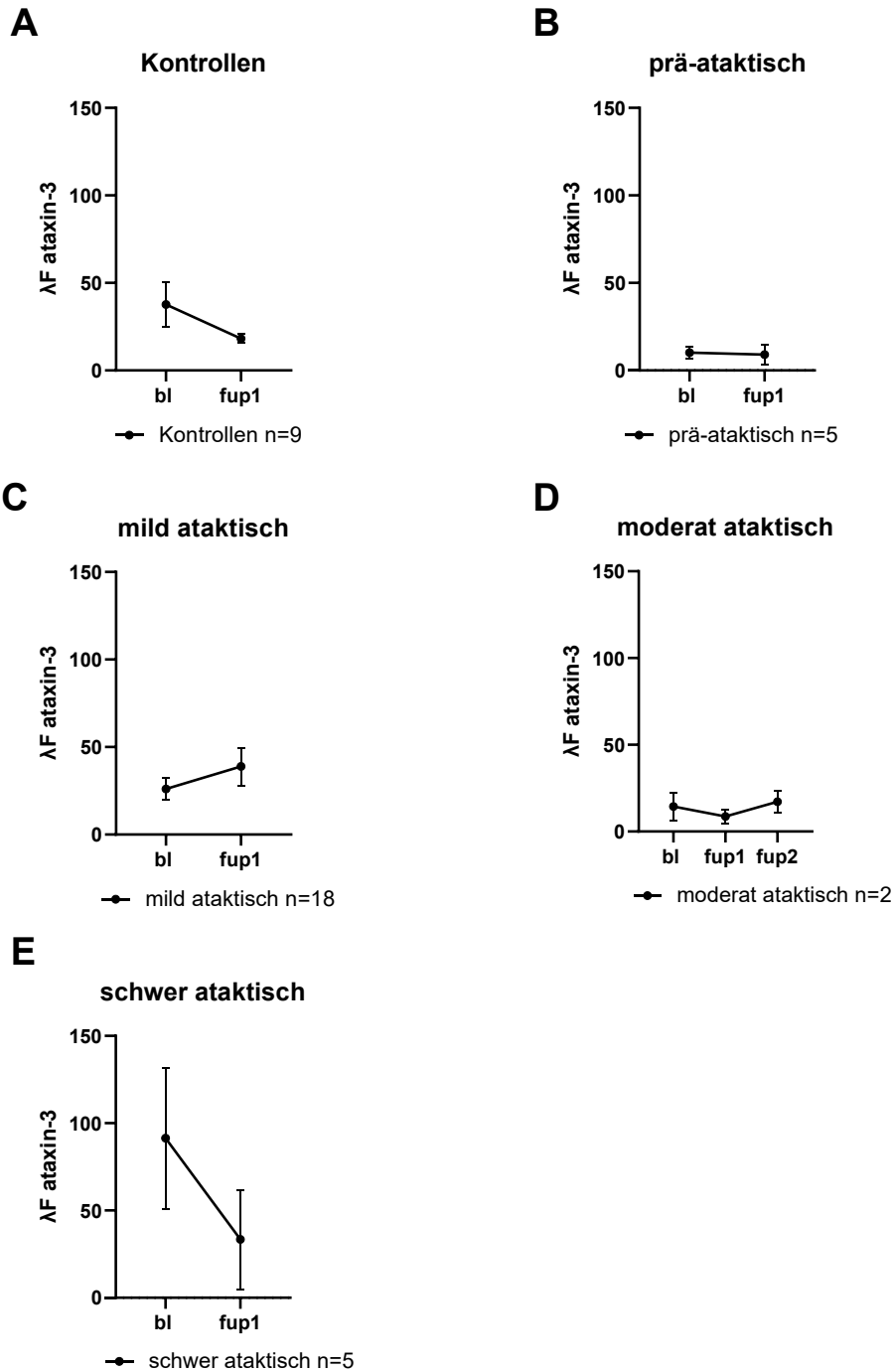
Es wurden n=18 mild ataktische Probanden (3-12 Punkte) im longitudinalen Studiendesign untersucht. Die Auswertung der full-length Ataxin-3 Konzentrationen ergab einen Mittelwert von 26,09  $\Delta F$  (SEM 6,417) sowie von 38,90  $\Delta F$  (SEM 10,85) für den Follow Up 1 (Abb 3.24 C).

Der SARA Score zeigte ebenfalls eine zunehmende Tendenz mit einem Anstieg des Mittelwertes von 7,91 auf 8,77 Punkten (Abbildung 3.25 B. Der Standardfehler betrug für die Bestimmung des Mittelwerts des SARA Scores in der Baseline Untersuchung SEM=0,5561 und bei der Follow Up Untersuchung SEM=0,62.

In der Gruppe der moderat ataktischen Probanden (13-23 Punkte) standen Daten von n=2 Probanden mit jeweils 3 Visits (Baseline Follow Up 1 und Follow Up 2) zur Verfügung (Abb 3.24 D). Aufgrund der geringen Gruppengröße werden die Ergebnisse der beiden Probanden hier einzeln besprochen. Der erste Proband hatte in der Baseline Untersuchung einen gemessenen *full-length* Ataxin-3 Wert von 6,49  $\Delta$ F, der in Follow Up 1 auf 4,71  $\Delta$ F absank und in Follow Up 2 wieder auf den höchsten Wert 11,08  $\Delta$ F anstieg. Beim zweiten moderat ataktischen Probanden konnte im Baseline Visite ein Ataxin-3 Wert von 22,38  $\Delta$ F gemessenen werden. Beide Probanden haben die niedrigste Ataxin-3 Konzentration im Follow Up 1 Visit. Im Follow Up betrug die Ataxin-3 Konzentration 12,61  $\Delta$ F. Auch hier stieg die Ataxin-3 Konzentration im Follow Up 2 Visit wieder an, auf 23,30  $\Delta$ F. Der SARA Score entwickelt sich bei dem ersten Probanden ausgehend von einem Baseline Wert von 15 Punkten zu 18 Punkten im Follow Up 1 Visit und wieder zu 15,5 Punkten im Follow Up 2. Der zweite Proband zeigt eine durchgehend ansteigende Tendenz des SARA Scores über die 3 Visits: Für den Baseline Visit wurden 19 Punkte protokolliert, während des Follow Up 1 19,5 Punkte und während des Follow Up 2 21,5 Punkte (3. 25 C. In Abbildung 3.23 B sieht man, dass die beiden moderat ataktischen Probanden im Mittelwert die niedrigsten Ataxin-3 Konzentrationen aller untersuchten Gruppen aufweisen.

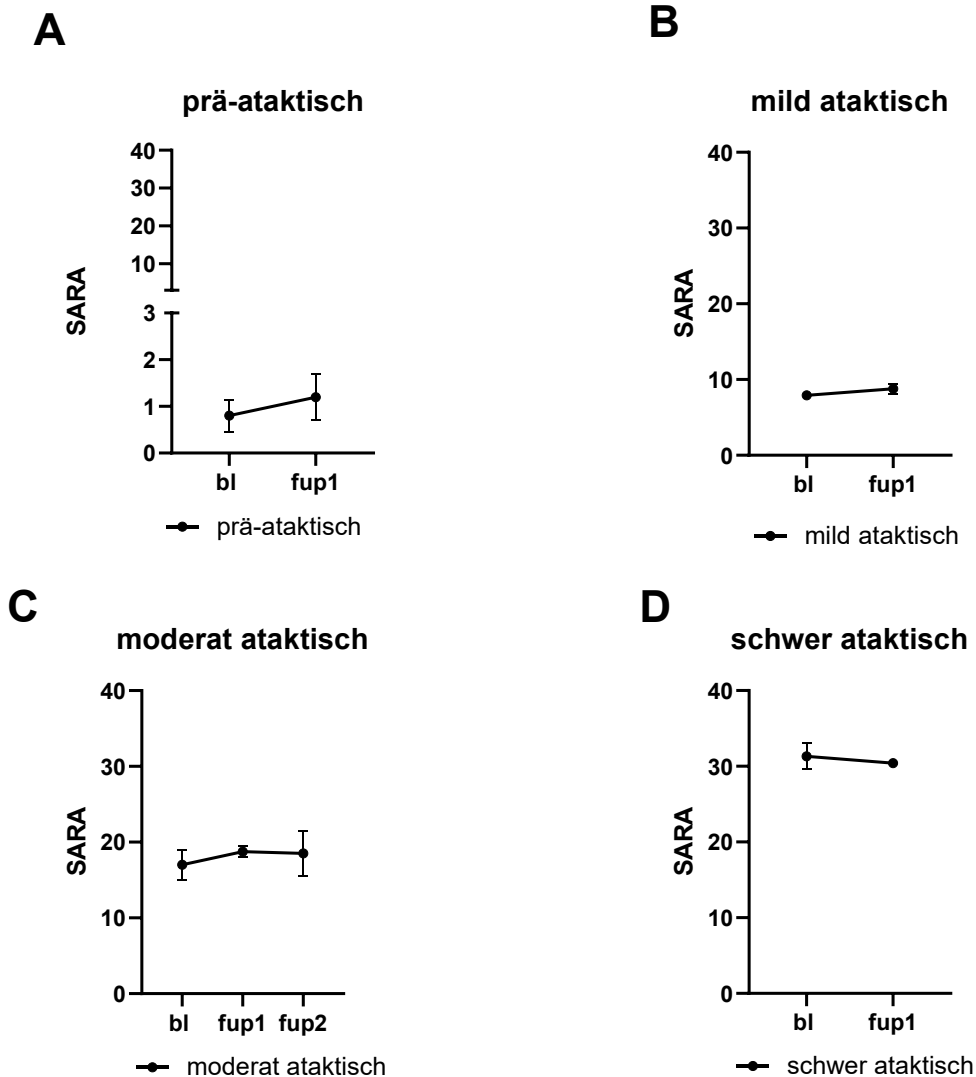
Für die longitudinale Auswertung der Ataxin-3 Werte der schwer ataktischen Probanden (SARA von bis angeben, die hier einsortiert wurden) standen n=5 Probanden zur Verfügung. Die schwer ataktischen Probanden weisen in der ersten Baseline Untersuchung im Mittelwert eine Ataxin-3 Konzentration von 91,413  $\Delta$ F auf und im Follow Up 1 Visit einen Wert von 33,43  $\Delta$ F. Daher Ataxin-3 Proteinlevel sinkt also im Mittelwert zwischen den beiden Untersuchung stark ab. Der SARA Score zeigte ebenfalls eine abnehmende Tendenz von 31,3 auf

30,4. Wie Abbildung 3.23 B zeigt, ist der Ataxin-3 Wert der schwer ataktischen Probanden im Mittelwert von allen Gruppen in der Baseline Kohorte der höchste Wert.

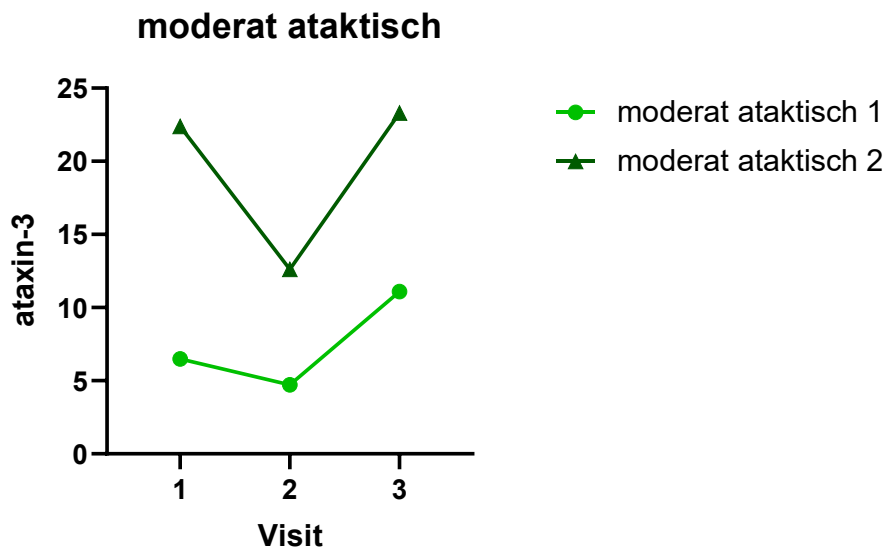


**Abbildung 3.24 A Ataxin-3 Konzentration der Kontrollprobanden:** Der Mittelwert der Ataxin-3 Konzentration lag für den Baseline Visit bei 37,67  $\Delta F$  und im Follow Up 1 Visit bei 18,21  $\Delta F$ . **B**

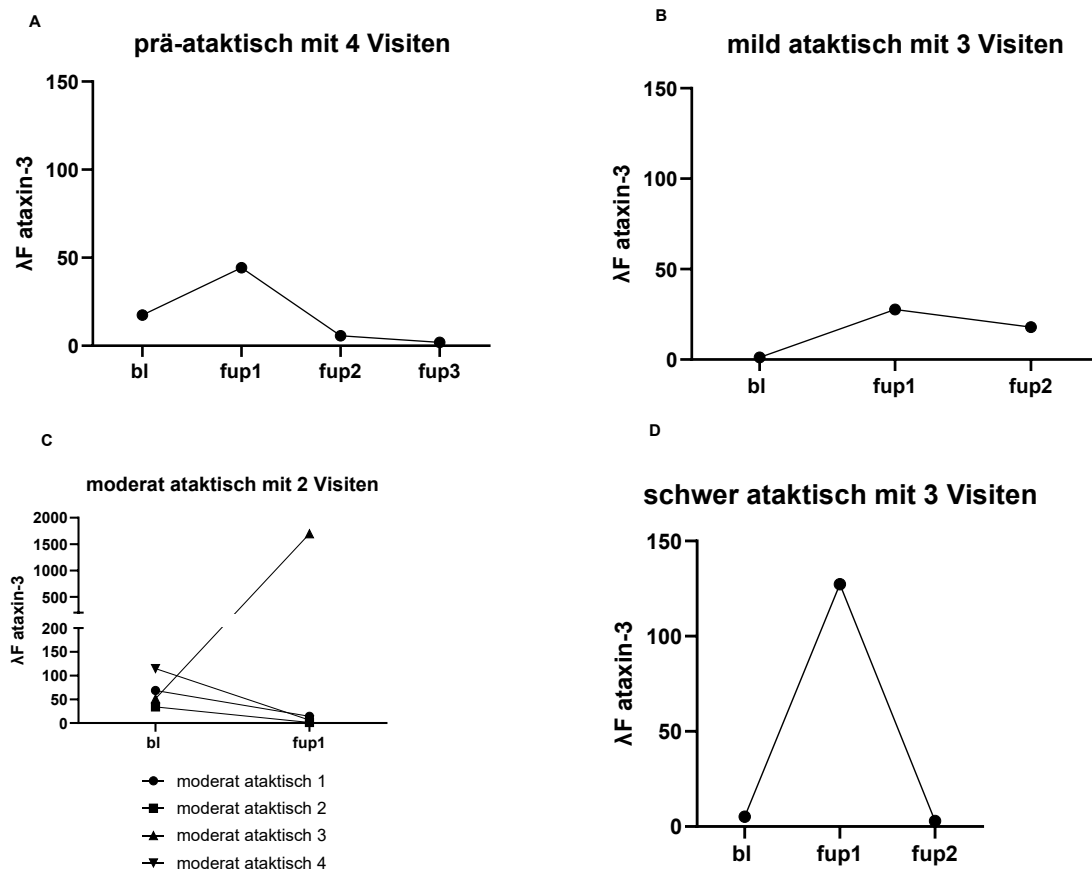
**Ataxin-3 Konzentration der prä-ataktischen Probanden:** Der Mittelwert der Ataxin-3 Konzentration lag für den Baseline Visit bei 10,15  $\Delta F$  und im Follow Up 1 Visit bei 9,05  $\Delta F$ . **C Ataxin-3 Konzentration der mild ataktischen Probanden:** Der Mittelwert der Ataxin-3 Konzentration lag für den Baseline Visit bei 26,09  $\Delta F$  und im Follow Up 1 Visit bei 38,9  $\Delta F$ . **D Ataxin-3 Konzentration der moderat ataktischen Probanden:** Der Mittelwert der Ataxin-3 Konzentration lag für den Baseline Visit bei 14,44  $\Delta F$  für den Follow Up 1 Visit bei 8,66  $\Delta F$  und für den Follow Up 2 Visit bei 17,19  $\Delta F$ . **E Ataxin-3 Konzentration der schwer ataktischen Probanden:** Der Mittelwert der Ataxin-3 Konzentration lag für den Baseline Visit bei 91,41  $\Delta F$  und sinkt im Follow Up 1 Visit auf 33,43  $\Delta F$  ab.



**Abbildung 3.25 A SARA Score prä-ataktische Probanden:** Der Mittelwert des SARA Scores der prä-ataktischen Probanden stieg von 0,8 Punkten in der Baseline Untersuchung auf 1,2 Punkte für den Follow Up 1 an. **B SARA Score mild ataktische Probanden:** Der Mittelwert des SARA Scores in der Baseline Untersuchung lag bei 7,927 Punkten. Für die Follow Up 1 Untersuchung wurde eine Punktzahl von 8,78 berechnet. **C SARA Score moderat ataktische Probanden:** Der Mittel Wert der SARA Scores der moderat ataktischen Probanden lag im Baseline Visit bei 17 Punkten, im Follow Up 1 Visit bei 18,75 Punkten und bei 18,5 Punkten im Follow Up 2 Visit. **D SARA Score schwer ataktische Probanden:** Der Mittelwert der schwer ataktischen Probanden in der Baseline Untersuchung lag bei 31,3 Punkten und im Follow Up 1 bei 30,4 Punkten.



**Abbildung 3.26: Ataxin-3-Werte der moderat ataktischen Probanden im longitudinalen Verlauf:** Die Proteinkonzentration von Proband moderat ataktisch 1 lag zunächst bei 6,49  $\Delta F$ , sank in Follow Up 1 auf 4,71  $\Delta F$  ab und stieg in Follow Up 2 wieder auf 11,08  $\Delta F$  an. Für den zweiten Probanden ergab sich in der Baseline Probe 22,39  $\Delta F$  in der Follow Up 1 Probe 12,613  $\Delta F$  und in der Follow Up 2 Probe 23,302  $\Delta F$ .



**Abbildung 3.27: Ataxin-3 Konzentration eines prä-ataktischen Probanden:** Der prä-ataktische Proband wurde über 4 Visiten untersucht, in diesem Zeitraum sank die full-length Ataxin-3 Konzentration von 17,462 ΔF auf 1,931 ΔF ab. **B Ataxin-3 Konzentration eines mild ataktischen Probanden:** Im longitudinalen Verlauf stieg die full-length Ataxin-3 Konzentration an, sodass für den Baseline Visit ein Wert von 1,187 ΔF gemessen wurde und für den Follow Up 2 Visit ein Wert von 17,925 ΔF. **C Ataxin-3 Konzentration moderat ataktischer Probanden mit 2 Visiten:** 3 der 4 untersuchten moderat ataktischen Probanden zeigten in der full-length Ataxin 3 Konzentration eine abnehmende Tendenz. **D Ataxin-3 Konzentration eines schwer ataktischen Probanden:** Die full-length Ataxin-3 Konzentration stieg im Follow Up 1 Visit sprunghaft auf 127,349 ΔF an und sank im Follow Up 2 Visit dann wieder ab.

Abbildung 3.27 A zeigt einen prä-ataktischen Probanden mit 4 Visiten. In dem Baseline Visit wurde ein Ataxin-3 Wert von 17,462 ΔF gemessen, im Follow Up 1 Visit 44,29 ΔF. Im Follow Up 2 Visit wurden 5,73 ΔF gemessen und im Follow Up 3 Visit 1,93 ΔF, die Konzentration sank also insgesamt im Verlauf ab.

Die Abbildung 3.27 B zeigt einen mild ataktischen Probanden mit 3 Visiten. In der ersten Baseline Probe wurde eine *full-length* Ataxin-3 Konzentration von 1,187 ΔF gemessen. In der Follow Up 1 Visite wurde eine Konzentration von 27,702 ΔF

gemessen. Der full-length Ataxin-3 Wert sank in der Follow Up 2 Visite wieder ab, auf eine Konzentration von 17,925  $\Delta F$ .

Abbildung 3.27 C demonstriert 4 moderat ataktische Probanden mit jeweils 2 Visits. Der Proband moderat ataktisch 1 zeigte ein Absinken der Ataxin-3 Konzentration von 68,61  $\Delta F$  auf 14,21  $\Delta F$  in der Follow Up 1 Probe. Auch bei dem Probanden moderat ataktisch 2 war ein Absinken der Ataxin-3 Konzentration zu beobachten von 33,97  $\Delta F$  auf 1,39  $\Delta F$  im Follow Up 1 Visit. Für den Probanden moderat ataktisch 3 ist ein Ansteigen der Ataxin-3 Konzentration zu beobachten: In der Baseline Probe wurde eine Konzentration von 51,32  $\Delta F$  gemessen, die auf einen Wert von 1697,656  $\Delta F$  im Follow Up 1 ansteigt. Bei dem Probanden moderat ataktisch 4 wurden die Ataxin-3 Konzentrationen 114,87  $\Delta F$  und 6,17  $\Delta F$  gemessen.

Abbildung 3.27 D zeigt den Verlauf der *full-length* Ataxin-3 Konzentration im Verlauf über 3 Visiten bei einem schwer ataktischen Probanden. Die Proteinkonzentration in dem Baseline Visit lag bei 5,20  $\Delta F$ . Im Follow Up 1 stieg die Konzentration stark an und lag bei 127,34  $\Delta F$ . Im Follow Up 2 wurde die Konzentration dann wieder bei 2,92  $\Delta F$  gemessen.

Als Nächstes wurden die Konverter analysiert: Abbildung 3.28 A zeigt die 4 Konverter, die zwischen Baseline und Follow Up 1 Visit von mild ataktisch Krankheitszustand zum moderat ataktisch wechseln. Die Ataxin-3 Konzentration von Konverter 1 sinkt von 10,68  $\Delta F$  im Baseline Visit auf 6,87  $\Delta F$  im Follow Up Visit 1 ab. Ähnlich verhält sich auch Konverter 2, dessen *full-length* Ataxin-3 Konzentration von 17,20  $\Delta F$  im Baseline Visit auf 10,20  $\Delta F$  im Follow Up 1 Visit absinkt. Für Konverter 3 steigt die Ataxin-3 Konzentration in den PBMCs stark an von 4,93  $\Delta F$  auf 22,68  $\Delta F$  im Follow Up 1 Visit. Auch Konverter 4 zeigt vom Baseline Visit zum Follow Up 1 Visit eine ansteigende Proteinkonzentration von 8,27  $\Delta F$  auf 10,73  $\Delta F$ .

Abbildung 3.28 B demonstriert die 4 Konverter, die im Beobachtungszeitraum von prä-ataktisch zu mild ataktisch wechseln, diese Probanden erkrankten also im Beobachtungszeitraum klinisch an der Spinocerebellärer Ataxie Typ 3. Konverter 1 zeigte ein Absinken der Ataxin-3 Konzentration im zeitlichen Verlauf

von 15,61  $\Delta F$  auf 2,14  $\Delta F$ . Konverter 2 hatte zum Zeitpunkt der Baseline Untersuchung eine Ataxin-3 Konzentration von 5,69  $\Delta F$  und eine Konzentration von 4,99  $\Delta F$  im Verlauf. Die Baseline Probe von Konverter 3 enthielt eine Gesamt Ataxin-3 Konzentration von 3,87  $\Delta F$ , die auf einen Wert von 43,02  $\Delta F$  im Follow Up 1 Anstieg. In der PBMC Probe von Konverter 4 wurde zum Zeitpunkt der Baseline Untersuchung eine Ataxin-3 Konzentration von 57,96  $\Delta F$  gemessen, die im Follow Up 1 auf einen Wert von 1,01  $\Delta F$  absank.

Insgesamt 3 Konverter in der Kohorte veränderten sich in der klinischen Einschätzung so, dass sie von der Kategorie mild ataktisch wieder in die Kategorie prä-ataktisch wechselten, da ihr SARA Score unter 3 Punkte absank (Abb 3.28 C). Für Konverter 1 wurden in der Baseline Probe 14,75  $\Delta F$  gemessen und in der Follow Up 1 Probe 13,61  $\Delta F$  mit dem n-Term Assay gemessen. Die Konzentration an Ataxin-3 sank für Konverter 2 von 23,80  $\Delta F$  auf 9,45  $\Delta F$  ab. Für den Konverter 3 ergab die erste Messung der Proteinkonzentration 41,64  $\Delta F$  und die zweite Messung 13,37  $\Delta F$ .

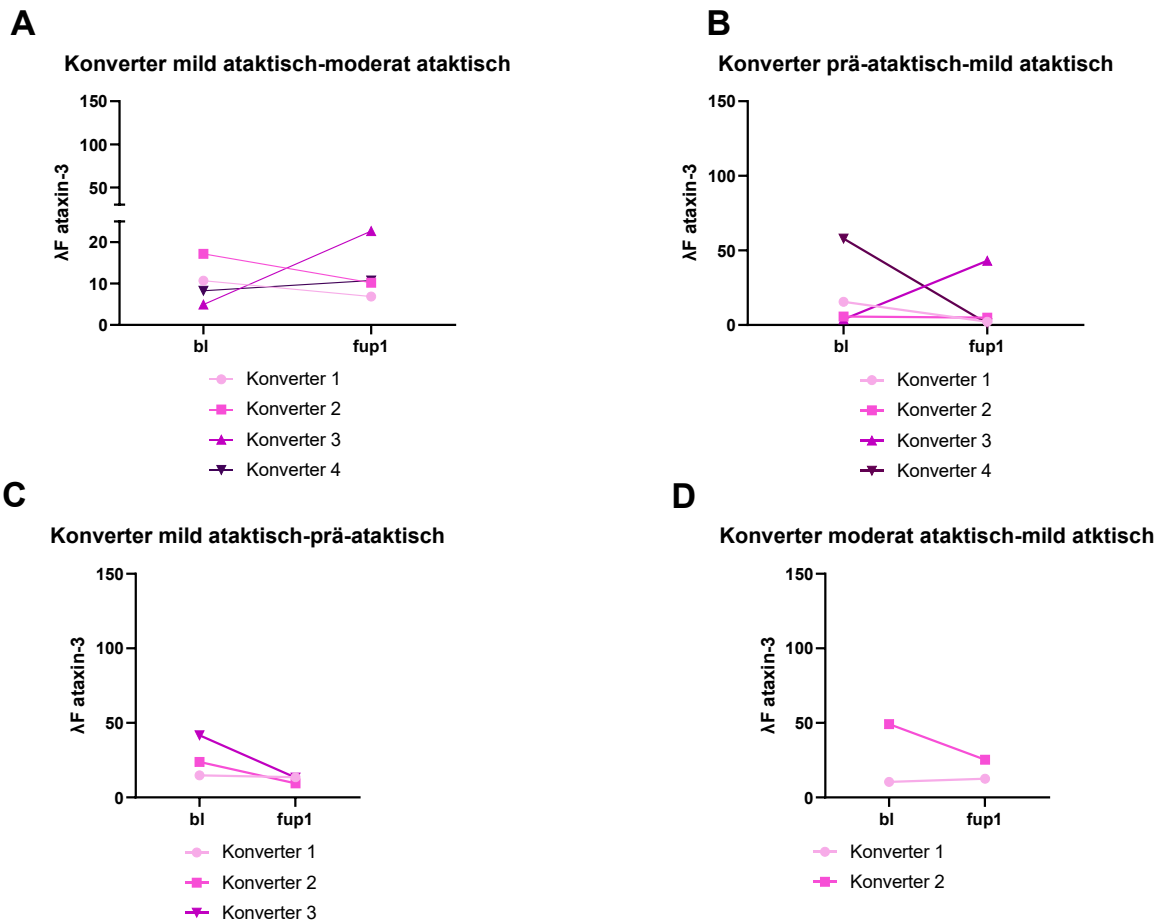
Abbildung 3.28 D zeigt die Konverter, die sich in der klinischen Einschätzung so verändert haben, dass sie in der Baseline auf moderat ataktisch und in der Follow Up 1 Untersuchung anhand des SARA Scores auf mild ataktisch beurteilt werden. Der Ataxin-3 Wert in Konverter 1 steigt von 10,38  $\Delta F$  in der Baseline Probe auf 12,59  $\Delta F$  im Follow Up 1 an. Die Konzentration an full-length Ataxin-3 sinkt bei Konverter 2 von 49,17  $\Delta F$  auf 25,28  $\Delta F$  ab.

Die beiden Konverter, die in Abbildung 3.29 dargestellt sind, wechseln von der Kategorie moderat ataktisch in die Kategorie schwer ataktisch im Beobachtungszeitraum. Konverter 1 in Abbildung 3.29 A hat 2 Datenpunkte für 2 Visiten, während für Konverter 2 (dargestellt in Abbildung 3.29 B) die Werte für 3 Visiten vorlagen. Konverter 1 sank im Verlauf von einer Ataxin-3 Konzentration von 124,01  $\Delta F$  auf 12,56  $\Delta F$  ab. Für Konverter 2 wurde im Baseline Visit 2,42  $\Delta F$  gemessen in Follow Up 1 33,22  $\Delta F$  und in Follow Up 2 0,04  $\Delta F$ .

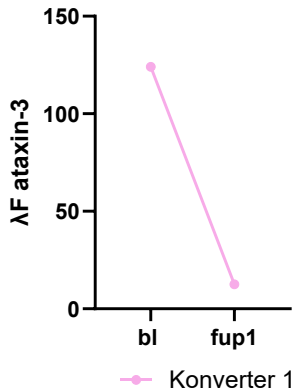
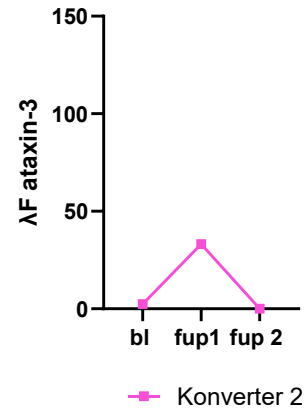
Abbildung 3.30 A zeigt einen Konverter mit 4 Visits. In der Baseline Probe des Konverter 1 wurde zunächst eine Ataxin-3 Konzentration von 5,81  $\Delta F$  gemessen. Für den Follow Up 1 Visit wurden 66,40  $\Delta F$  gemessen. In Follow Up 2 und Follow

Up 3 wurden mit jeweils 3,62  $\Delta F$  und 17,22 wieder niedrigere Konzentrationen festgestellt. Der SARA Score stieg von ursprünglich 2 Punkten auf 3,5 Punkte beim Follow Up 1 Visit, womit sich der Proband als symptomatisch, also ataktisch qualifiziert. In Follow Up 2 sank der SARA Score wieder auf einen Wert von 0 Punkten ab und war auch im Follow Up 3 Visit mit 1 Punkt wieder der Kategorie prä-ataktisch zu zuordnen.

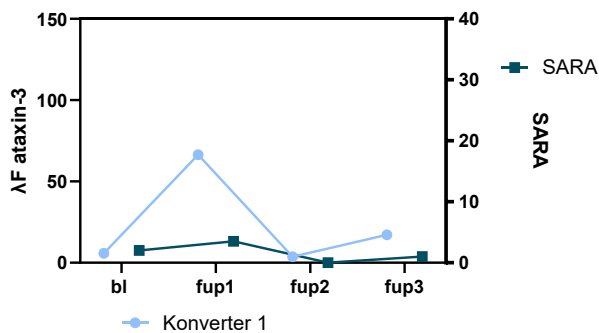
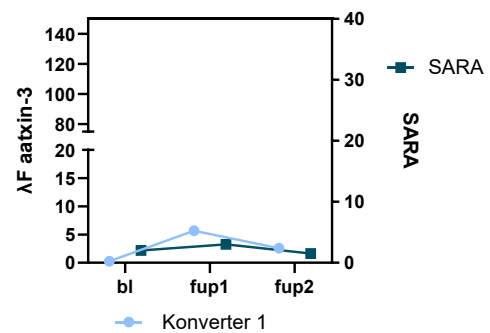
Abbildung 3.30 B zeigt einen Konverter, bei dem Daten für 3 Visiten vorliegen. Zu sehen ist ein Anstieg der *full-length* Ataxin-3 Konzentration von 0,25  $\Delta F$  in der Baseline Untersuchung auf 5,66  $\Delta F$  in der Follow Up 1 Untersuchung. Für den Follow Up 2 Visit wurde eine *full-length* Ataxin-3 Konzentration von 2,57  $\Delta F$  mit dem n-Term Assay gemessen. Der SARA Score von ursprünglich 2 Punkte stieg zunächst leicht an auf 3 Punkte, sank jedoch klinisch wieder auf 1,5 Punkte in der Evaluation ab.



**Abbildung 3.28 A Konverter mild ataktisch zu moderat ataktisch:** Die Konverter mit einer klinischen Progression von mild ataktisch zu moderat ataktisch über 2 Visiten zeigen im Verlauf des full-length Ataxin-3 ein unterschiedliches Verhalten. Konverter 1 und 2 zeigen ein Absinken der Proteinkonzentration, Konverter 3 und 4 ein Ansteigen der Konzentration an full-length Ataxin-3. **B Konverter prä-ataktisch zu mild ataktisch:** Der Verlauf des full-length Ataxin-3 der 4 Konverter, welche sich klinisch von prä-ataktisch zu mild ataktisch entwickeln. **C Konverter mild-ataktisch zu prä-ataktisch:** Die 3 Konverter zeigen alle ein Abfallen der full-length Ataxin-3 Konzentrationen im Verlauf vom Baseline Visit zum Follow Up 1 Visit. **D Konverter moderat ataktisch zu mild ataktisch:** Die Abbildung zeigt den Verlauf des full-length Ataxin-3 der beiden Konverter, die ihre Kategorie von moderat ataktisch zu mild ataktisch verändern.

**A****Konverter moderat-schwer****B****Konverter moderat-schwer-schwer**

**Abbildung 3.29 A Konverter 1 moderat-zu schwer ataktisch:** Die Proteinkonzentration an Ataxin-3 sinkt im Untersuchungsverlauf stark ab, von 124,01  $\Delta F$  auf 12,56  $\Delta F$ . **B Konverter 2 moderat zu schwer ataktisch:** Der Konverter 2 wurde über 3 Visiten verfolgt und die Ataxin-3 Konzentration gemessen (Baseline: 2,42  $\Delta F$ ; Follow Up 1: 33,22  $\Delta F$ ; Follow Up 2: 0,047  $\Delta F$ ).

**A****Konverter prä-ataktisch-mild ataktisch- prä-ataktisch-prä-ataktisch****B****Konverter prä-ataktisch-mild ataktisch-prä-ataktisch**

**Abbildung 3.30 A Konverter 1 prä-ataktisch zu mild ataktisch:** Die Abbildung zeigt den Verlauf der full-length Ataxin-3 Konzentration und des SARA Scores von Konverter 1 vom Zeitpunkt der Baseline Visite bis zur Follow Up 3 Untersuchung. In diesem Zeitraum änderte sich der klinische SARA Score um insgesamt 3,5 Punkte (Follow Up 1: 3,5 Punkte; Follow Up 2: 0 Punkte). **B Konverter 2 prä-ataktisch zu mild ataktisch:** Die full-length Ataxin-3 Konzentration stieg zunächst leicht auf 5,65  $\Delta F$  an und sank dann wieder auf 2,57  $\Delta F$  ab, der SARA Score von Konverter 2 zeigte einen ähnlichen Verlauf und sank von 3 Punkten im Follow Up 1 wieder auf einen Wert von 1,5 Punkte ab.

Insgesamt lässt sich sagen, dass im longitudinalen Studiendesign keine eindeutige Tendenz der Gesamt-Ataxin-3 Konzentration nachzuweisen war und sowohl steigende als auch fallende Konzentrationen individuell beobachtet werden konnten.

### 3.5 Expandiertes Ataxin-3 im Simoa Assay im longitudinalen Studiendesign

#### 3.5.1 Kohortenanalyse in der Follow Up 1 Kohorte

Für die Follow Up 1 Kohorte des Singulex Assays wurden insgesamt n=30 Probanden untersucht. Die Kohorte setzte sich aus n=4 Kontrollprobanden, n=1 einem prä-ataktischen Probanden und n=25 ataktischen Probanden zusammen. Für das AAO lagen jedoch nur Daten von n=24 Probanden vor und für die Bestimmung der Zeit zwischen BL-Fup1 von n=21 Probanden. Es wurde eine deskriptive Statistik durchgeführt, bei der jeweils der Median und der Interquartilenabstand bestimmt wurden (Tabelle 29). Für den einzelnen prä-ataktischen Probanden wurden in Tabelle 29 die Werte ebenfalls angegeben, jedoch ohne Median oder Interquartilenbestimmung. Für die Simoa-Kohorte wurden für das longitudinale Studiendesign nur Daten der Baseline und des Follow Up 1 verwendet, da für das Follow Up 2 und 3 keine Untersuchungen vorlagen.

Tabelle 29 Kohortenanalyse der Follow Up 1 Kohorte

SIMOA	KONTROLLEN	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL (ANTEIL WEIBLICH)</b>	4 (50 %)	1 (100 %)	25 (52 %)
<b>ALTER</b>	45,5 (24,25-66,75)	41	53 (41-61,5)
<b>AAO</b>	-	-	40,5 (31,5-48,5)
<b>CAG-WIEDERHOLUNGEN IM EXPANDIERTEN ALLEL</b>	-	62	70 (65-71,5)
<b>INAS</b>	0	1	5 (3,5-7,5)
<b>SARA</b>	0 (0-1,25)	2	11 (7,5-18,25)
<b>ZEIT BL-FUP1 IN MONATEN</b>	14,4 (12,13-15,1)	14	13 (12-14)

Die Gruppe der Kontrollprobanden setzt sich zusammen aus 2 männlichen und 2 weiblichen Probanden, was einem Frauenanteil von 50 % entspricht. Der einzige Proband der prä-ataktischen Gruppe ist weiblich, womit diese Gruppe mit 100 % den höchsten Frauenanteil hat. Die ataktischen Probanden haben einen Frauenanteil von 52 %.

Das mediane Alter der Kontrollprobanden entspricht 45,5 Jahre mit einem Interquartilenabstand von 24,25 - 67,75 Jahren. Die prä-ataktische Probandin ist 41 Jahre alt. Statistisch am ältesten sind die ataktischen Probanden mit einem Median von 53 Jahren (IQA 41-61,5). Das AAO in der ataktischen Gruppe lag bei 41 Jahren mit einem Interquartilenabstand von 33-47 Jahren.

Der SARA Score der Kontrollprobanden liegt im Median bei 0 Punkten (IQA 0-1,25), während die prä-ataktische Probandin einen SARA Score von 2 Punkten hat. Mit 10,75 Punkten im Median haben die ataktischen Probanden den höchsten SARA Score. Der Interquartilenabstand beträgt 7,5-18,25 Punkten.

Die prä-ataktische Probandin hat ein expandiertes *CAG Repeat* von 62 CAG Wiederholungen. Die 28 ataktischen Probanden haben im Median ein *CAG Repeat* von 70 Wiederholungen (IQA 65-71,5).

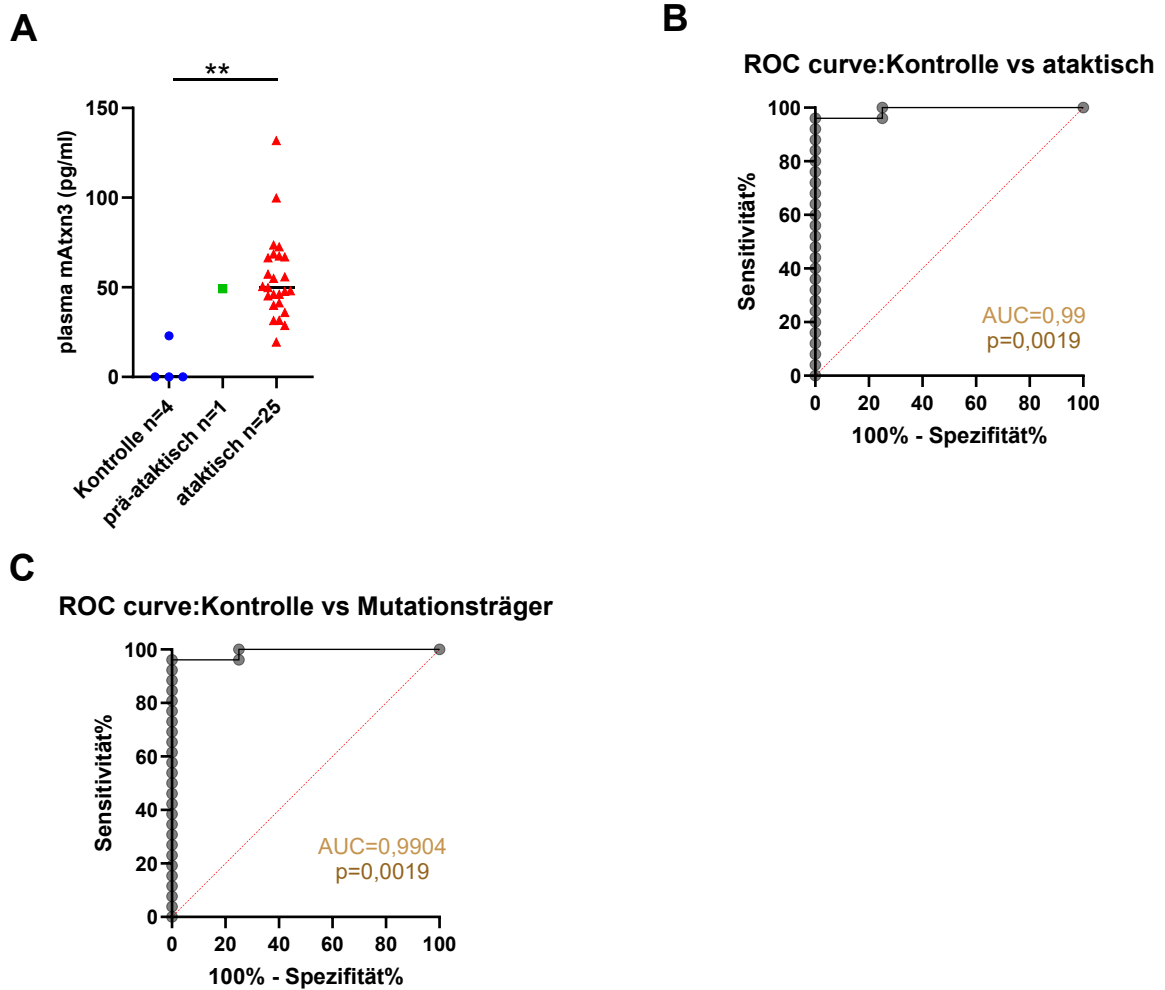
Die Kontrollprobanden haben alle einen INAS Score von 0 Punkten. Die prä-ataktische Probandin hat einen INAS Score von 1 Punkt. Der INAS Score der ataktischen Mutationsträger liegt im Median bei 5 (IQA 3,5-7,5).

In der Kategorie Zeit bl-fup1 in der Tabelle 4.8 wird angegeben, wie viele Monate zwischen der Baseline Untersuchung und der Follow Up 1 Untersuchung lagen. Zwischen der Baseline Untersuchung der Kontrollprobanden lagen im Median 14,4 Monate mit einem Interquartilenabstand von 12,13-15,1 Monaten. Für die prä-ataktische Probandin lag der zeitliche Abstand zwischen dem Baseline und dem Follow Up 1 bei 14 Monaten. Für die ataktischen Probanden lag der zeitliche Abstand zwischen dem Baseline Visit und dem Follow Up 1 Visit bei 13 Monaten

im Median (IQA 12-14), die ataktischen Probanden hatten also im Vergleich den kürzesten Abstand zwischen den beiden ausgewerteten Probenentnahmen.

### **3.5.2 Statistische Analyse der Ataxin-3 Proteinlevel und klinischen Parameter**

Für die 30 Probanden der Follow Up 1 Kohorte der Simoa Gruppe wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt, um die Ataxin-3 Werte der Kontrollen sowie der prä-ataktischen und ataktischen Probanden zu vergleichen. Der Kruskal-Wallis Test für den Vergleich der Kontrollprobanden mit den ataktischen Probanden ist statistisch signifikant mit einem  $p=0,0056$ . Auf einen Vergleich zu dem prä-ataktischen Probanden wird verzichtet, da ein einzelner Proband statistisch nicht aussagekräftig wäre. Abbildung 3.31 B zeigt die ROC Curve für die Differenzierung der Kontrollprobanden ( $n=4$ ) und ataktischen Probanden ( $n=24$ ). Die ROC Curve ergibt eine  $AUC=0,99$  mit einem  $p=0,0019$ . Die ROC Curve in Abbildung 3.31 C ergibt für den Vergleich Kontrolle ( $n=4$ ) vs Mutationsträger ( $n=25$ ) eine  $AUC=0,9904$  mit  $p=0,0019$ .



**Abbildung 3.31 A Vergleich der expandierten Ataxin-3:** Der Vergleich der ataktischen und Kontrollprobanden ist statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test;  $p=0,0056$ ) **B ROC Curve Kontrollen vs ataktisch:** Die ROC Curve ergibt eine AUC = 0,99 für die Differenzierung zwischen Kontrollen und ataktischen Probanden. **C ROC Curve Kontrolle vs Mutationsträger:** Die ROC Curve für die Kontrollen vs Mutationsträger ergibt AUC=0,9904.

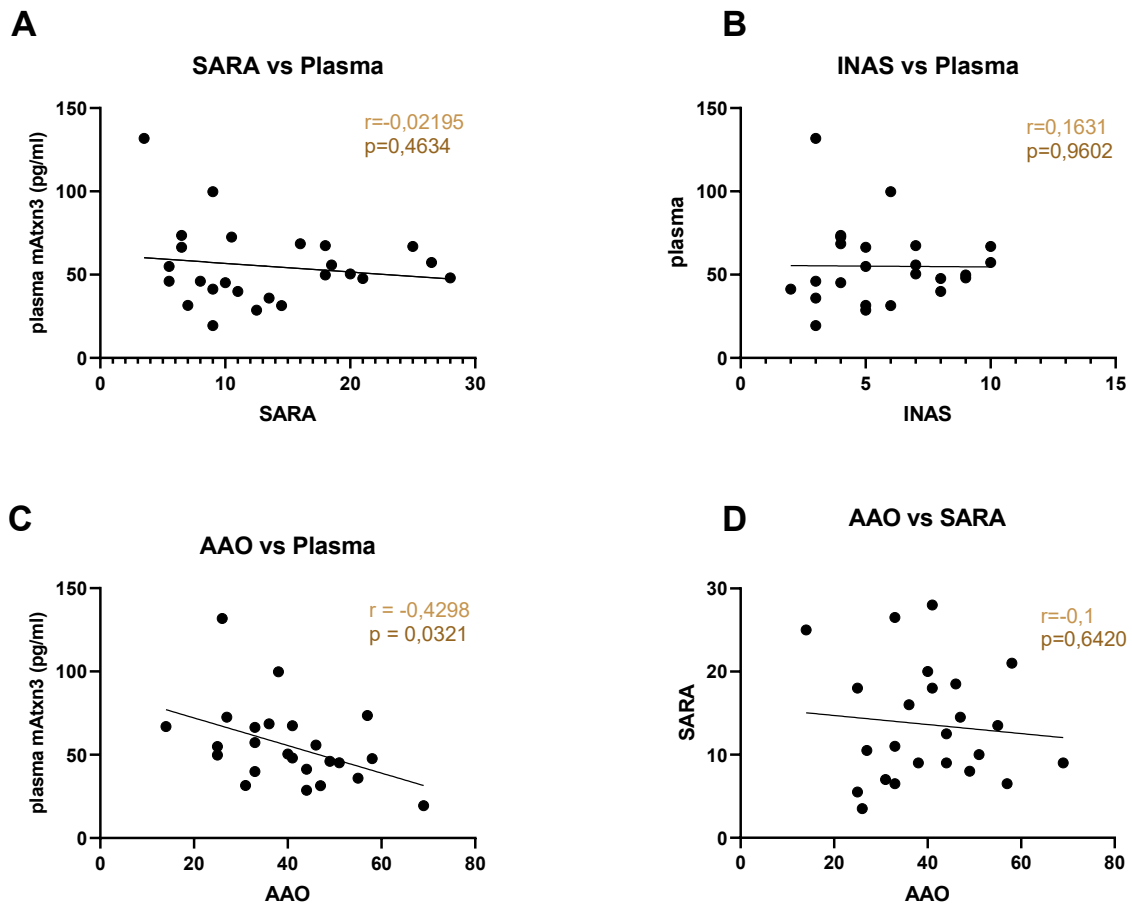
Es wurden die gemessenen Proteinlevel an Ataxin-3 mit dem gemessenen SARA Score korreliert. Der Datensatz war nicht normalverteilt (Shapiro-Wilks Test;  $p=0,008$ ). Die durchgeführte lineare Regression ergab einen P-Wert  $p=0,4634$  und ist damit statistisch nicht signifikant (Abb 3.32 A). Der Spearman Wert beträgt  $r=-0,02249$ .

Die Abbildung 3.32 B zeigt die Korrelation zwischen dem INAS Score der ataktischen Probanden und den Ataxin-3 Plasma Werten. Der durchgeführte Shapiro Wilks Test auf Normalverteilung ergab  $p=0,008$ , also keine Normalverteilung für die Daten. Es ergab sich in der linearen Regression kein

statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Variablen ( $p=0,9602$ ). Auch der Spearman-Koeffizient ist statistisch nicht signifikant mit  $r=0,1632$ .

Es wurden die klinisch erhobenen AAO Daten der ataktischen Probanden mit den durch den Simoa Assay gemessenen Konzentrationen an expandiertem Ataxin-3 korreliert. Durch den Shapiro Wilks Test war keine Normalverteilung festzustellen ( $p=0,008$ ). Der statistische Zusammenhang des AAO und des Ataxin-3 Levels ist signifikant, in der linearen Regression wurde ein P-Wert  $p=0,0321$  berechnet. Der Spearman Korrelationskoeffizient beträgt  $r=-0,4298$ . Grafisch wird die hier berechnete Korrelation in Abbildung 3.32 C gezeigt.

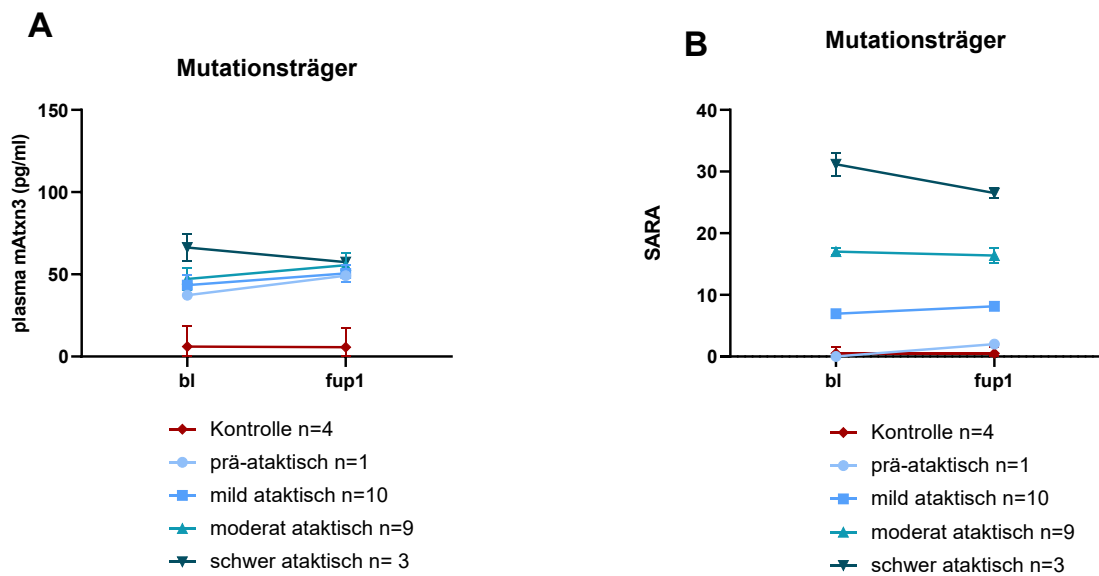
In Abbildung 3.32 D wird das AAO mit dem SARA Score der ataktischen Probanden korreliert. Der Shapiro-Wilks Test ergab für den SARA Score  $p=0,0908$ , somit ist der Datensatz normalverteilt. Auch der Datensatz für das AAO ist laut Shapiro-Wilks Test normalverteilt ( $p=0,9914$ ), die lineare Regression ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,6420$ ). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt  $r= -0,1$ .



**Abbildung 3.32** **A SARA vs expandiertes Ataxin-3 im Plasma:** Die durchgeführte lineare Regression ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,4634$ ). **B INAS vs expandiertes Ataxin-3:** Der INAS Score und das expandierte Ataxin-3 haben statistisch keinen signifikanten Zusammenhang ( $p=0,9602$ ). **C AAO vs expandiertes Ataxin-3 im Plasma:** Der statistische Zusammenhang zwischen AAO und Plasma ist statistisch signifikant ( $p=0,0321$ ). **D AAO vs SARA Score:** Die lineare Regression des AAO mit dem SARA Score ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,6420$ ).

### 3.5.3 Longitudinale Analyse in der Simoa Assay Kohorte

Für die 30 Probanden der Simoa-Kohorte, für die es eine Baseline Visit und eine Follow Up Visit gab, wurde eine longitudinale Analyse durchgeführt. Abbildung 3.33 A zeigt den longitudinalen Verlauf der Ataxin-3 Proteinkonzentration für die Baseline Visit und die Follow Up 1 Visit. Abbildung 3.33 B zeigt den longitudinalen Verlauf des SARA Scores derselben Kohorte für die Baseline und die Follow Up 1 Visit. In den beiden Abbildung werden die Daten der 27 Probanden ausgewertet, die im Beobachtungszeitraum die Kategorie, in die sie abhängig von ihrem SARA Score im Baseline Visit eingeteilt wurden, nicht gewechselt haben.



**Abbildung 3.33 A Ataxin-3 Konzentration in den Mutationsträgern longitudinal:** Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 der 27 Probanden wurde longitudinal für den Verlauf zwischen Baseline und Follow Up 1 Visit ausgewertet. **B SARA Score in den Mutationsträgern longitudinal:** Der SARA Score der 27 Probanden wurde longitudinal für den Verlauf zwischen Baseline und Follow Up 1 ausgewertet.

Es gibt 4 Kontrollprobanden mit einer Baselineuntersuchung und einem Follow Up in der Simoa-Gruppe. Das Intergrundsignal in den Proben der Kontrollprobanden lag sowohl in der Baseline Visite als auch in der Follow Up Visite unter der geringsten messbaren ATXN3-Proteinmenge (lower limit of detection, LLoD), da Kontrollen kein expandiertes ATXN3 beinhalten (Abbildung 3.34 A). Der SARA Score liegt für beide Untersuchungszeiträume im Mittelwert bei 0,5 Punkten (Abbildung 3.35 A).

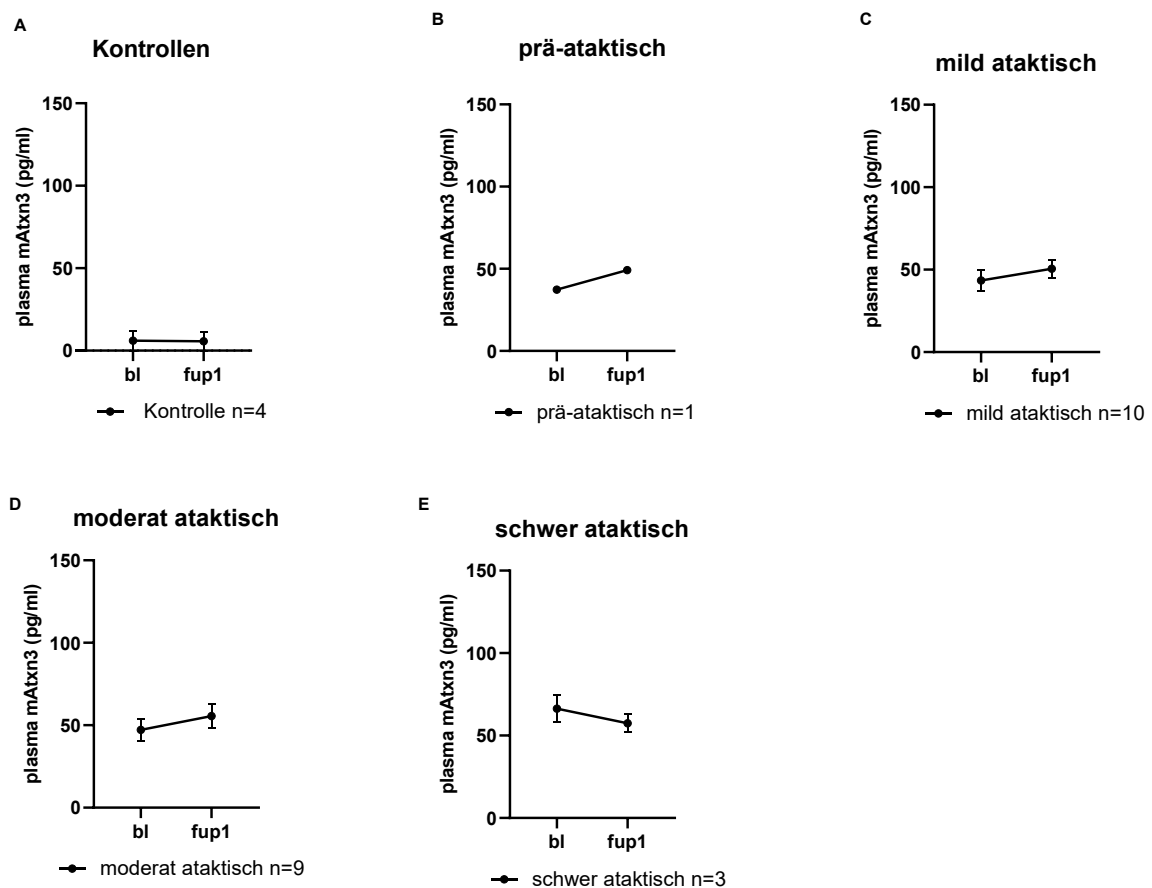
Für das longitudinale Studiendesign gab es einen prä-ataktischen Probanden (SARA kleiner 3) in der Simoa-Kohorte. Bei dieser Probandin stieg die Proteinkonzentration von 37,25 pg/ml im Baseline Visit auf 49,22 pg/ml an (Abbildung 4.34 B). Der SARA Score stieg von einem ursprünglich protokollierten Wert von 0 Punkten auf 2 Punkten an (Abbildung 3.35 B).

Es wurden n=10 mild ataktische Probanden (SARA zwischen 3 und 12) im longitudinalen Studiendesign untersucht. Das Level an Ataxin-3 steigt von 43,48 pg/ml auf 50,53 pg/ml (Abbildung 3.34 C). Im Beobachtungszeitraum steigt auch

der Mittelwert des SARA Scores von 6,75 pg/ml auf 8,15 pg/ml (Abbildung 3.35 C).

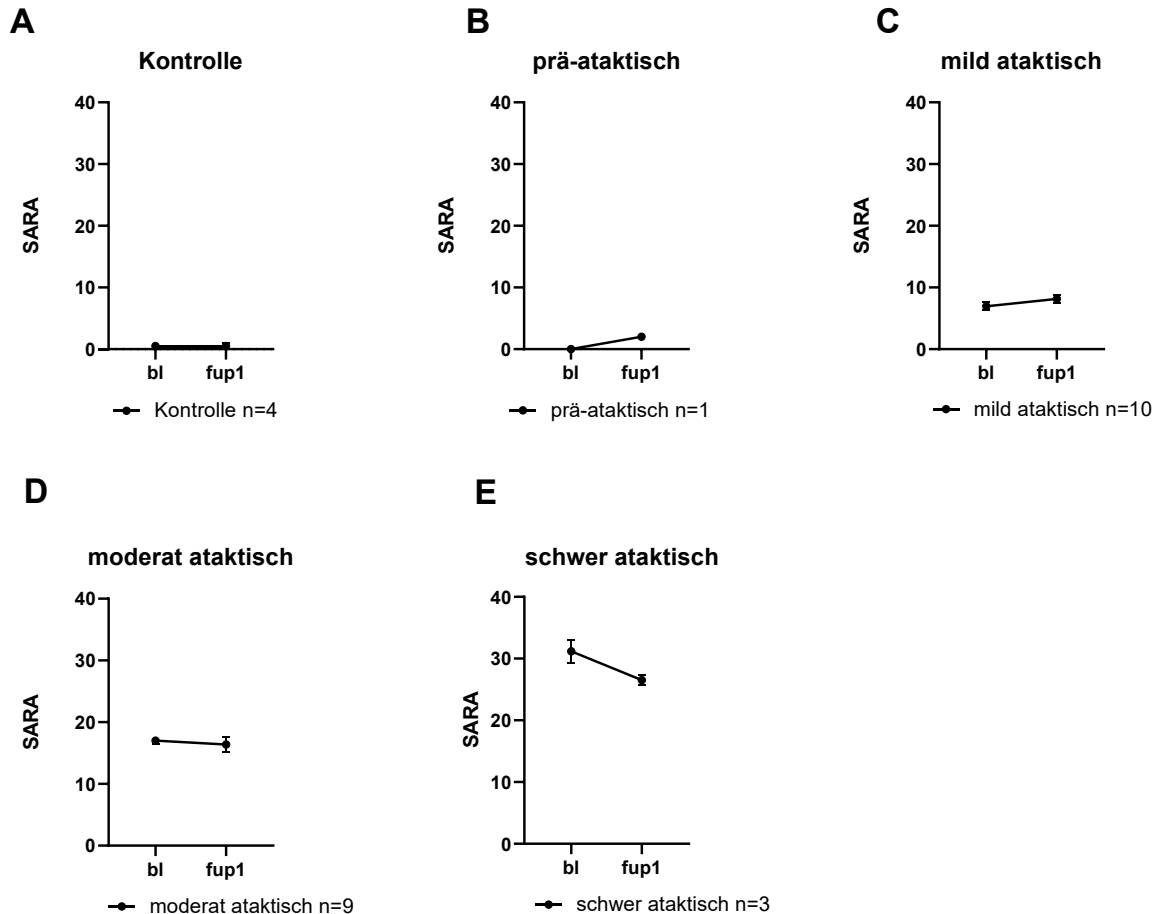
Es wurden n=9 moderat ataktische Probanden (SARA von 12 – 23) ausgewertet. Für die Ataxin-3 Konzentration in der Baseline Visite wurde ein Mittelwert der Probanden von 47,14 pg/ml bestimmt. Dieser Wert steigt im Follow Up 1 Visit auf 55,54 pg/ml an (Abbildung 3.34 D). Der SARA Score beträgt im Mittelwert in der Baseline Untersuchung 17 Punkte und sinkt leicht auf 16,38 Punkte im Follow Up 1 Visit ab (Abbildung 3.35 D).

Im longitudinalen Studiendesign wurden 3 schwer ataktische Probanden (SARA f – g) untersucht. Der Mittelwert der Ataxin-3 Konzentration lag im Baseline Visit bei 66,31 pg/ml. Im Follow Up 1 Visit lag der Mittelwert bei 57,42 pg/ml (Abbildung 3.34), gleichzeitig sank der SARA Score in diesem Zeitraum ab.



**Abbildung 3.34 A Ataxin-3 Konzentration in Kontrollen longitudinal:** Der Mittelwert der Konzentration an expandiertem Ataxin-3 sinkt von 6,097 pg/ml auf 5,723 pg/ml ab. **B Ataxin-3 Konzentration der prä-ataktischen Probanden longitudinal:** Die Ataxin-3 Konzentration beträgt im Baseline 37,25 pg/ml und im Follow Up 1 Visit 49,22 pg/ml. **C Ataxin-3 Konzentration**

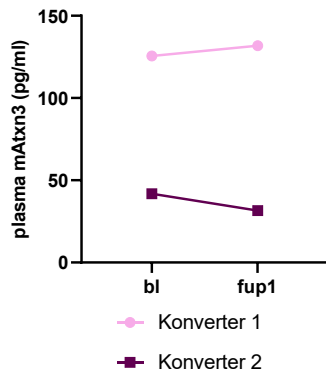
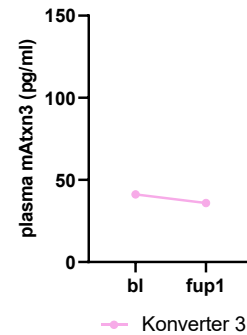
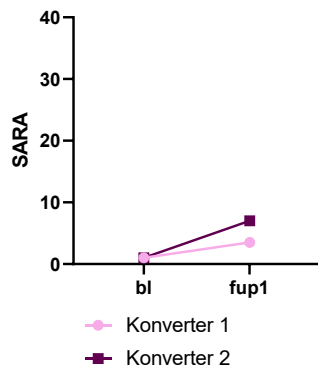
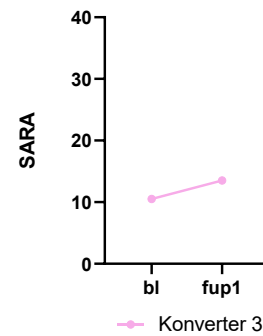
**in mild ataktischen Probanden longitudinal:** Der Mittelwert der Proteinkonzentration im Plasma der Probanden steigt von 43,48 pg/ml im Baseline Visit auf 50,53 pg/ml im Follow Up 1 Visit. **D Ataxin-3 Konzentration in moderat ataktischen Probanden longitudinal:** Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 steigt im zeitlichen Verlauf von 47,14 pg/ml auf 55,54 pg/ml an. **E Ataxin-3 Konzentration in schwer ataktischen Probanden longitudinal:** Die schwer ataktischen Probanden haben im Mittelwert im Baseline Visit eine Konzentration von Ataxin-3 von 66,51 pg/ml und im Follow Up 1 Visit von 57,42 pg/ml.



**Abbildung 3.35 A SARA Score der Kontrollen longitudinal:** Der SARA Score liegt im Baseline Visit und im Follow Up 1 Visit bei jeweils einem Mittelwert von 0,5 Punkten. **B SARA Score der prä-ataktischen Probandin longitudinal:** Der SARA Score steigt von 0 Punkten auf 2 Punkten im Follow Up 1 Visit an. **C SARA Score der mild ataktischen Probanden longitudinal:** Der Mittelwert der mild ataktischen Probanden steigt von 6,95 Punkten auf 8,15 Punkte. **D SARA Score der moderat ataktischen Probanden longitudinal:** Im Baseline Visit beträgt der Mittelwert 17 Punkte und im Follow Up 1 Visit 16,38 Punkte. **E SARA Score der schwer ataktischen Probanden longitudinal:** Im Baseline Visit beträgt der SARA Score im Mittelwert 31,16 Punkte und im Follow Up 1 Visit 26,5 Punkte.

Die Abbildung 3.36 zeigt die Daten der 3 Konverter, die also zwischen Baseline Visit und Follow Up 1 Visit sich klinisch so verändert haben, dass sie einer

anderen Kategorie (prä-ataktisch; mild ataktisch; moderat ataktisch; schwer ataktisch) zugeordnet wurden. Abbildung 3.36 A zeigt die beiden Mutationsträger, die im Beobachtungszeitraum symptomatisch wurden, also von prä-ataktisch in den ataktischen Zustand übergegangen sind. In der Probe von Konverter 1 wurde im Baseline Visit 125,51 pg/ml an expandiertem Ataxin-3 gemessen. Im Follow Up 1 wurde eine Konzentration von 131,82 pg/ml gemessen (Abbildung 4.36 A) auc. Im Beobachtungszeitraum stieg der SARA Score von 1 Punkt auf 3,5 Punkte an (Abbildung 3.36 C). Die Ataxin-3 Konzentration des Konverter 2 sank in der Baseline Untersuchung von einem Wert von 41,75 pg/ml auf einen Wert von 31,61 pg/ml ab (Abbildung 3.36 A). In diesem Zeitraum stieg der SARA Score des Konverter 2 von 1 Punkt auf 7 Punkte im Follow Up 1 an (Abbildung 3.36 C). Konverter 3 entwickelte sich klinisch von einem mild ataktischen Probanden zu einem moderat ataktischen Probanden. Der SARA Score stieg vom Baseline Visit bis zum Follow Up 1 Visit von 10,5 Punkten auf 13,5 Punkte an (Abbildung 3.36 D). Gleichzeitig sank die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 von 41,13 pg/ml leicht ab auf 35,91 pg/ml (Abbildung 3.36 B).

**A****Konverter: prä-ataktisch-mild ataktisch****B****Konverter: mild ataktisch-moderat ataktisch****C****Konverter: prä-ataktisch-mild ataktisch****D****Konverter: mild ataktisch-moderat ataktisch**

**Abbildung 3.36 A Ataxin-3 Konzentration in Konverter 1 und 2 Ataxin-3:** Im Konverter 1 wurde in der Baseline Visite 125,51 pg/ml an expandiertem Ataxin-3 gemessen und im Follow Up 1 Visit 131,82 pg/ml. In Konverter 2 stieg die Ataxin-3 Konzentration von 41,75 pg/ml auf 31,61 pg/ml. **B Ataxin-3 Konzentration in Konverter 3:** Im Konverter 3 wurden im longitudinalen Verlauf 41,13 pg/ml im Baseline Visit und 35,91 pg/ml im Follow Up 1 Visit gemessen. **C SARA Score in Konverter 1 und 2:** Der SARA Score des Konverter 1 steigt von 1 Punkt bei der Baseline Untersuchung auf 3 Punkte bei der Follow Up 1 Untersuchung. Bei Konverter 2 steigt der SARA Score im Verlauf von 1 Punkt auf 7 Punkte. **D SARA Score in Konverter 3:** Der SARA Score des Konverter 3 steigt von 10,5 Punkten beim Baseline Visit auf 13,5 Punkte im Follow Up 1 Visit an.

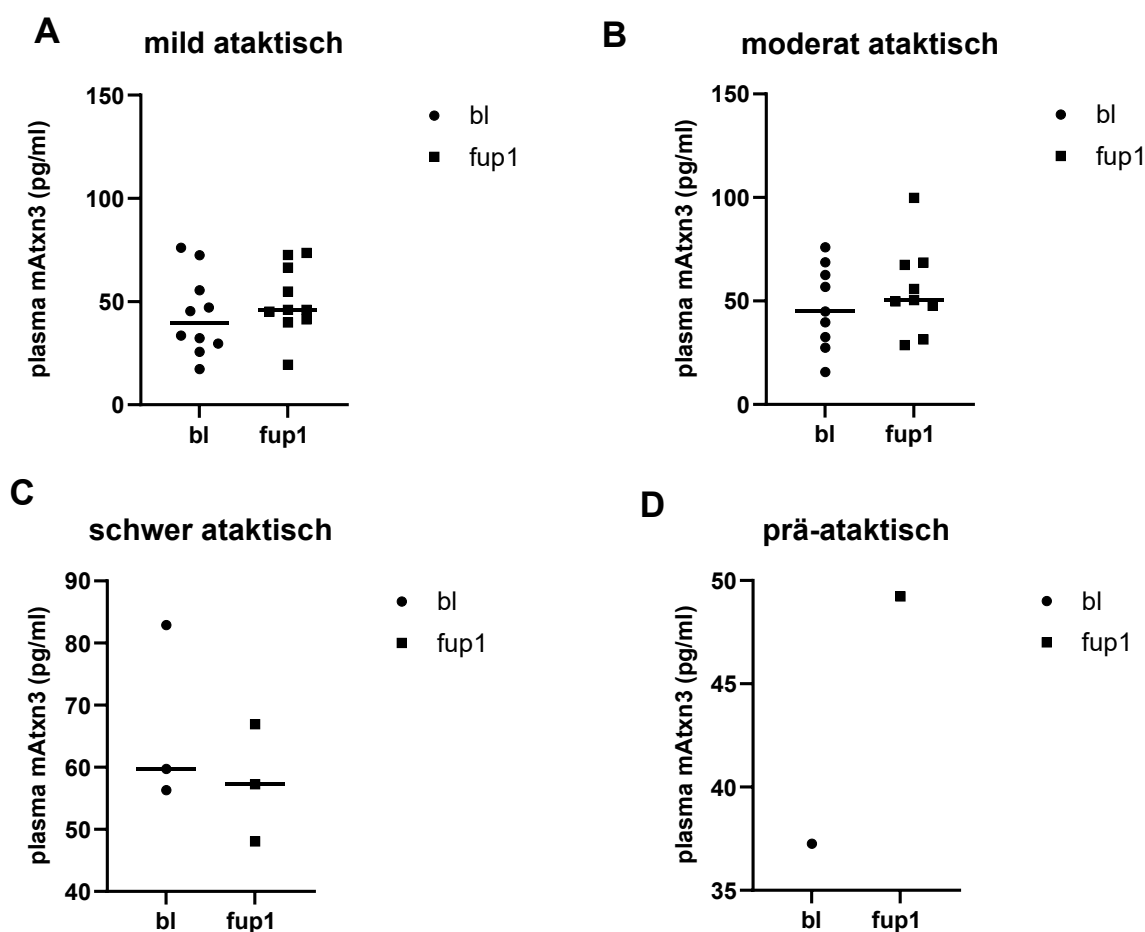


Abbildung 3.37 A-C Auswertung des Simoa Assays der Mutationsträger für die Baseline und den Follow Up 1: Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Baseline und Follow Up 1 Messdaten für PolyQ Ataxin-3 im Simoa Assay (Wilcoxon-Test).

### 3.6 Longitudinale Auswertung Singulex

#### 3.6.1 Kohortenanalyse der Follow Up 1 Kohorte im Singulex

Es wurden insgesamt 124 Probanden im Follow Up 1 mit dem Singulex Assay analysiert. Davon waren n=9 Kontrollen, n=19 prä-ataktische Probanden und n=96 ataktische Probanden. Für die prä-ataktischen Probanden ist von 17 Probanden das Alter bei der Untersuchung bekannt und bei 18 der Abstand zwischen den beiden Untersuchungen. Von den 96 ataktischen Probanden lagen von 95 Daten für den INAS Score vor, von 94 Daten für das *CAG-Repeat*. Von 89 Probanden gab es Daten für den Zeitabstand zwischen den Untersuchungen und für 88 das AAO der ataktischen Probanden. Es wurde in Tabelle 30 jeweils

der Median der vorhandenen Daten sowie der Interquartilenabstand (IQA) bestimmt.

Tabelle 30 Kohortenanalyse der Singulex-Kohorte für Follow Up 1

SINGULEX	KONTROLLEN	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL (ANTEIL WEIBLICH)</b>	9 (55,56 %)	19 (73,68 %)	96 (43,75 %)
<b>ALTER</b>	54 (37-60)	34 (26,5-38,5)	52 (42-60,75)
<b>AAO</b>	-	-	39,5 (33-47)
<b>CAG- WIEDERHOLUNGEN IM EXPANDIERTEN ALLEL</b>	-	69 (65-71)	69 (64,75-71)
<b>INAS</b>	0 (0-2)	0 (0-2)	5 (3-6)
<b>SARA</b>	0 (0-0,5)	1 (0-1,5)	10,5 (8-17,38)
<b>ZEIT BL-FUP1 IN MONATEN</b>	12 (11-13,5)	13 (12-15)	13 (12-14,5)

Der Anteil an weiblichen Probanden lag in der Kohorte der Kontrollprobanden bei 55,56 %. Den größten Frauenanteil hatte die Gruppe der prä-ataktischen Probanden mit 73,68 %, während in der Gruppe der ataktischen Probanden nur 43,75 % Frauen waren.

Das mediane Alter der Kontrollprobanden lag bei 54 Jahren (IQA 37-69 Jahre). Das niedrigste mediane Alter aller 3 Gruppen hatten die prä-ataktischen Probanden mit 34 Jahren und einem Interquartilenabstand von 26,5-38,5 Jahren. Für die ataktischen Probanden wurde ein medianes Alter von 52 Jahren berechnet (IQA 42-60,75 Jahre). Hier noch angeben, ob die Unterschiede signifikant waren.

In der ataktischen Gruppe lag das mediane AAO bei 39,5 Jahren in einem Interquartilenabstand von 33 bis 47 Jahren.

Die prä-ataktischen Probanden hatten einen medianen *CAG-Repeat* von 69 (IQA 65-71). Die ataktischen Probanden haben im Median ebenfalls ein *CAG-Repeat* von 69 in einem Interquartilenabstand von 64,75-71 CAG Wiederholungen.

Für die Kontrollprobanden wurde ein medianer INAS Score von 0 Punkten berechnet (IQA 0-2 Punkte). Die prä-ataktischen Probanden hatten ebenfalls

einen medianen INAS Score von 0 Punkten mit einem Interquartilenabstand von 0-2 Punkten. Die ataktischen Probanden haben im Median einen INAS Score von 5 Punkten (IQA 3-6).

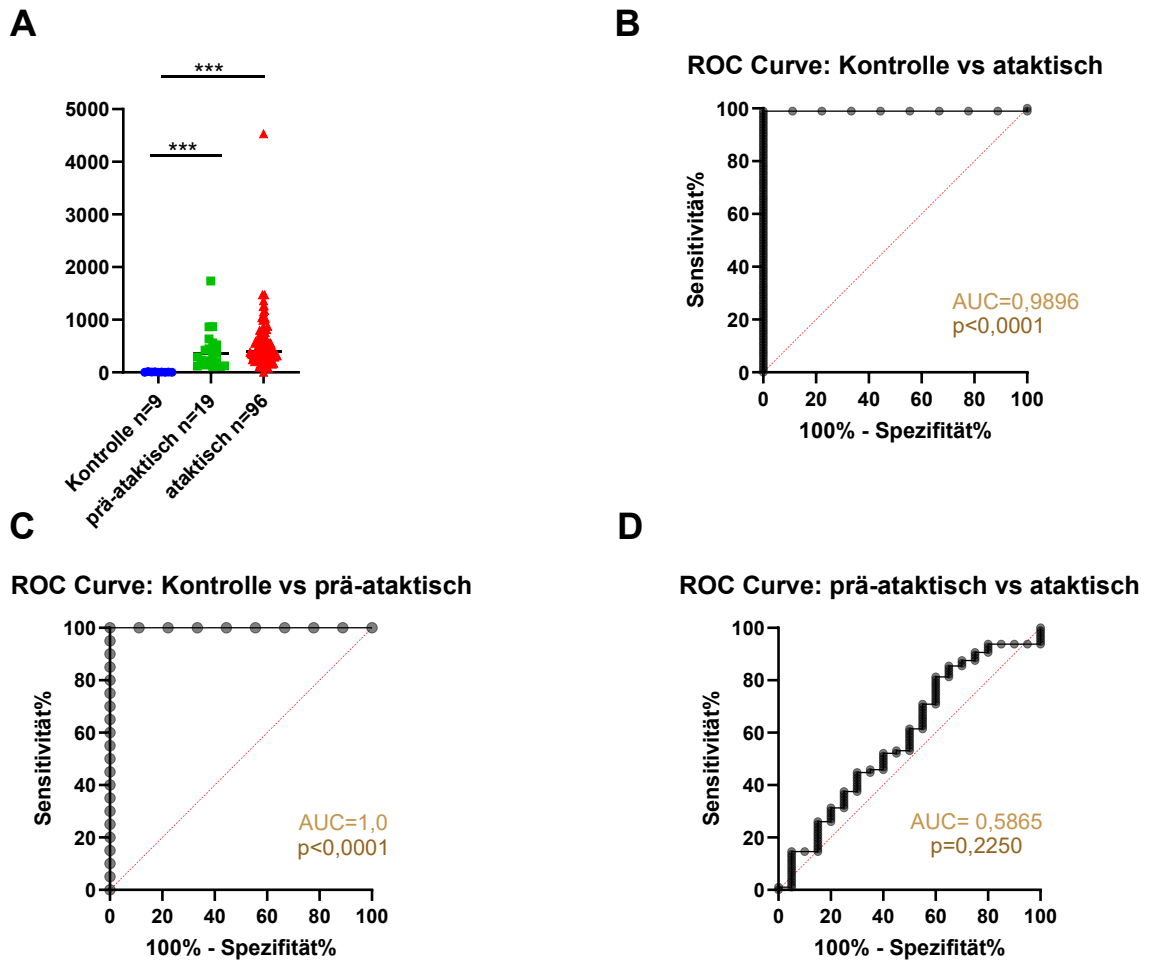
Den höchsten SARA Score hatte mit 10,5 Punkten die ataktische Gruppe (IQA 8-17,38). Die prä-ataktischen Probanden kamen auf einen Median von 1 Punkt (IQA 0,5.1,5), während die Kontrollen einen medianen SARA Score von 0 Punkten (IQA 0-0,5) aufwiesen.

Für die Kohorte der Kontrollprobanden gab es im Median zwischen dem Baseline Visit und dem Follow Up 1 Visit einen Abstand von 12 Monaten (IQA 11-13,5). Für die prä-ataktische Kohorte lag der Zeitabstand zwischen Baseline Visit und Follow Up 1 Visit bei 13 Monaten (IQA 12-15). Die ataktischen Probanden haben im Mittelwert einen Zeitabstand von 13 Monaten zwischen den beiden Visiten (IQA 12-14,5).

### **3.6.2 Korrelation der Ataxin-3 Konzentration mit klinischen Daten**

Zuerst wurden die drei verschiedenen Gruppen in Bezug auf ihre expandierten Ataxin-3 Proteinkonzentration zum ersten longitudinalen Zeitpunkt verglichen. Es wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt, der für den Vergleich der ataktischen Probanden mit den Kontrollprobanden eine statistische Signifikanz mit  $p < 0,0001$  ergab. Auch der Vergleich zwischen den Kontrollen und den prä-ataktischen Probanden war statistisch signifikant ( $p = 0,0008$ ). Für den Kruskal-Wallis Test zwischen den prä-ataktischen und ataktischen Probanden wurde ein P-Wert  $p = 0,794$  berechnet, dieser war statistisch nicht signifikant (Abb 3.38 A).

Um die Differenzierung der 3 Gruppen an Probanden durch den Assay zu bestimmen, wurden *ROC Curves* berechnet. Abbildung 3.38 B zeigt die *ROC Curve* für den Vergleich zwischen Kontrollen und ataktischen Probanden. Es wurde eine  $AUC = 0,9896$  bestimmt mit einem  $p < 0,0001$ . Die *ROC Curve* für die Differenzierung zwischen Kontrollen und prä-ataktischen Probanden ergab eine  $AUC = 1,0$  ebenfalls mit  $p < 0,0001$  (Abbildung 3.38 C). Die *ROC Curve* für den Vergleich zwischen prä-ataktischen und ataktischen Probanden in Abbildung 3.38 D zeigt eine  $AUC = 0,5865$ . Es wurde ein P-Wert  $p = 0,2250$  berechnet.



**Abbildung 3.38 A Ataxin-3-Konzentrationen der Kontrollen, prä-ataktischen und ataktischen Probanden:** Der Vergleich zwischen Kontrollen und ataktischen Probanden sowie den Kontrollen und den prä-ataktischen Probanden ist statistisch signifikant (jeweils  $p < 0,0001$ ). **B ROC Curve Kontrollen vs. ataktische Probanden:** Die ROC Curve für den Vergleich Kontrollen vs. ataktische Probanden zeigt eine  $AUC=0,9896$ . **C ROC Curve vs. prä-ataktisch:** Es wurde für den Vergleich Kontrollen und prä-ataktische Probanden eine  $AUC= 1,0$  berechnet. **D ROC Curve prä-ataktisch vs. ataktisch:** Die ROC Curve der prä-ataktischen und ataktischen Probanden hat eine  $AUC=0,5865$ .

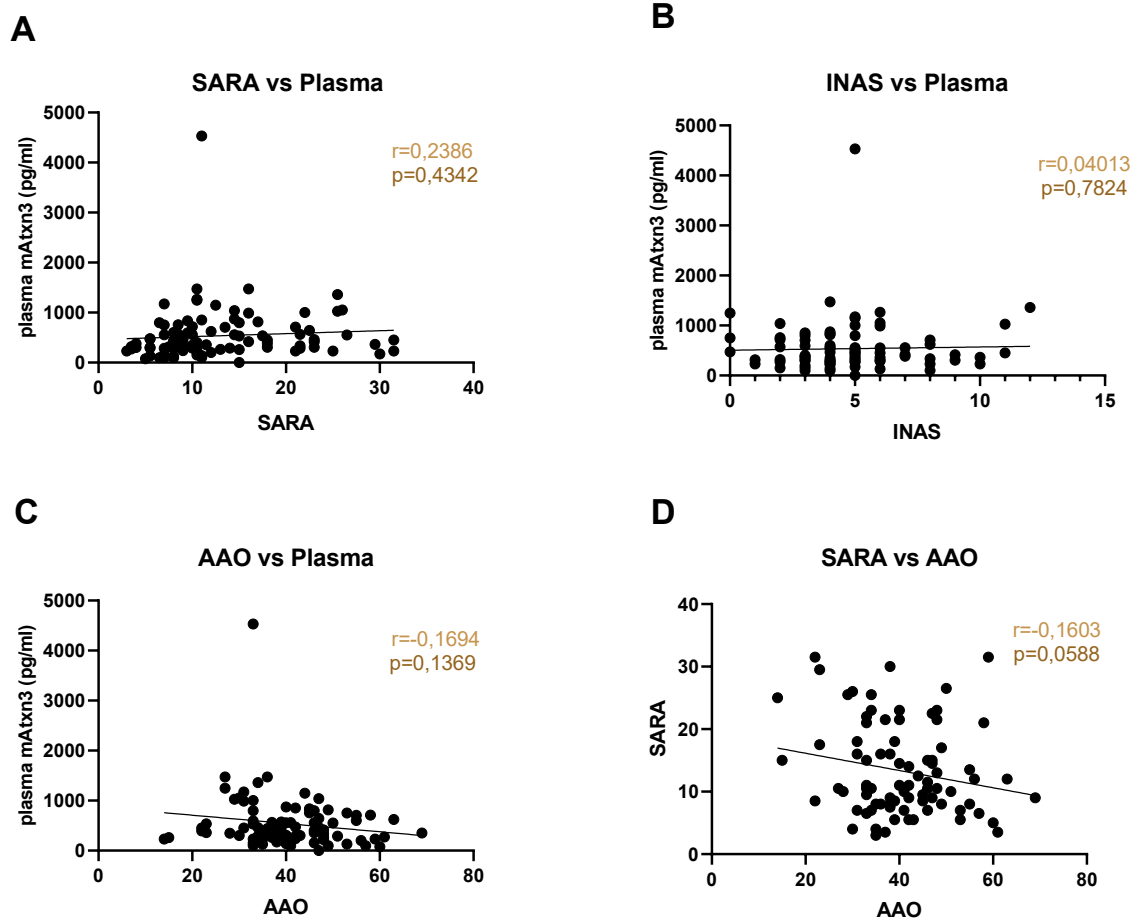
Es wurden die mit dem Singulex Assay bestimmten Konzentrationen an expandiertem Ataxin-3 mit den klinisch erhobenen Daten korreliert (Abb 3.39). Abbildung 3.39 A zeigt die Korrelation des klinisch evaluierten SARA Scores mit der Konzentration des expandierten Ataxin-3 im Plasma. Der durchgeführte Shapiro-Wilks-Test zeigte keine Normalverteilung der Daten ( $p < 0,0001$ ). Die

lineare Regression war statistisch nicht signifikant ( $p=0,4342$ ). Der berechnete Spearman-Koeffizient war  $r=0,2386$ .

Vor der Korrelation der INAS Werte mit der Ataxin-3 Konzentration wurde zunächst ein Shapiro-Wilks-Test der Ataxin-3 Daten der ataktischen Probanden auf Normalverteilung durchgeführt und ergab eine nicht parametrische Verteilung der Daten ( $p<0,0001$ ). Die lineare Regression ergab einen P-Wert von  $p=0,7824$ , was statistisch nicht signifikant war. Für die Korrelation des INAS Score mit dem expandierten Ataxin-3 ergab sich ein Spearman Koeffizient von  $r=0,04013$  (Abb 3.39 B).

Es wurde das AAO mit den Werten an Ataxin-3 im Plasma korreliert. Für die Testung auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilks-Test durchgeführt, der mit  $p<0,0001$  keine Normalverteilung für die Ataxin-3 Konzentrationen der ataktischen Probanden ergab. Der statistische Zusammenhang war nicht signifikant ( $p=0,1369$ ). Es wurde mit  $r=-0,1694$  ein negativer Spearman Koeffizient bestimmt (Abb 3.39 C).

Abbildung 3.39 D zeigt die Korrelation zwischen dem SARA Score der ataktischen Kohorte und dem AAO der ataktischen Kohorte. Der Datensatz des SARA Scores war nicht normalverteilt ( $p<0,0001$ ). Um den statistischen Zusammenhang zu untersuchen, wurde eine lineare Regression durchgeführt, die eine sehr starke Tendenz zeigte, aber mit  $p=0,0588$  nicht das Signifikanzniveau von 0.05 erreichte. Der Spearman-Koeffizient ergab  $r=-0,1603$ .



**Abbildung 3.39** **A SARA vs. Expandiertes Expandiertes Ataxin-3 im Plasma:** Der statistische Zusammenhang zwischen dem SARA Score und dem expandiertem Ataxin-3 ist nicht signifikant ( $p=0,4342$ ). **B INAS vs. expandiertes Ataxin-3 im Plasma:** Die lineare Regression für den INAS Score und dem expandiertem Ataxin-3 ergab  $p=0,7824$  und war statistisch nicht signifikant. **C AAO vs. expandiertes Ataxin-3 im Plasma:** Für den statistischen Zusammenhang zwischen AAO und expandiertem Ataxin-3 im Plasma war keine statistische Signifikanz nachweisbar ( $p=0,1369$ ). **D SARA vs. AAO:** Für die lineare Regression des SARA Scores und des AAO der Kohorte der ataktischen Probanden wurde eine nahezu signifikante Korrelation zwischen dem SARA und dem AAO von  $p=0,0588$  berechnet.

### 3.6.2 Kohortenanalyse des Follow Up 2 Visit im Singulex

Es wurden von 82 Probanden das Follow Up 2 mit dem Singulex Assay untersucht, davon waren 6 Kontrollen, 4 prä-ataktische Probanden und 72 ataktische Probanden. In der Gruppe der Kontrollprobanden lag nur von 5 Probanden der Zeitabstand zwischen Follow Up 1 und Follow Up 2 vor, für die ataktischen Probanden waren es 68, für die diesen Daten vorlagen. Es lag für 63

Probanden das Age of Onset vor. Es wurde in Tabelle 31 der Median und der Interquartilenabstand der vorliegenden Daten bestimmt.

Tabelle 31 Kohortenanalyse des Follow Up 2 der Singulex Kohorte

SINGULEX	KONTROLLEN	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL (ANTEIL WEIBLICH)</b>	6 (83 %)	4 (100 %)	72 (30,56 %)
<b>ALTER</b>	58 (52,25-62)	39,5 (26-44)	44 (33-54)
<b>AAO</b>	-	-	45 (36-53)
<b>CAG- WIEDERHOLUNGEN IM EXPANDIERTEN ALLEL</b>	-	65,5 (64-69,25)	69 (63-71)
<b>INAS</b>	0 (0-0,5)	2 (1-3)	5 (3-6,75)
<b>SARA</b>	0 (0-0,125)	1,25 (0,25-1,5)	10 (7,5-14,5)
<b>ZEIT FUP1-FUP2 IN MONATEN</b>	13 (12,5-15)	11,5 (11-21)	12 (11-13,5)

Von den 6 Kontrollprobanden waren 5 weiblichen, was einem Frauenanteil von 83 % entspricht. Den höchsten Frauenanteil hatte die prä-ataktische Gruppe mit 100 %. Der Anteil weiblicher Probanden an den ataktischen Probanden lag bei 30,56 %.

Betrachtet man das Alter der Probanden im Vergleich, so waren die Kontrollprobanden mit einem Median von 58 Jahren und einem Interquartilenabstand von 52,25-62 Jahren am ältesten. Die prä-ataktischen Probanden waren im Median zum Zeitpunkt des Follow Up 2 39,5 Jahre alt (IQA 26-44). Der Median der ataktischen Probanden lag bei 44 Jahren (IQA 33-54). Für das AAO der ataktischen Probanden lag der Median bei 45 Jahren (IQA 36-53).

Für die *CAG-Repeatlänge* der prä-ataktischen Probanden wurde ein Median von 65,5 Jahren und ein Interquartilenabstand von 64-69,25 Jahren berechnet, während der *CAG-Repeat* der ataktischen Probanden eine mediane Länge von 69 Wiederholungen (IQA 63-71) hatte.

Die Kontrollprobanden hatten im Durchschnitt einen INAS Score von 0 Punkten (IQA 0-0,5). Die prä-ataktischen hatten einen medianen INAS Score von 2 Punkten mit einem Interquartilenabstand von 1-3 Punkten. Den höchsten medianen INAS Score hatten die ataktischen Probanden mit 5 Punkten (IQA 3-6,75).

In der deskriptiven Statistik des SARA Scores ergibt sich Folgendes: Den im Median niedrigsten SARA Score hatten die Kontrollprobanden mit 0 Punkten (IQA 0-0,125). Für die prä-ataktischen Probanden lag der errechnete Median des SARA Scores bei 1,25 Punkten (IQA 0,25-1,5). Den höchsten SARA Score hatten durchschnittlich die ataktischen Probanden mit 10 Punkten (IQA 7,5-14,5).

In der Kategorie Zeit wurde der Zeitabstand zwischen dem Follow Up 1 Visit und dem Follow Up 2 Visit in Monaten berechnet. Dieser Zeitabstand lag für die Kontrollprobanden im Median bei 13 Monaten (IQA 12,5-15). Die prä-ataktische Kohorte hatte dagegen einen Zeitabstand von 11,5 Monaten zwischen den Follow Up 1 und Follow 2 Visit (IQA 11-21). Im Median lagen bei den ataktischen Probanden Follow Up 1 und Follow Up 2 12 Monate auseinander (IQA 11-13,5).

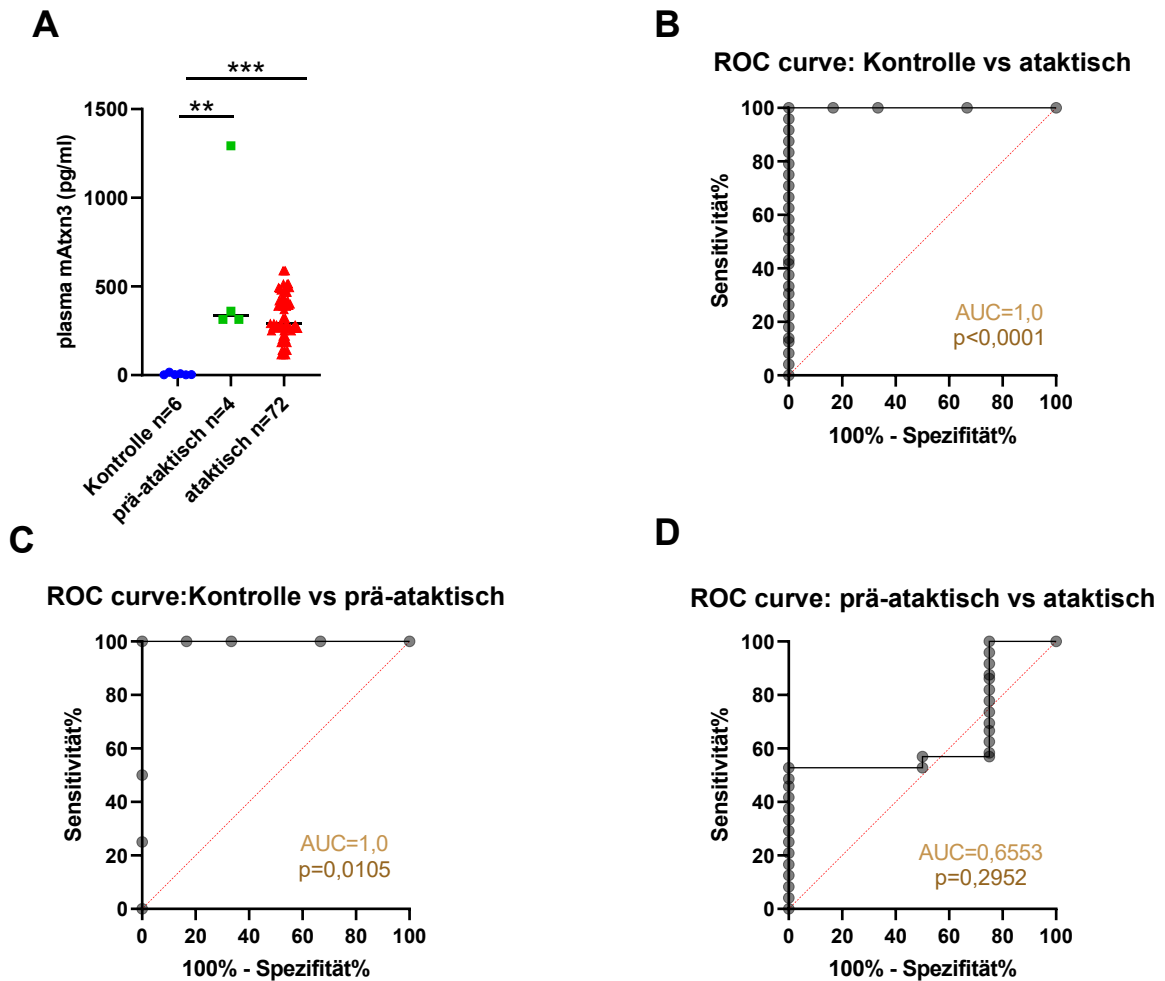
#### **3.6.4 Korrelation der Ataxin-3 Konzentration mit klinischen Daten**

Um die erhobenen Daten für die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 aus dem Plasma der Probanden auszuwerten, wurden die Probanden entsprechend ihres klinischen und genetischen Status den Gruppen Kontrolle, prä-ataktisch und ataktisch zugeordnet. Diese Gruppen wurden dann im Bezug auf ihre Ataxin-3 Level in Abbildung 3.40 A verglichen. Für den Vergleich der 3 Kohorten wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Dieser ergab eine statistisch hochsignifikante Differenz zwischen den Proteinleveln der ataktischen Probanden und der Kontrollprobanden mit einem P-Wert  $p=0,0002$ . Auch die Differenz der Kontrollprobanden und der prä-ataktischen Probanden war statistisch signifikant ( $p=0,002$ ). Der Kruskal-Wallis Test war für den Vergleich zwischen ataktischen und prä-ataktischen Probanden statistisch nicht signifikant  $p=0,9944$ .

Um die Differenzierung nach Gruppen besser zu beurteilen, wurden in Abbildung 3.40 B-D *ROC Curves* erstellt. Die Abbildung 3.40 B zeigt die *ROC Curve* für den

Vergleich von Kontrollen mit ataktischen Probanden. Für diese *ROC Curve* wurde eine  $AUC=1,0$  berechnet, mit einem  $p<0,0001$ .

Die *ROC Curve* des Vergleichs Kontrollen vs prä-ataktisch demonstriert eine  $AUC=1,0$  mit einem  $p=0,0105$  (Abbildung 3.40 C). Abbildung 3.40 D zeigt die *ROC Curve* des Vergleichs der prä-ataktischen Probanden und der ataktischen Probanden. Die  $AUC$  beträgt dabei  $0,6553$  und der  $P$ -Wert  $p=0,2952$ .



**Abbildung 3.40 A Ataxin-3 Konzentrationen der Kontrollen, prä-ataktischen Probanden und ataktischen Probanden:** Die Differenz der Daten zwischen den Kontrollprobanden und ataktischen Probanden ist hochsignifikant ( $p=0,0002$ ), die Differenz zwischen den Daten der Kontrollen und prä-ataktischen Probanden ebenfalls ( $p=0,002$ ). **B ROC Curve Kontrollen vs ataktisch:** Die ROC Curve hat eine  $AUC=1,0$  und einen  $P$ -Wert von  $p<0,001$ . **C ROC Curve Kontrollen vs prä-ataktisch:** Für die ROC Curve wurde eine  $AUC=1,0$  und  $p=0,0105$  berechnet. **D ROC Curve prä-ataktisch vs ataktisch:** Die ROC Curve hat eine  $AUC=0,6553$  mit einem  $P$ -Wert  $p=0,2952$ .

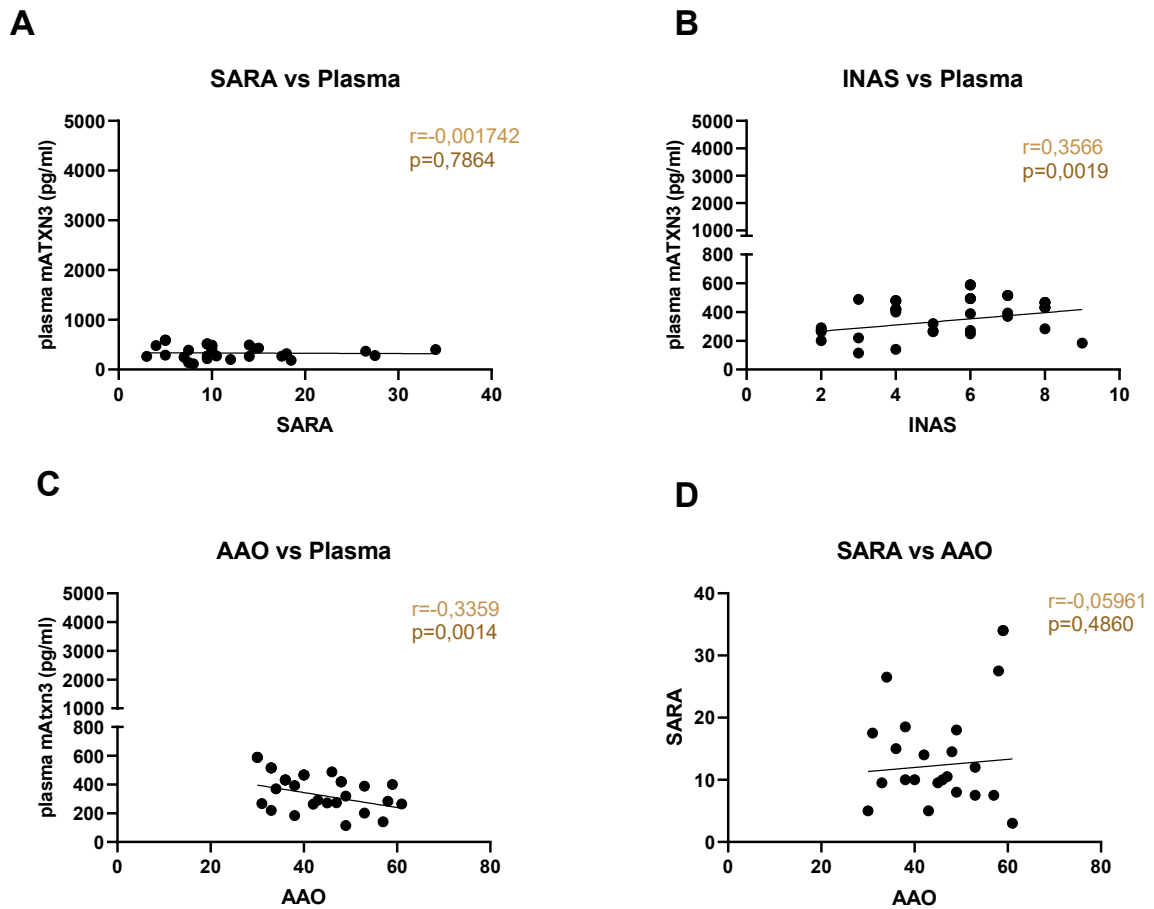
Die mit dem Singulex Assay gemessenen Daten an Ataxin-3 Konzentrationen in ataktischen Patienten wurden mit klinisch erhobenen Daten korreliert (Abbildung 3.41 A-D).

Die SARA Score Daten wurden mit dem expandierten Ataxin-3 der ataktischen Probanden korreliert. Dafür wurde zunächst ein Shapiro-Wilks Test auf Normalverteilung durchgeführt, der für den Datensatz der Proteinkonzentration keine Normalverteilung ergab ( $p=0,0123$ ). Die berechnete lineare Regression ergab mit  $p=0,7864$  keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen SARA Score und Ataxin-3 Konzentration. Der Spearman Korrelationskoeffizient  $r=-0,001742$  war leicht negativ (Abb 3.41 A).

Abbildung 3.41 B zeigt die Korrelation zwischen dem INAS Score und expandiertem Ataxin-3. Die Ataxin-3 Daten waren nicht parametrisch verteilt (Shapiro-Wilks Test;  $p=0,0123$ ). Mit einem p-Wert von  $p=0,0019$  war die durchgeführte lineare Regression statistisch signifikant für die Korrelation des INAS Score mit der Ataxin-3 Konzentration in der vorliegenden Kohorte. Für die Korrelation wurde das Spearman  $r=0,3566$  bestimmt.

Das AAO wurde mit der Ataxin-3 Konzentration korreliert. Der Shapiro-Wilks Test zeigte keine Normalverteilung ( $p=0,0123$ ). Die lineare Regression war statistisch signifikant ( $p=0,0014$ ). Der Spearman-Korrelationskoeffizient war mit  $r=-0,3359$  leicht negativ (Abb 3.41 C).

Die SARA Score Daten der Probanden wurde mit ihrem AAO verglichen und dieser Zusammenhang statistisch ausgewertet. Der SARA Score der ataktischen Kohorte war nicht normalverteilt (Shapiro-Wilks Test;  $p < 0,0001$ ). Die lineare Regression war statistisch nicht signifikant ( $p=0,4860$ ). Der Spearman-Korrelationskoeffizient entsprach  $r=-0,05961$  (Abb 4.40 D).

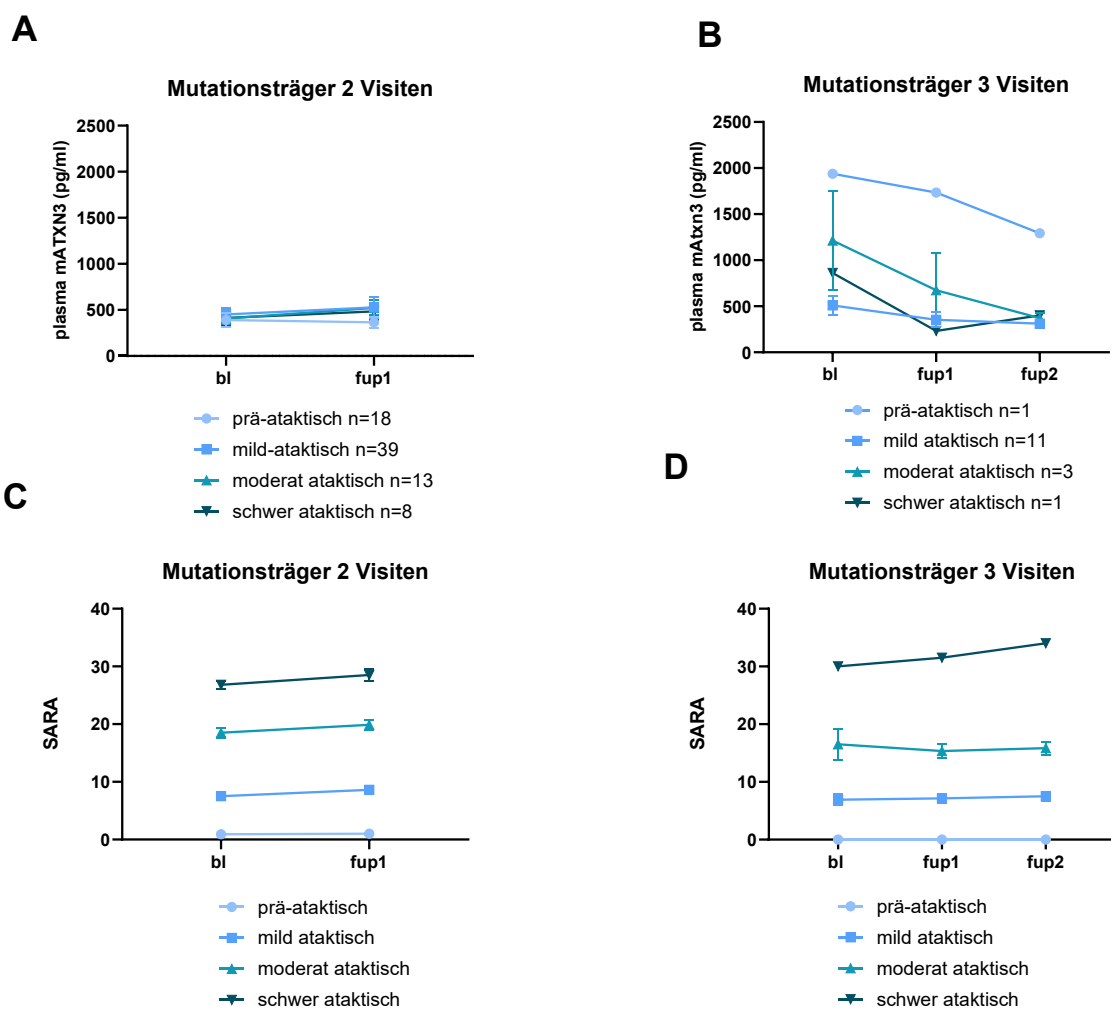


**Abbildung 3.41 A SARA Score vs. Ataxin-3 Konzentration im Plasma:** Die lineare Regression ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,7864$ ). **B INAS Score vs. Ataxin-3 Konzentration im Plasma:** Die lineare Regression war statistisch signifikant ( $p=0,0019$ ). **C AAO vs. Ataxin-3 Konzentration im Plasma:** Die lineare Regression war statistisch signifikant ( $p=0,0014$ ). **D SARA Score vs. AAO:** Die lineare Regression war statistisch nicht signifikant ( $p=0,4860$ ).

### 3.6.3 Longitudinale Auswertung der Singulex-Kohorte

Die Singulex-Kohorte wurde longitudinal im Bezug auf den Verlauf ihrer Ataxin-3 Konzentration und des SARA Scores ausgewertet. Es wurden zunächst die 101 Probanden ausgewertet, die im Laufe des Beobachtungszeitraums nicht die Kategorie wechselten. Es gibt 6 Kontrollprobanden mit 2 Visiten sowie 18 prä-ataktische (SARA kleiner 3), 39 mild ataktische (SARA 3-12), 13 moderat ataktische (SARA 12-23) und 8 schwer ataktische (SARA >23) Probanden mit jeweils 2 Visiten. Die Gruppe an Probanden, von denen 3 Visiten zur Auswertung zur Verfügung standen, bestand aus 3 Kontrollen, 3 prä-ataktischen Probanden, 11 mild ataktischen Probanden, 3 moderat ataktischen Probanden und einem

schwer ataktischen Probanden. Es gab 21 Konverter, die getrennt analysiert wurden. Die Abbildung 3.42 A demonstriert die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 der Mutationsträger mit 2 Visiten, während Abbildung 3.42 C die SARA Scores dieser Probanden zeigt. In Abbildung 3.42 B sind die Ataxin-3 Konzentrationen der Mutationsträger mit 3 Visiten zu sehen. Abbildung 3.42 D zeigt die dazugehörigen SARA Scores.



**Abbildung 3.42 A Ataxin-3 Konzentration Mutationsträger 2 Visiten:** Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 für den Baselinevisit und den Follow Up 1 Visit wird longitudinal dargestellt. **B Ataxin-3 Konzentration Mutationsträger? 3 Visiten:** Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 für den Baselinevisit, den Follow Up 1 Visit und den Follow Up 2 Visit wird longitudinal dargestellt. **C SARA Score Mutationsträger 2 Visiten:** Der SARA Score der Probanden mit 2 Visiten wird für die Gruppen der prä-ataktischen, mild ataktischen, moderat ataktischen und schwer ataktischen Probanden dargestellt für den Verlauf vom Baseline Visit zum Follow Up 1 Visit. **D SARA Score Mutationsträger 3 Visiten:** Der Sara Score der

*Probanden mit 3 Visiten wird für die Gruppe der prä-ataktischen, mild ataktischen, moderat ataktischen und schwer ataktischen Probanden dargestellt.*

Es liegen 6 Kontrollprobanden mit 2 Visiten vor. Das Hintergrundsignal in der Baseline Untersuchung liegt bei 5,879 pg/ml und somit unter dem kleinsten messbaren Signal. Für den Follow Up 1 ergibt sich für die Kontrollen ein Mittelwert von 6,632 pg/ml. (Abb. 3.43 A).

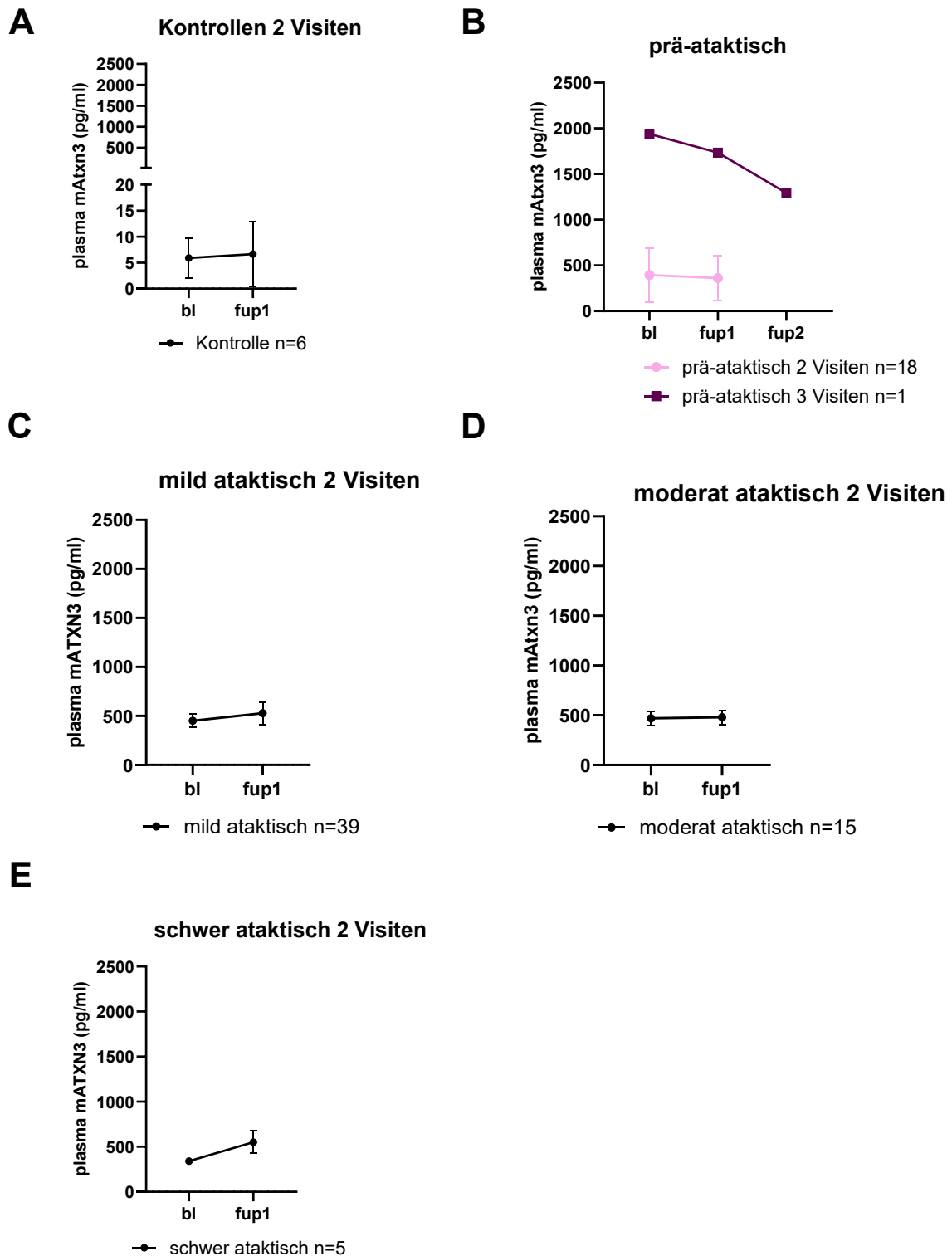
Der Mittelwert der 18 prä-ataktischen Probanden mit 2 Visiten sank von 394,256 pg/ml in der Baseline Untersuchung auf 362,409 pg/ml in der Follow Up 1 Untersuchung. Abbildung 3.43 B zeigt den Verlauf der Ataxin-3 Konzentration in den prä-ataktischen Probanden mit 2 Visiten und in dem einzigen prä-ataktischen Probanden mit 3 Visiten. Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 im prä-ataktischen Probanden mit 3 Visiten sank von 1938,862 pg/ml im Baseline Visit auf 1733,885 pg/ml im Follow Up 1 Visit und auf 1293,427 pg/ml im Follow Up 2 Visit ab.

In Abbildung 3.43 C werden die Ataxin-3 Konzentrationen der mild ataktischen Probanden mit 2 Visiten dargestellt. In dieser Analyse wurden n=39 Probanden ausgewertet. Der Mittelwert stieg von 451,4 pg/ml (SEM=66,42 pg/ml) für den Baseline Visit auf 528 pg/ml (SEM=115,7 pg/ml) an expandiertem Ataxin-3 an. Im durchgeführten Shapiro-Wilks Test ist sowohl die Gruppe der Baseline Probanden als auch die Gruppe der Follow Up 1 Probanden nicht normalverteilt (jeweils  $p < 0,0001$ ). Der Mann-Whitney Test ergab  $p = 0,9366$ , also keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Baseline und Follow Up 1 Messwerten?

Es lagen insgesamt 15 moderat ataktische Probanden vor, die im Singulex Assay untersucht wurden. Für die Baseline wurde ein Mittelwert an 469,3 pg/ml expandiertem Ataxin-3 gemessen mit einem Standardfehler von 73,94 pg/ml und im Follow Up 1 ein Mittelwert von 480,1 pg/ml mit einem Standardfehler von 69,84 pg/ml. Der Mann-Whitney Test, der die Proteinkonzentrationen der beiden Gruppen vergleicht, ist mit  $p = 0,5949$  statistisch nicht signifikant. Beide Kohorten waren laut Shapiro Wilks Test nicht normalverteilt ( $p = 0,0398$ ;  $p = 0,0032$ ) (Abb. 3.43 D).

Abbildung 3.43 E zeigt die Konzentrationen an expandiertem Ataxin-3 der 5 schwer ataktischen Probanden, von denen 2 Visiten im Beobachtungszeitraum vorlagen. Im Zeitraum zwischen der Baseline Probe und dem Follow Up 1 Visit ist ein Ansteigen der Konzentration zu beobachten. Die Konzentration stieg von 340,1 pg/ml (SEM= 21,37 pg/ml) auf 551,6 pg/ml (SEM= 123,9 pg/ml) an. Die Differenz zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen ist mit  $p= 0,1508$  statistisch dennoch nicht signifikant. Die Ataxin-3 Werte der Baseline Kohorte waren nicht normalverteilt ( $p= 0,2923$ ; Shapiro-Wilks Test). Der Shapiro-Wilks Test für die Follow Up 1 Gruppe ergab  $p=0,0486$ , also ebenfalls keine Normalverteilung.

Für die 3 ataktischen Untergruppen (mild ataktisch; moderat ataktisch; schwer ataktisch) war bei Beobachtung ihrer Konzentrationen an expandiertem Ataxin-3 über 2 Visiten jeweils ein Anstieg der Konzentration im Mittelwert zu beobachten.



**Abbildung 3.43 A Hintergrundsignal der Kontrollprobanden:** In der Messung der n=6 Kontrollprobanden durch den Singulex Assay wurde die dargestellte Konzentration als Hintergrundsignal gemessen. **B Ataxin-3 Konzentration der prä-ataktischen Probanden:** Es wurde ein Probanden über 3 Visiten beobachtet, der einen Abfall der Ataxin-3 Konzentration zeigte (Bl=1938,9 pg/ml; Fup1=1733,9 pg/ml; Fup2 1293,4 pg/ml) (lila Quadrat). Die n=18 prä-ataktischen wurden über 2 Visiten beobachtet, der Mittelwert sank von 394,256 pg/ml auf 362,409

pg/ml ab (rosa Kreis). **C Ataxin-3 Konzentration mild ataktische Probanden:** Der Mittelwert der Konzentration an expandiertem Ataxin-3 stieg von 451,4 pg/ml auf 528 pg/ml an. Es wurden n=39 Probanden über 2 Visiten untersucht. **D Ataxin-3 Konzentration moderat ataktische Probanden:** Die Ataxin-3 Konzentration der n=15 moderat ataktischen Probanden stieg im Verlauf von 469,3 pg/ml auf 480,1 pg/ml an. **E Ataxin-3 Konzentration schwer ataktische Probanden:** Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 stieg von 340,1 pg/ml auf 551,6 pg/ml an. Es wurden n=5 Probanden untersucht.

In Abbildung 3.44 werden die Probanden mit einem Beobachtungszeitraum über 3 Visiten dargestellt. In Abbildung 3.44 A wird das gemessene Hintergrundsignal in den Proben der n=4 Kontrollprobanden abgebildet. Für die Baseline Gruppe wurde ein Mittelwert von 1,84 pg/ml für mit einem Standardfehler von 0,896 pg/ml; Für den Follow Up 1 Visit lag dieser Wert bei 3,16 pg/ml mit einem Standardfehler von 0,76 pg/ml. Alle gemessene Werte lagen aus diesem Grund unter dem Detektionsniveau.

Es wurden 11 mild ataktische Probanden mit einem Beobachtungszeitraum von 3 Visiten betrachtet. Für die Baseline Kohorte wurde eine Konzentration an expandiertem Ataxin-3 von 509,5 pg/ml mit einem Standardfehler von 102,4 pg/ml berechnet. Im Follow Up 1 wurde ein Mittelwert von 353,7 pg/ml (SEM=79,95) bestimmt. Im Follow Up 2 sank der Wert noch weiter ab auf 312 pg/ml mit einem Standardfehler von 47,57 pg/ml (Abb 3.44 B).

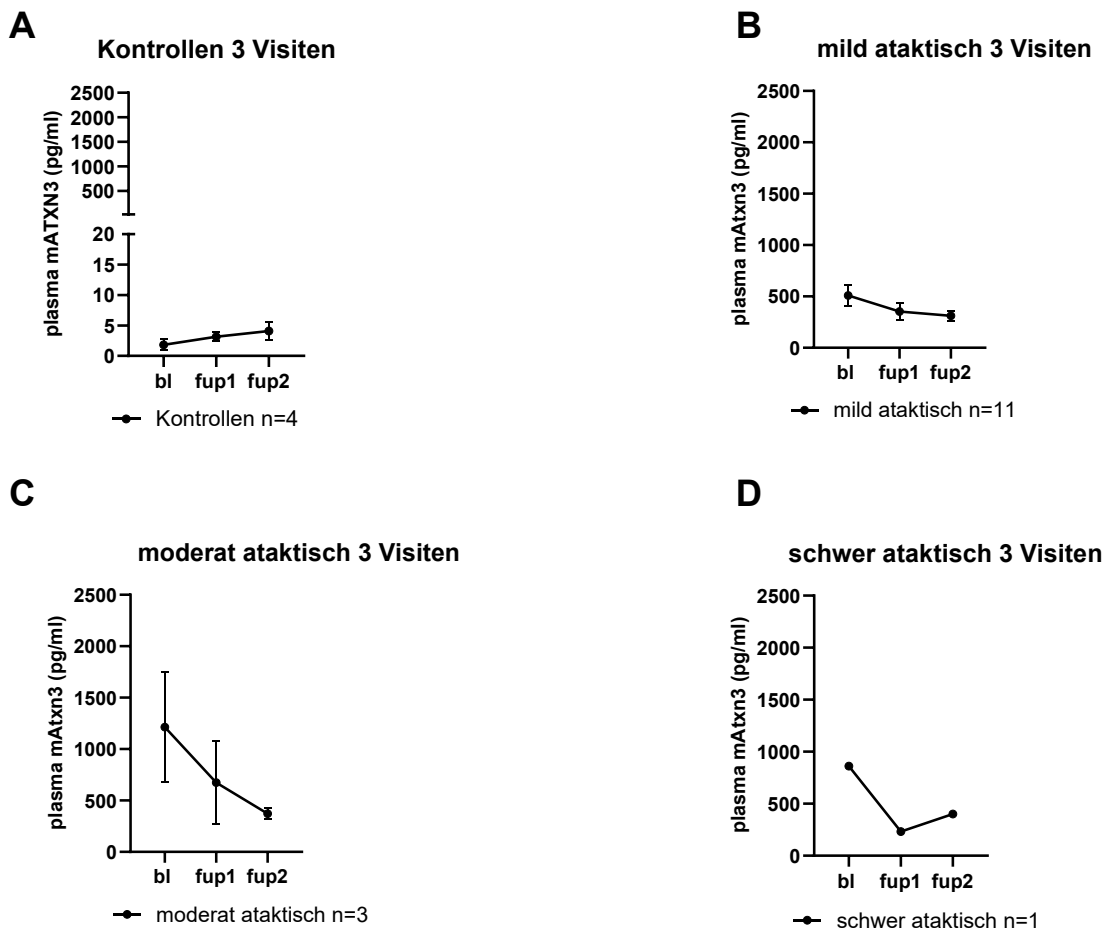
Abbildung 3.44 C zeigt die Auswertung der moderat ataktischen Probanden mit 3 Visiten. Die höchste Konzentration an expandiertem Ataxin-3 wurde in der Baseline Kohorte gemessen mit 1213 pg/ml (SEM=537,4 pg/ml). Im Follow Up 1 sank die Konzentration auf 674,8 pg/ml (SEM=398,7 pg/ml) ab und beträgt im Follow Up 2 noch 371,2 pg/ml (SEM=54,38 pg/ml). Der Kruskal-Wallis Test zeigt keine signifikante Differenz zwischen den Ataxin-3 Werten der 3 untersuchten Visiten.

Der schwer ataktische Proband, der 3 Visiten lang beobachtet werden konnte, zeigt folgende Veränderungen in der Ataxin-3 Konzentration: In der Probe, die im Baseline Visit abgenommen wurde, wurde eine Konzentration von 861,91 pg/ml gemessen, die in der Follow Up 1 deutlich absank auf eine Konzentration von 31,85 pg/ml. Für die dritte Probe (Follow Up 2) wurde eine Konzentration von 400,24 pg/ml gemessen (Abb 3.44 D).

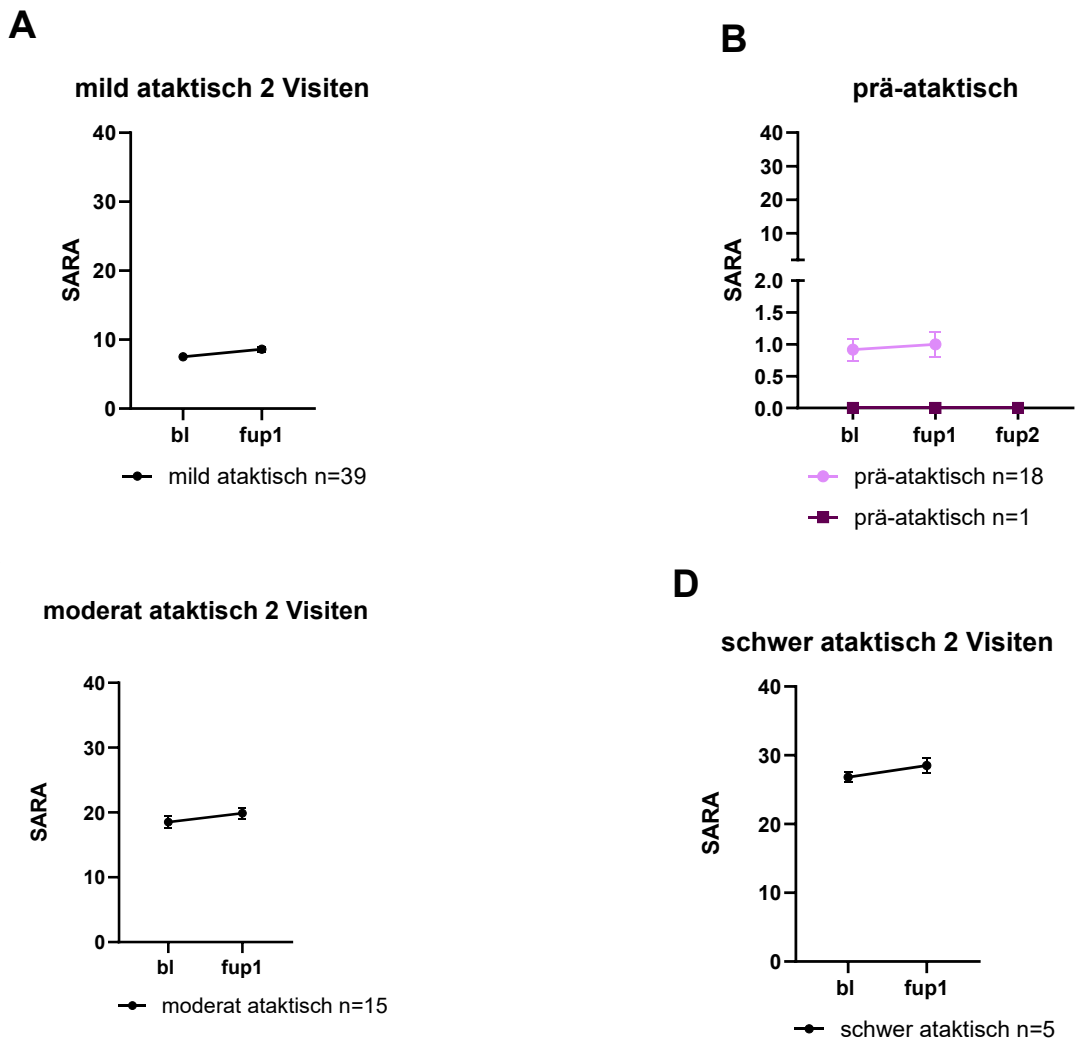
Abbildung 3.45 stellt die SARA Scores der untersuchten Probanden dar. Abbildung 3.45 A zeigt die SARA Scores der mild ataktischen Probanden mit 2 Visiten. Im Baseline haben die mild ataktischen Probanden im Mittelwert einen SARA Score von 7,4 Punkten (SEM=0,3628). Im Follow Up 1 Visit haben die Probanden einen leicht höheren SARA Score von 8,7 Punkten (SEM=0,3919). Der prä-ataktische Proband in Abbildung 3.45 B zeigt in allen 3 Visiten einen klinischen SARA Score von 0. Die prä-ataktischen Probanden mit 2 Visiten zeigen eine Konstanz ihres SARA Scores: in der Baseline Visite wurde ein Mittelwert von 0,92 Punkten mit einem Standardfehler von 0,1727. Zum Zeitpunkt des Follow Up 1 Visits der Probanden lag der durchschnittliche SARA Score bei 1 Punkt mit einer Standardabweichung von 0,1980.

Die 15 moderat ataktischen Probanden mit einem Beobachtungszeitraum von 2 Visiten haben im Mittelwert in der Baseline einen SARA Score von 18,50 Punkten mit einer Standardabweichung von 0,9207. In der Follow Up 1 Untersuchung wird ein Mittelwert von 19,87 Punkten berechnet, dieser hat sich also im Vergleich zum Baseline Visit erhöht. Der Standardfehler für den Mittelwert des Follow Up 1 Visits liegt bei 0,8287 (Abb 3.45 C).

In Abbildung 3.45 D sind die 5 schwer ataktischen Probanden mit ihren klinischen SARA Scores dargestellt. Es ist eine ansteigende Tendenz der SARA Score Werte zu beobachten. Der Mittelwert des SARA Scores für den Baseline Visit liegt bei 26,80 Punkten bei einem Standardfehler von 0,7348. Als Mittelwert der SARA Score Werte im Follow Up 1 wurde ein Wert von 28,50 Punkten berechnet mit einem Standardfehler von 1,095. Wie auch in Abbildung 3.42 C zu sehen, haben die schwer ataktischen Probanden damit den höchsten SARA Score.



**Abbildung 3.44 A Hintergrundsignal in den Kontrollprobanden:** Das Hintergrundsignal in den gesunden Kontrollen wurde gemessen. Es gibt n=4 Kontrollen für diese Untersuchung. **B Ataxin-3 Konzentration der mild ataktischen Probanden:** Die Untersuchung wurde an n=11 Probanden vorgenommen. Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 sank von Baseline 509,5 pg/ml auf zunächst 353,7 pg/ml und im Follow Up 2 auf 312 pg/ml ab. **C Ataxin-3 Konzentration der moderat ataktischen Probanden:** Der Mittelwert der n=3 moderat ataktischen Probanden liegt in der Baseline Untersuchung bei 1213 pg/ml. In Follow Up 1 wurden 674,8 pg/ml gemessen, die im Follow Up 2 weiter auf 371,2 pg/ml absanken. **D Ataxin-3 Konzentration der schwer ataktischen Probanden:** Der schwer ataktisch Probanden hat im Baseline Visit eine Konzentration von 861,9 pg/ml. Im Follow Up 1 eine Konzentration von 231,9 pg/ml und im Follow Up 2 eine Konzentration von 400,2 pg/ml.



**Abbildung 3.45 A SARA Score der mild ataktischen Probanden:** Der SARA Score der mild ataktischen Probanden steigt leicht an, von 7,4 Punkte auf 8,7 Punkte im Beobachtungszeitraum. **B SARA Score der prä-ataktischen Probanden:** Der prä-ataktische Proband mit 3 Visiten hat in allen 3 Visiten einen SARA Score von 0 Punkten. Die n=18 prä-ataktischen Probanden mit 2 Visiten verändern sich vom Baseline Visit bis zum Follow Up 1 Visit kaum im Bezug auf den SARA Score (BL=0,92 Punkte; Fup1=1 Punkte) **C SARA Score der moderat ataktischen Probanden:** Der SARA Score der n=15 moderat ataktischen Probanden steigt im Beobachtungszeitraum von 18,50 Punkten auf 19,87 Punkte an. **D SARA Score der schwer ataktischen Probanden:** In der Baseline Untersuchung ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 26,8 Punkten und im Follow Up 1 ein Wert von 28,50 Punkten für die 5 schwer ataktischen Probanden.

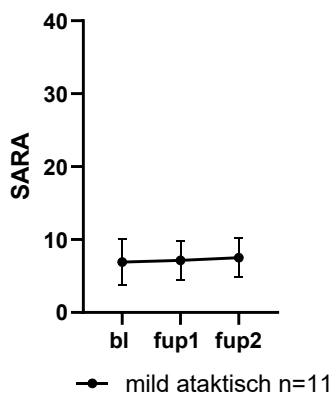
Abbildung 3.46 zeigt die SARA Scores der Probanden, die über 3 Visits beobachtet wurden. Die mild ataktischen Probanden zeigen einen in etwa konstant bleibenden Mittelwert für den SARA Score. Im Baseline Visit ergab sich für die 11 Probanden durchschnittlich ein SARA Score von 6,9 Punkten mit einem Standardfehler von 0,9410. Für den Follow Up 1 Visit ergab sich ein SARA Score

von 7,14 Punkten mit einem Standardfehler von 0,8037. Für den Follow Up 3 konnte ein durchschnittlicher SARA Score von 7,5 Punkten berechnet werden, mit einem Standardfehler von 0,8062.

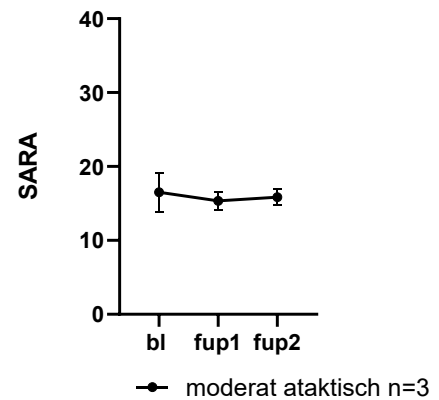
Für die n=3 moderat ataktischen Probanden ergab sich für den Baseline Visit ein SARA Score von 16,50 Punkten im Mittelwert mit einem Standardfehler von 2,646. Im Follow Up 1 Visit ergab sich ein SARA Score von 15,33 Punkten (SEM=1,202). Der SARA Score lag im Follow Up 2 durchschnittlich bei 15,83 Punkten mit einem Standardfehler von 1,093. (Abb. 3.46 B).

Der schwer ataktische Proband stieg im Verlauf mit dem SARA Score an von 30 Punkte auf 31,5 Punkte im Follow Up 1 und 34 Punkte im Follow Up 2 (Abb. 3.46 C).

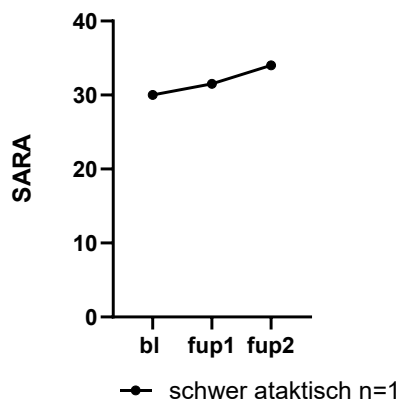
**A**  
mild ataktisch 3 Visiten



**B**  
moderat ataktisch 3 Visit



**C**  
schwer ataktisch 3 Visiten



**Abbildung 3.46 A SARA Score mild ataktisch:** Der Mittelwert der SARA Scores der n=11 mild ataktischen Probanden beträgt im Baseline Visit 6,9 Punkte, im Follow Up 1 Visit 7,14 Punkte und im Follow Up 2 Visit 7,5 Punkte **B SARA Score moderat ataktisch** Der Mittelwert der SARA Scores der n=3 moderat ataktischen Probanden liegt für den Baseline Visit bei 16,50 Punkten, im Follow Up 1 Visit bei 15,33 Punkten und im Follow Up 2 Visit bei 15,83 Punkten. **C SARA schwer ataktisch:** Es ist ein Anstieg des SARA Scores bei dem schwer ataktischen Probanden über 3 Visiten zu beobachten.

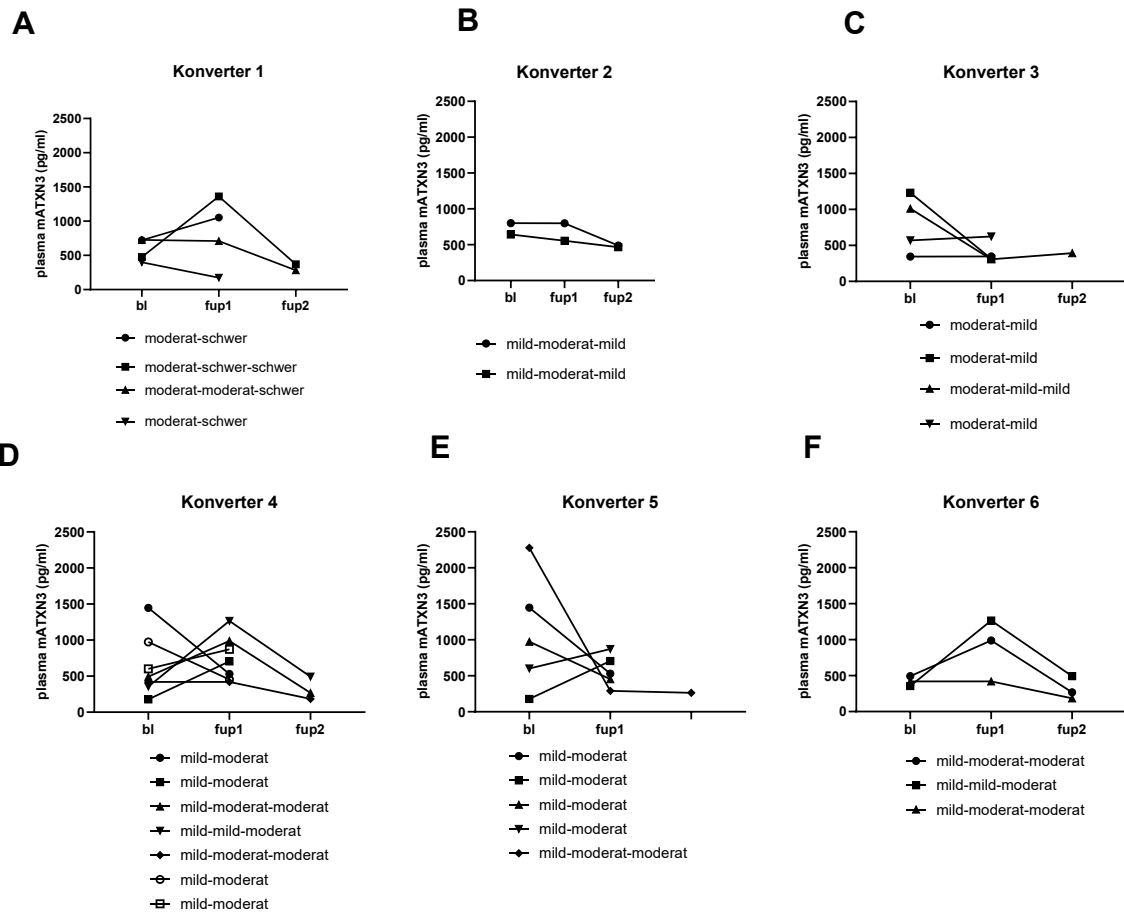


Abbildung 3.47 A-F Konverter der Singulex Kohorte mit ihren Ataxin-3 Konzentrationen A Konverter von moderat zu schwer ataktisch B Konverter von mild ataktisch zu moderat ataktisch und zu mild ataktisch C Konverter von moderat zu mild ataktisch D Konverter von mild zu moderat ataktisch E Konverter von mild ataktisch zu moderat ataktisch F Konverter von mild ataktisch zu moderat ataktisch zu mild ataktisch

Abbildung 3.47 zeigt die Konverter der Singulex Kohorte der longitudinalen Kohorte. Abbildung 3.47 A zeigt die Konverter, welche im Beobachtungszeitraum von moderat ataktisch zu mild ataktisch konvertieren. Die 4 Probanden dieser Kategorie zeigen keine einheitliche Tendenz der Konzentration an expandiertem Ataxin 3. Zwei der Probanden zeigten im Verlauf von Baseline zu Follow Up 1 einen Anstieg des expandierten Ataxin-3, zwei weitere zeigten einen Abfall des expandierten Ataxin-3.

Abbildung 3.47 B zeigt die Konverter, welche im Beobachtungszeitraum, welche von mild ataktisch zu moderat ataktisch und dann wieder zu mild ataktisch

konvertierten. Über den Verlauf von 3 Visiten zeigte sich in beiden Konvertern ein Absinken des expandierten Ataxin-3.

Abbildung 3.47 C zeigt die Konverter, welche im Beobachtungszeitraum von moderat zu mild ataktisch konvertieren. Auch hier zeigte sich ein gemischtes Bild, in dem zwei der Probanden einen Abfall der expandierten Ataxin-3 Konzentration zeigten, ein Proband einen Anstieg und ein weitere Proband ein stabiles Level an Ataxin-3 zeigte.

Abbildung 3.47 D zeigt die sieben Probanden, welche im Beobachtungszeitraum von mild zu moderat ataktisch konvertieren. Vier der Probanden zeigten einen Anstieg des expandierten Ataxin-3 Level, drei Probanden zeigten einen Abfall des expandierten Ataxin-3.

Abbildung 3.47 E zeigt 5 weitere Probanden, welche im Beobachtungszeitraum von mild zu moderat ataktisch konvertieren. Drei zeigen einen Abfall der expandierten Ataxin-3 Konzentration, zwei der Probanden zeigen Anstieg der expandierten Ataxin 3 Konzentration.

Abbildung 3.47 F zeigt drei Probanden welche von mild zu moderat ataktisch konvertieren. Alle 3 Probanden zeigen zunächst ein Anstieg der Ataxin-3 Konzentration und dann ein Absinken.

### **3.7 Vergleich des expandierten Ataxin-3 in Singulex Assay und im Simoa Assay**

#### **3.7.1 Kohortenanalyse der Singulex und Simoa Assay Kohorte**

Es sollen die beiden Methoden des Singulex Assays und des Simoa Assays miteinander verglichen werden, die beide das expandierte Ataxin-3 im Plasma der Probanden messen. Es wurden 38 Probanden mit den beiden Methoden untersucht, davon 3 Kontrollprobanden, 7 prä-ataktische Probanden und 28 ataktische Probanden. Von den ataktischen liegen nur von 27 Probanden Daten zum Age of Onset vor. Tabelle 32 stellt die Kohortenanalyse mit Median und Interquartilenabstand dar.

Tabelle 32 Kohortenanalyse Singulex vs Simoa

	KONTROLLE	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL</b>	3	7	28
<b>ALTER</b>	48 (30-59)	34 (24-40)	51,5 (41-63)
<b>SARA</b>	0 (0-0)	1 (0-1)	12,5 (6,5-18)
<b>AAO</b>	-	-	39 (33-50)
<b>EXPANDIERTES ALLEL</b>	-	65 (64-70)	70 (65-72)

Es wurden 3 Kontrollen in der Kohorte untersucht, diese waren im Median 48 Jahre alt, mit einem Interquartilenabstand von 30-59 Jahren. Das höchste mediane Alter hatten die ataktischen Probanden mit 51,5 Jahren (IQA= 41-61 Jahre). Für die prä-ataktische Gruppe lag das durchschnittliche Alter bei 34 Jahren mit einem Interquartilenabstand von 24-40 Jahren.

Der SARA Score bei den Kontrollen lag im Median bei 0 Punkten (IQA=0-0 Punkte). Den höchsten SARA Score hatten die ataktischen Probanden mit 12,5 Punkten und einem Interquartilenabstand von 6,5-18 Punkten. Der durchschnittliche SARA Score in der prä-ataktischen Gruppe lag bei 1 Punkt (IQA=0-1 Punkte).

Der AAO lag im Median für die ataktischen Probanden bei 39 Jahren mit einem Interquartilenabstand von 33-50 Jahren.

Die ataktischen Probanden hatten im Median ein größeres expandiertes Allel als die prä-ataktischen Probanden. Die ataktischen Probanden hatten im Median ein expandiertes Allel von 70 *CAG-Repeats* (IQA=65-72). Die prä-ataktischen Probanden hatten ein expandiertes Allel von 65 *CAG-Repeats* (IQA=64-70).

### 3.7.2 Vergleich der Trennschärfe für Singulex Assay vs. Simoa Assay

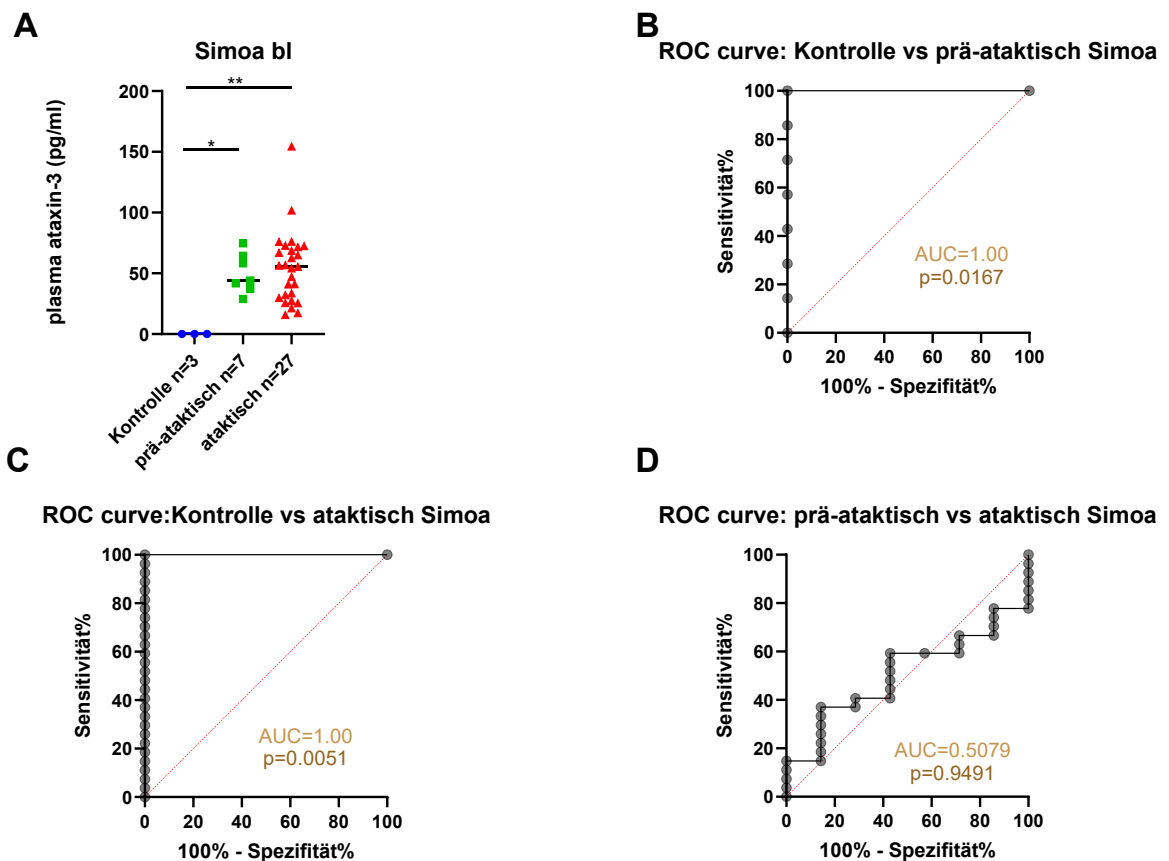
Es wurde für die Baseline Gruppe ein Shapiro-Wilks Test durchgeführt, der für die prä-ataktische Gruppe eine Normalverteilung mit  $p=0,7996$  ergab. Für die ataktische Gruppe ergab der Shapiro-Wilks Test  $p=0,0059$ , also keine Normalverteilung. Daraufhin wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt, der für den Vergleich Kontrolle vs ataktisch  $p=0,0430$ , also eine statistisch signifikante Differenz ergab. Für den Vergleich Kontrolle vs prä-ataktisch wurde durch den

Kruskal-Wallis Test ein P-Wert  $p=0,0145$  berechnet, was ebenfalls eine statistisch signifikante Differenz ergab (Abb 3.48 A).

Die ROC Curve in Abbildung 3.48 B ergab eine AUC=1,0 bei einem P-Wert  $p=0,0167$  für den Vergleich zwischen den Kontrollen und den prä-ataktischen Probanden.

Die ROC Curve in Abbildung 3.48 C ergab eine AUC=1,0 und einen P-Wert  $p=0,0051$  für den Vergleich zwischen Kontrollen und ataktischen Probanden.

Die ROC Curve in Abbildung 3.48 D ergab eine AUC=0,5079 mit einem P-Wert=0,9491 für den Vergleich zwischen den prä-ataktischen und ataktischen Probanden.



**Abbildung 3.48 A Ataxin-3 Konzentrationen der Kontrollen, prä-ataktischen und ataktischen Probanden:** Die Differenz zwischen Kontrollen und ataktischen Probanden ist statistisch signifikant ( $p=0,0145$ ). Auch die Differenz zwischen den Kontrollen und prä-ataktischen Probanden ergibt einen statistisch signifikanten P-Wert ( $p=0,0430$ ). **B ROC Curve Kontrollen vs prä-ataktisch:** Die AUC wurde auf 1,0 berechnet bei einem P-Wert von  $=0,0167$ . **ROC Curve Kontrollen vs ataktisch:** Die AUC liegt bei 1,0 für die Differenz zwischen Kontrollen und ataktischen ( $p=0,0051$ ). **D ROC Curve prä-ataktisch vs ataktisch:** Für die Differenz zwischen

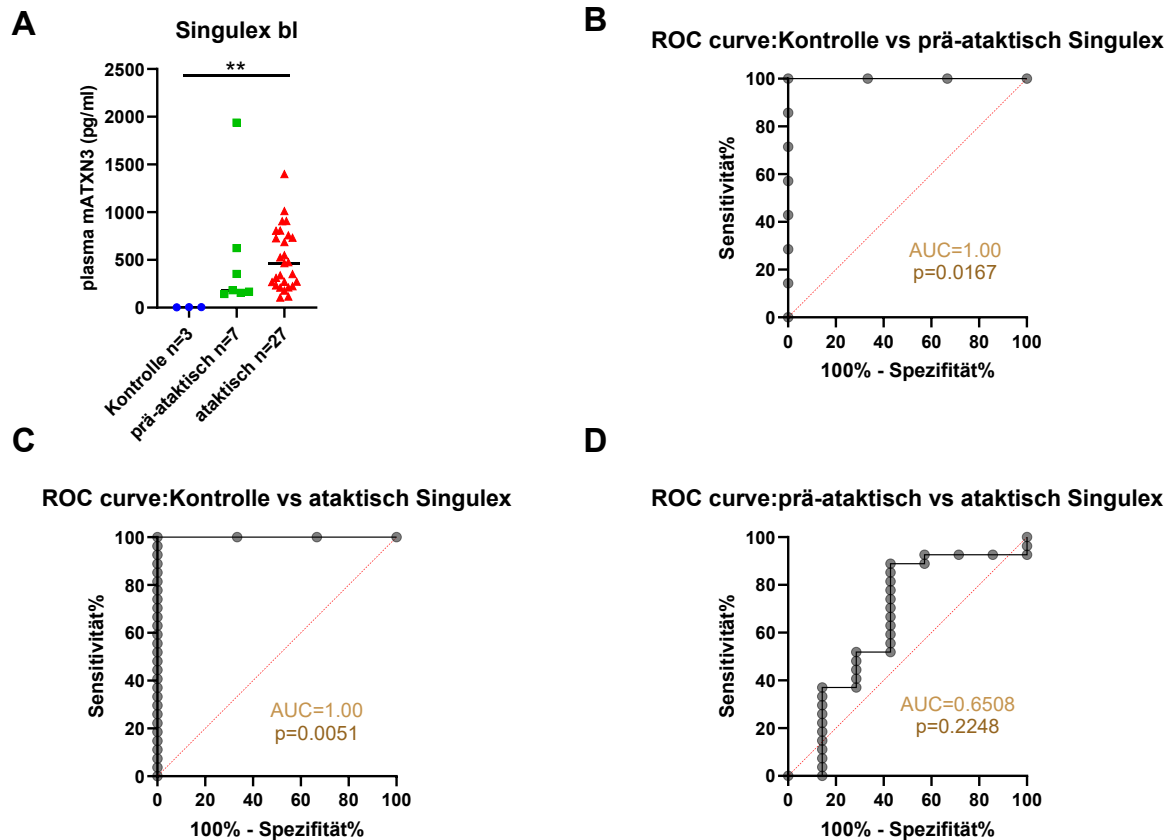
den prä-ataktischen und ataktischen Probanden im Simoa Assay liegt die AUC bei 0,5079 und der P-Wert bei  $p=0,9491$ .

Für die Untersuchung der Baseline Kohorte mit dem Singulex Assay ergaben sich folgende Berechnungen: Es wurde ein Shapiro-Wilk Test durchgeführt, um auf Normalverteilung zu testen. Für die Gruppe der Kontrollen ergab sich ein  $p=0,9169$ , also eine Normalverteilung. Für die Gruppe der prä-ataktischen ergab sich  $p=0,0009$ , also keine Normalverteilung. Für die Gruppe der ataktischen ergab sich  $p=0,0294$ , also keine Normalverteilung. In Abbildung 3.49 A wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Der Kruskal-Wallis Test für den Vergleich zwischen Kontrollen vs ataktischen Probanden ergab eine signifikante statistischen Differenz mit einem P-Wert  $p=0,0090$ . Der Kruskal-Wallis Test zwischen den Kontrollen und den prä-ataktischen Probanden ergab  $p=0,1602$ , also keine signifikante statistische Differenz. Die Ataxin-3 Konzentrationen der prä-ataktischen und die ataktischen Probanden haben keine statistisch signifikante Differenz ( $p=0,7923$ ).

Abbildung 3.49 B zeigt die *ROC Curve* der Kontrollen im Vergleich zu den prä-ataktischen Probanden. Für diese *ROC Curve* ergeben sich eine AUC=1,0 sowie eine  $p=0,0167$ .

Abbildung 3.49 C zeigt die *ROC Curve* der Kontrollen im Vergleich zu ataktischen Probanden. Für die Berechnung ergibt sich eine AUC=1,0 mit einem  $p=0,0051$ .

Abbildung 3.49 D zeigt die *ROC Curve* der prä-ataktischen im Vergleich zu den ataktischen Probanden. Für diese *ROC Curve* ergibt sich ein AUC=0,6508 mit einem  $p=0,2248$ .



**Abbildung 3.49 A Ataxin-3 Konzentrationen der Kontrollen, prä-ataktischen und ataktischen Probanden:** Die Ataxin-3 Konzentrationen der Kontrollen und der ataktischen Probanden zeigt eine statistisch signifikante Differenz  $p=0,0090$ . Die Differenz der Konzentrationen der prä-ataktischen und Kontrollen sind statistisch nicht signifikant ( $p=0,1602$ ). **B ROC Curve Kontrollen vs prä-ataktisch:** Die AUC wurde auf 1,0 berechnet bei einem P-Wert von  $=0,0167$ . **ROC Curve Kontrollen vs ataktisch:** Die AUC liegt bei 1,0 für die Differenz zwischen Kontrollen und ataktischen ( $p=0,0051$ ). **D ROC Curve prä-ataktisch vs ataktisch:** Für die Differenz zwischen den prä-ataktischen und ataktischen Probanden im Simoa Assay liegt die AUC bei 0,6508 und der P-Wert bei  $p=0,2248$ .

### 3.7.3 Vergleich des Simoa und Singulex Assays in der longitudinalen Analyse

Im Folgenden werden die Probanden verglichen, von denen longitudinale Daten (Baseline und Follow Up 1 Visit) mit beiden Verfahren - Simoa Assay und Singulex Assay - vorlagen. Für die Kontrollen ergab sich in der Untersuchung mit dem Simoa Assay ein Mittelwert von 0 pg/ml mit einem Standardfehler von 0 in der Baseline Untersuchung und in der Follow Up 1 Untersuchung. Für diese Kontrollen ergab sich mit dem Singulex Assay für die Baseline Untersuchung ein Hintergrundsignal von 3,602 pg/ml (SEM= 0,9117) und in der Follow Up 1 ein

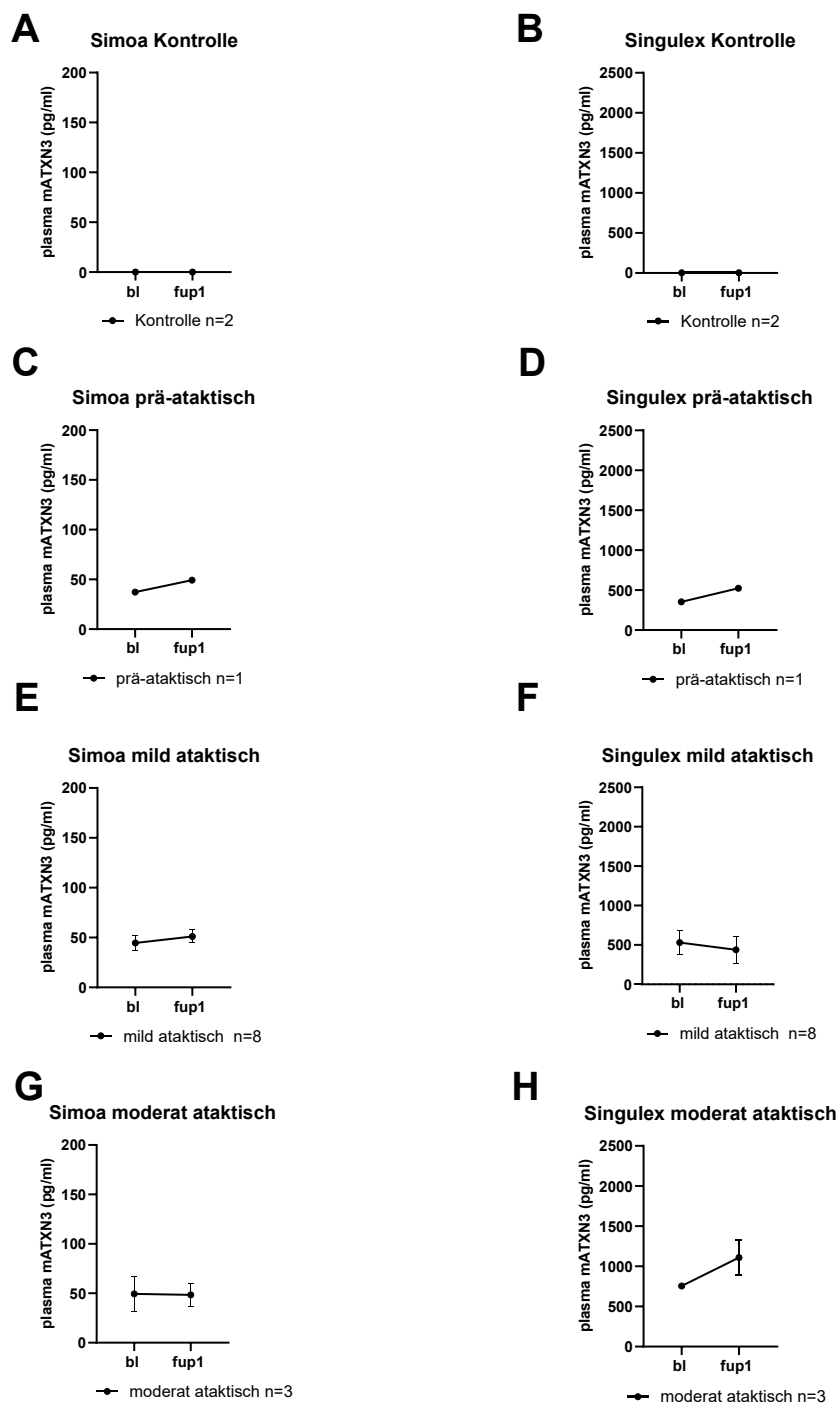
Signal von 3,168 pg/ml (SEM=1,462). Mit beiden Methoden wird in den n=2 Kontrollen nur ein Signal unter dem untersten Schwellenwert der Methode nachgewiesen (Abb. 3.50 A-B).

Die Abbildung 3.50 C stellt die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 dar, die in einem prä-ataktischen Probanden mit dem Simoa Assay gemessen wurde. Für den Baseline Visit ergaben sich 37,26 pg/ml, die im Follow Up 1 Visit auf einen Wert von 49,23 pg/ml anstiegen. Auch in der Messung des Singulex Assays dieses Probanden sieht man einen Anstieg der Konzentration an expandiertem Ataxin-3. Für den Baseline Visit wurden 352,99 pg/ml gemessen und in der Probe des Follow-Up1-Visits ein Wert von 523,98 pg/ml (Abb. 3.50 D).

Es lagen von n=8 mild ataktischen Probanden longitudinale Daten sowohl für den Singulex als auch für den Simoa Assay vor. Für die Baseline Probe der Probanden wurde ein Mittelwert von 44,65 pg/ml mit einem Standardfehler von 7,728 mit dem Simoa Assay gemessen. Für den Follow Up 1 Visit ergab sich ein Mittelwert von 51,14 pg/ml mit einem Standardfehler von 6,569 (Abb. 3.50 E). Der Datensatz der Baseline Proben ist laut Shapiro-Wilks Test normalverteilt ( $p=0,4953$ ), wie auch die Daten des Follow Up 1 ( $p=0,3377$ ). Der durchgeführte t-Test ergab keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Konzentrationen der Baseline und Follow Up 1 Gruppe ( $p=0,679$ ). In der Untersuchung mit dem Singulex Assay ergab sich für den Baseline Visit eine Konzentration von 530,3 pg/ml (SEM=153,0) und für den Follow Up 1 Visit eine Konzentration von 438,2 pg/ml (SEM=168,4), also ein Abfallen der Konzentration im Beobachtungszeitraum (Abb. 3.50 F). Für die Gruppe der Probanden im Baseline Visit ergab sich eine Normalverteilung (Shapiro-Wilks Test;  $p=0,2679$ ), während sich für die Probanden im Follow Up 1 keine Normalverteilung mehr ergab (Shapiro-Wilks Test;  $p=0,0098$ ). Der berechnete Mann-Whitney Test ergab keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Baseline- und Follow Up 1 Daten ( $p=0,4418$ ).

Es wurden n=3 moderat ataktische Probanden untersucht. In der Analyse mit dem Simoa Assay fiel die Ataxin-3 Konzentration von 49,47 pg/ml (SEM= 17,78) auf 48,34 pg/ml (SEM=11,52) leicht ab. Der Shapiro-Wilks Test ergab für die Messungen in der Baseline eine Normalverteilung ( $p=0,6061$ ) und eine

Normalverteilung für die Daten des Follow Up ( $p=1\ 0,9484$ ). Der durchgeführte t-Test ergab keine statistisch signifikante Differenz zwischen den beiden Gruppen ( $p= 0,0743$ ) (Abb. 3.50 G). Abbildung 3.50 H zeigt die Auswertung der  $n=3$  Probanden des Singulex Assays: Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 stieg zwischen den beiden Untersuchungen von  $755,2\ \text{pg/ml}$  ( $\text{SEM}= 25,73$ ) auf  $1109\ \text{pg/ml}$  ( $\text{SEM}= 221,3$ ) an. Die Baseline Werte ( $p= 0,1032$ ) und die Werte der Follow Up 1 Gruppe ( $p= 0,8330$ ) sind laut Shapiro-Wilks Test normalverteilt. Der t-Test ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Messzeitpunkten für die Singulex Daten ( $p= 0,1773$ ).



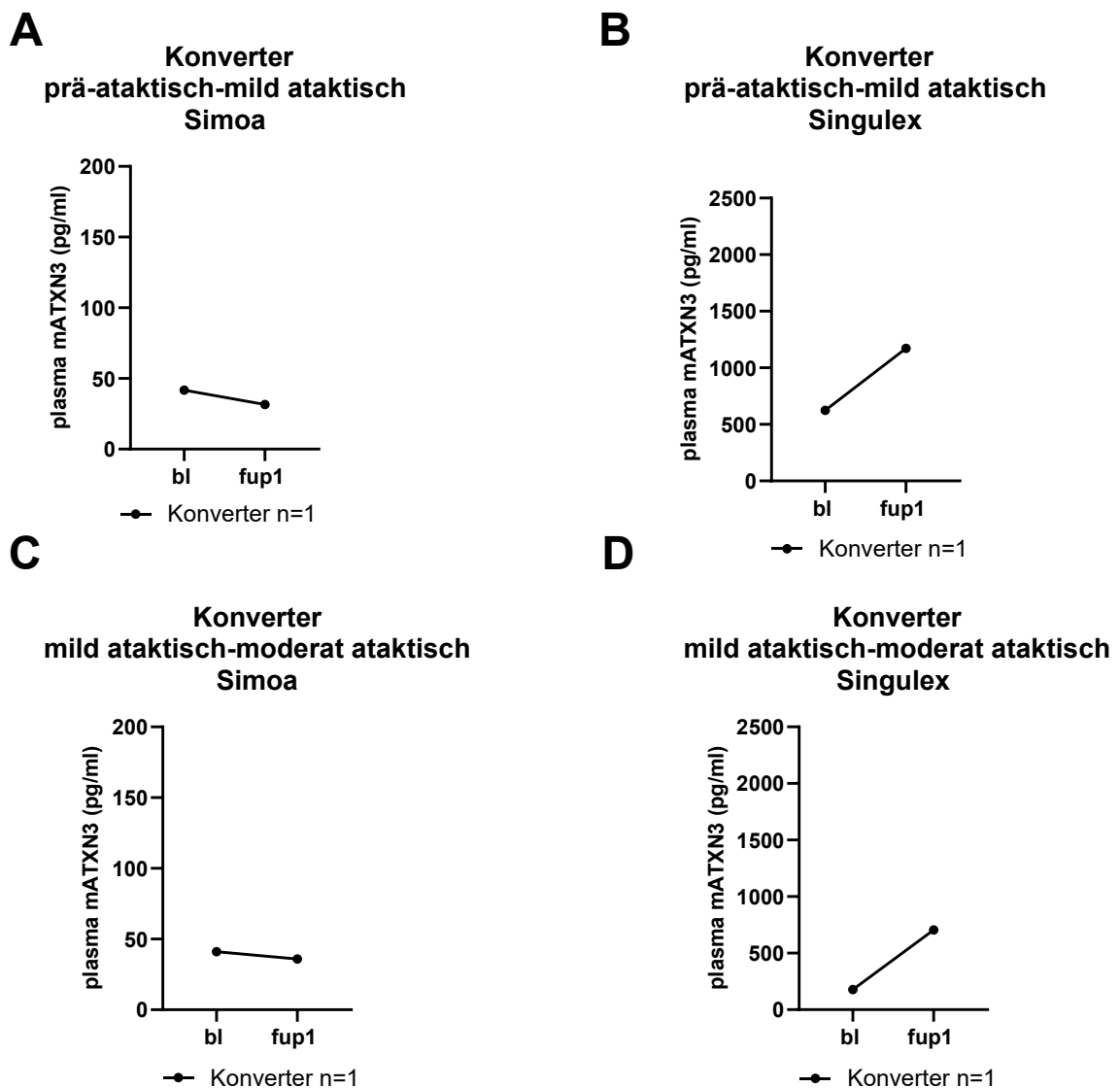
**Abbildung 3.50 A Simoa Kontrolle:** Mit dem Simoa Assay konnte in allen 4 Punkten für die n=2 Probanden 0 pg/ml Hintergrundsignal gemessen werden. **B Singulex Kontrolle:** Mit dem Singulex Assay wurde im Baseline Visit ein Mittelwert von 3,602 pg/ml und im Follow Up 1 ein Mittelwert von 3,168 pg/ml gemessen. **C Simoa prä-ataktisch:** Im prä-ataktischen Probanden wurde eine Konzentration von 37,26 pg/ml gemessen und im Follow Up 1 Visit eine Konzentration von 49,23 pg/ml. **D Singulex prä-ataktisch:** Die Untersuchung der Proben mit dem Singulex Assay ergab einen Anstieg der Ataxin-3 Konzentration von 352,994 pg/ml auf 523,984 pg/ml. **E Simoa mild ataktisch:** In der Simoa Messung ist im Beobachtungszeitraum eine Zunahme der Konzentration an expandiertem Ataxin-3 zu beobachten (BL= 44,65 pg/ml; Fup1=51,14 pg/ml). **F Singulex mild ataktisch:** Die Analyse der Proben mit dem Singulex Assay ergab ein Absinken

*der Konzentration an expandiertem Ataxin-3 von 530,3 pg/ml auf 438,2 pg/ml. **G Simoa moderat ataktisch:** Für die Baseline wurde ein Mittelwert von 49,47 pg/ml gemessen und für die Follow Up 1 Untersuchung ein Mittelwert von 48,34 pg/ml. **H Singulex moderat ataktisch:** Der Mittelwert der untersuchten Proben stieg von 755,2 pg/ml im Baseline Visit auf 1109 pg/ml im Follow Up 1 Visit an.*

Es wurden 2 Konverter mit beiden Methoden untersucht. Das Ergebnis dieser Messungen wurde in Abbildung 3.51 A-D dargestellt. Konverter 1 stieg im Beobachtungszeitraum mit dem SARA Score von x auf y an und wurde im Verlauf zwischen Baseline Untersuchung und Follow Up 1 Untersuchung ataktisch. Die Untersuchung der Proben mit dem Simoa Assay ergab ein Absinken der Werte an expandiertem Ataxin-3. In der Baseline wurde ein Wert von 41,76 mg/ml gemessen. In der Follow Up 1 Probe wurde ein Wert von 31,61 pg/ml gemessen. Im Singulex Assay wurde für denselben Probanden im Baseline Visit 624,38 pg/ml und einen deutlichen Anstieg der Ataxin-3 Konzentration auf 1172,69 pg/ml gemessen. Für Konverter 2, welcher im Laufe des Beobachtungszeitraums von der Kategorie mild ataktisch in die Kategorie moderat? ataktisch wechselt, gibt es ebenfalls eine Simoa und eine Singulex Untersuchung. Die Messung mit dem Simoa Assay ergab in der Baseline Probe einen Wert von 41,14 mg/ml. In der Follow Up 1 Untersuchung fiel die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 auf 35,92 pg/ml ab (Abb. 3.51 C). Mit der Singulex Methode wurde in der Baseline Probe ein Wert von 177,99 pg/ml gemessen, der Wert der Follow Up 1 Probe war mit 704,22 pg/ml höher (Abb. 3.51 D).

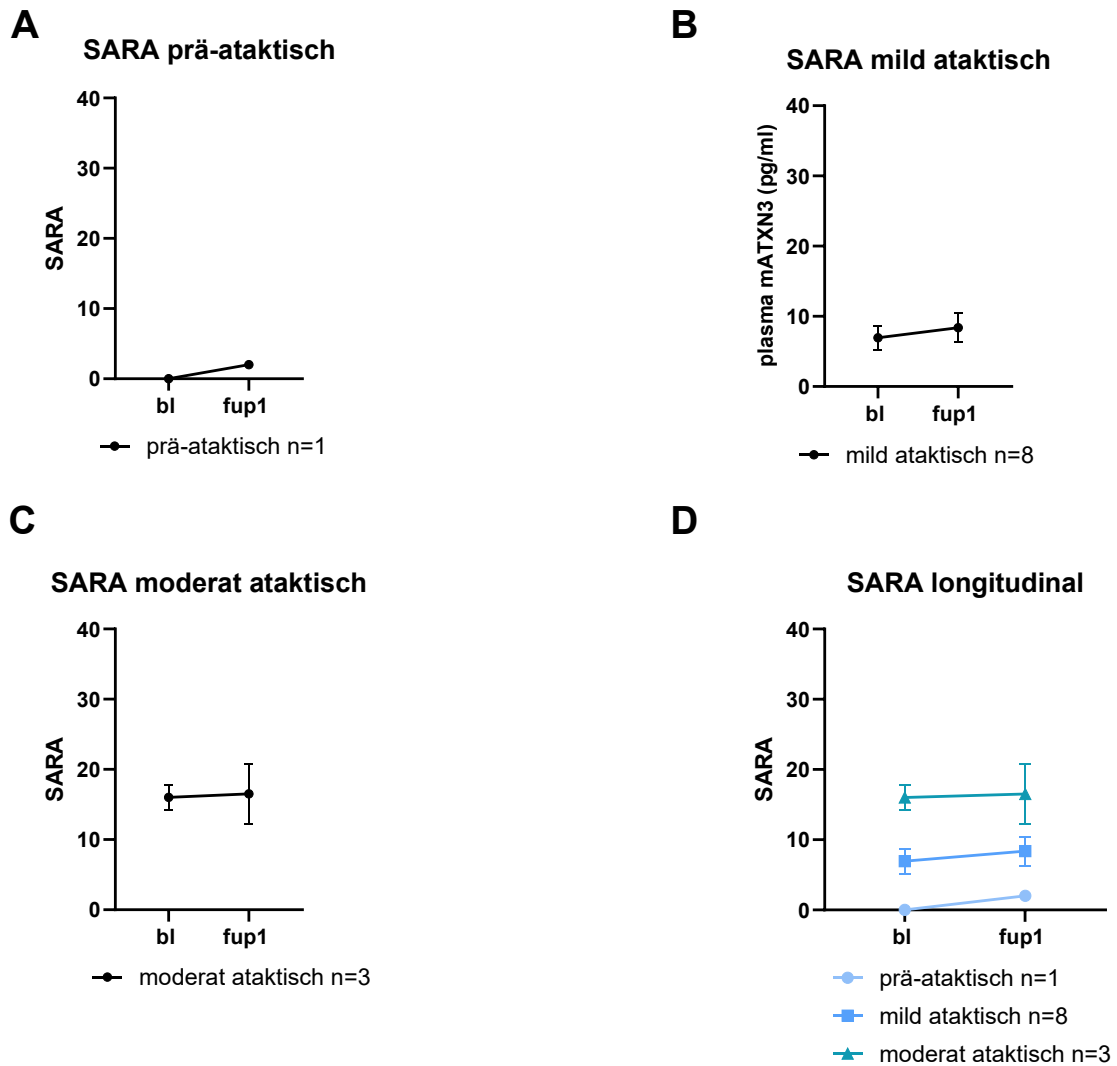
Um die Ergebnisse einzuordnen, wurde ebenfalls der SARA Score der Probanden betrachtet. Stand mehr als ein Proband pro Kategorie zur Verfügung wurde dafür der Mittelwert berechnet. Abbildung 3.52 D stellt die SARA Scores der Gruppen prä-ataktisch, mild, ataktisch und moderat ataktisch longitudinal als Übersichtsdarstellung dar. Den durchschnittlich höchsten SARA Score hat dabei die moderat ataktische Gruppe. Der prä-ataktische Proband hat im Vergleich den niedrigsten SARA Score im Verlauf. Zwischen den Graphen der moderat ataktischen und prä-ataktischen Probanden liegen die Werte der mild ataktischen Probanden (mittelblau Quadrat). Der SARA Score des prä-ataktischen Probanden stieg im Verlauf von 0 Punkten auf 2 Punkte an (Abb. 3.52 A). Für den SARA Score der 8 prä-ataktischen Probanden ergab sich ein Mittelwert von

6,938 Punkten. Für den Follow Up 1 ergab sich ein Wert von 8,375 Punkten (Abb. 3.52 B). Die Daten des Baseline Visits waren normalverteilt (Shapiro-Wilks Test;  $p=0,1394$ ), auch die Follow Up 1 Daten waren laut Shapiro-Wilks Test mit einem  $p=0,4889$  normalverteilt. In Abbildung 4.51 C zeigt den longitudinalen Verlauf des SARA Scores der moderat ataktischen Probanden ( $n=3$ ). Der Mittelwert des SARA Scores des Baseline Visits lag bei 16,00 Punkten (SEM=1,041), der im Follow Up 1 Visit auf 16,50 Punkte anstieg (SEM=2,466).



**Abbildung 3.51** **A Konverter prä-ataktisch-mild ataktisch Simoa:** Für die Baseline Untersuchung wurde eine Konzentration von 41,76 pg/ml gemessen. Für die Follow Up 1 Probe wurde eine Ataxin-3 Konzentration von 31,61 pg/ml bestimmt. **B Konverter prä-ataktisch-mild ataktisch Singulex:** Die Messung ergab für die Baseline Probe eine Konzentration von 624,38 pg/ml und für die Follow Up 1 Probe eine Konzentration von 1172,69 pg/ml. **C Konverter mild ataktisch-moderat ataktisch Simoa:** Für Konverter 2 wurde eine Baseline-Konzentration von

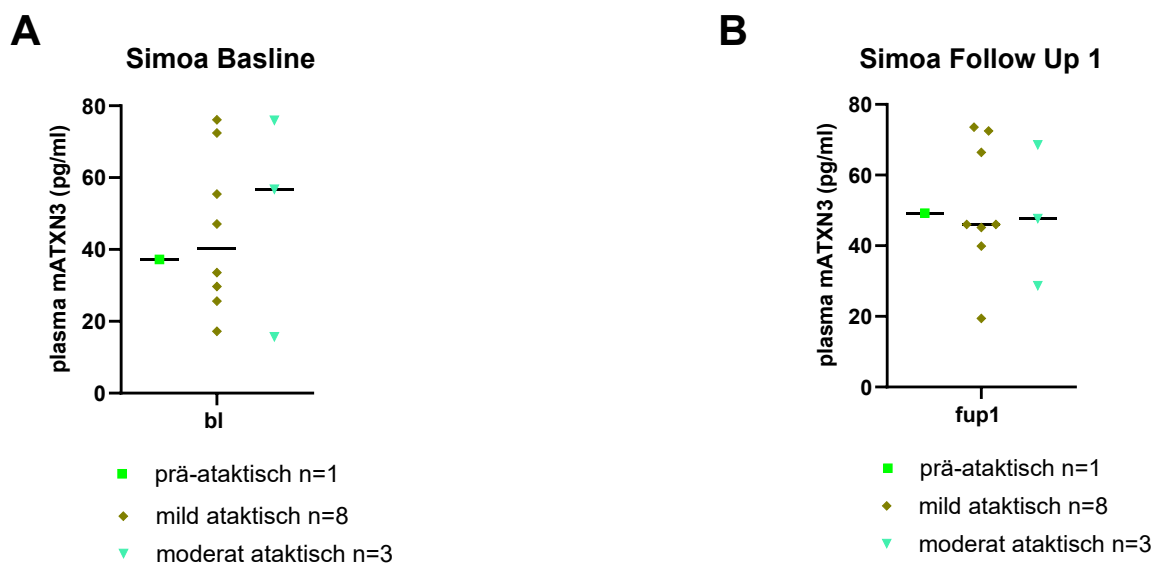
41,14 pg/ml bestimmt und für den Follow Up 1 Visit eine Konzentration von 35,92 pg/ml. **D Konverter mild ataktisch-moderat ataktisch Singulex:** Mit dem Singulex Assay wurde für Konverter 2 in der Baseline Visite eine Konzentration von 177,99 pg/ml gemessen und für Follow Up 1 einen Anstieg der Konzentration auf 704,22 pg/ml.



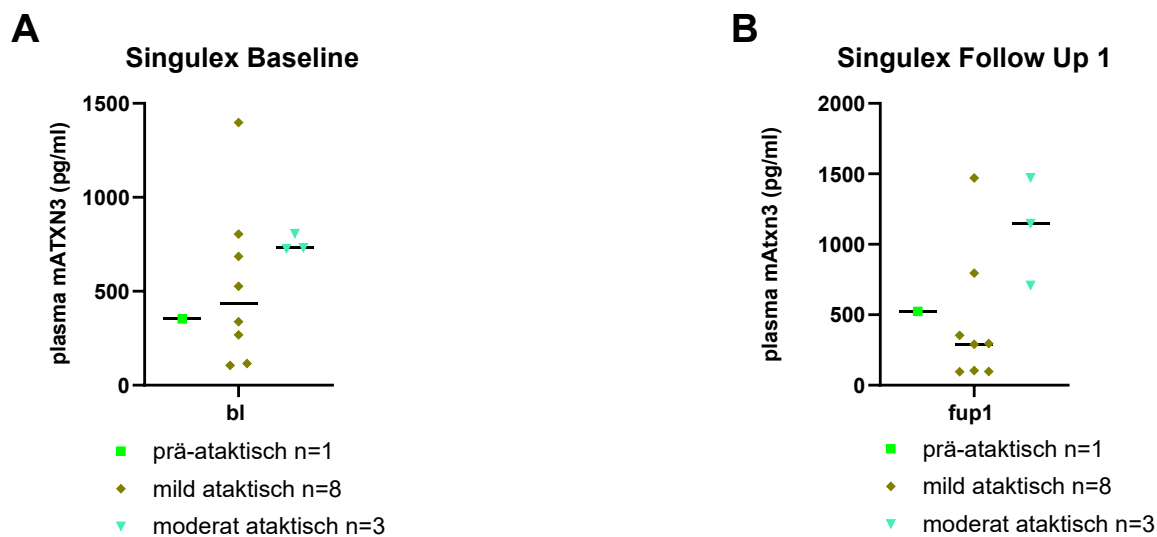
**Abbildung 3.52 A SARA prä-ataktisch:** Der SARA Score des prä-ataktischen Probanden stieg von 0 Punkten (Baseline) auf 2 Punkte (Follow Up 1) an. **B SARA mild ataktisch:** Der Mittelwert des klinisch evaluierten SARA Scores stieg von 6,938 Punkten auf 8,375 Punkte an im Beobachtungszeitraum. **C SARA moderat ataktisch:** Für den Baseline Visit wurde ein Mittelwert von 16 Punkten berechnet und für den Follow Up 1 Visite ein Mittelwert von 16,5 Punkten. **D SARA longitudinal:** Abgebildet sind die Mittelwerte des SARA Scores der 3 untersuchten Gruppen, wobei die moderat ataktischen Probanden durchschnittlich den höchsten SARA Score hatten.

Um die beiden Assays genauer miteinander zu vergleichen, wurde noch eine weitere Analyse durchgeführt, um die Trennschärfe zwischen den prä-

ataktischen, mild ataktischen und moderat ataktischen Probanden zu untersuchen. Abbildung 3.53 A-B zeigt die Untersuchung der Simoa Assay Daten. Dafür wurde zunächst für die Baseline Werte der Probanden ein Kruskal - Wallis Test durchgeführt. Für die Differenz der prä-ataktischen und mild ataktischen Gruppen ergab sich mit  $p > 0,9999$  kein Anhalt für eine statistisch signifikante Differenz. Auch der Vergleich der mild ataktischen mit der moderat ataktischen Gruppe ergab mit einem  $p > 0,9999$  kein statistisch signifikantes Ergebnis. Der Kruskal-Wallis Test für prä-ataktische Probanden im Vergleich zu moderat ataktischen Probanden war nicht statistisch signifikant ( $p > 0,9999$ ) (Abb. 3.53 A). In der Abbildung 3.53 B zeigte sich ein ähnliches Bild bezogen auf die Daten des Follow Up 1: Der durchgeführte Kruskal-Wallis Test ergibt keine statistisch signifikante Differenzierung zwischen den 3 untersuchten Gruppe. Mit einem  $p > 0,9999$  für den Vergleich der prä-ataktischen Probanden mit den mild ataktischen Probanden sowie den prä-ataktischen Probanden mit den moderat ataktischen Probanden und den mild ataktischen Probanden mit den moderat ataktischen Probanden.



**Abbildung 3.53 A Simoa Baseline:** Der Kruskal-Wallis Test ergab keine statistisch signifikante Differenzierbarkeit zwischen den prä-ataktischen, mild ataktischen und moderat ataktischen Probanden für die Analyse mit dem Simoa Assay ( $p > 0,9999$ ). **B Simoa Follow Up 1:** Der Kruskal-Wallis Test ergab keine statistisch signifikante Differenzierbarkeit zwischen den prä-ataktischen, mild ataktischen und moderat ataktischen Probanden für die Analyse mit dem Simoa Assay ( $p > 0,9999$ ).

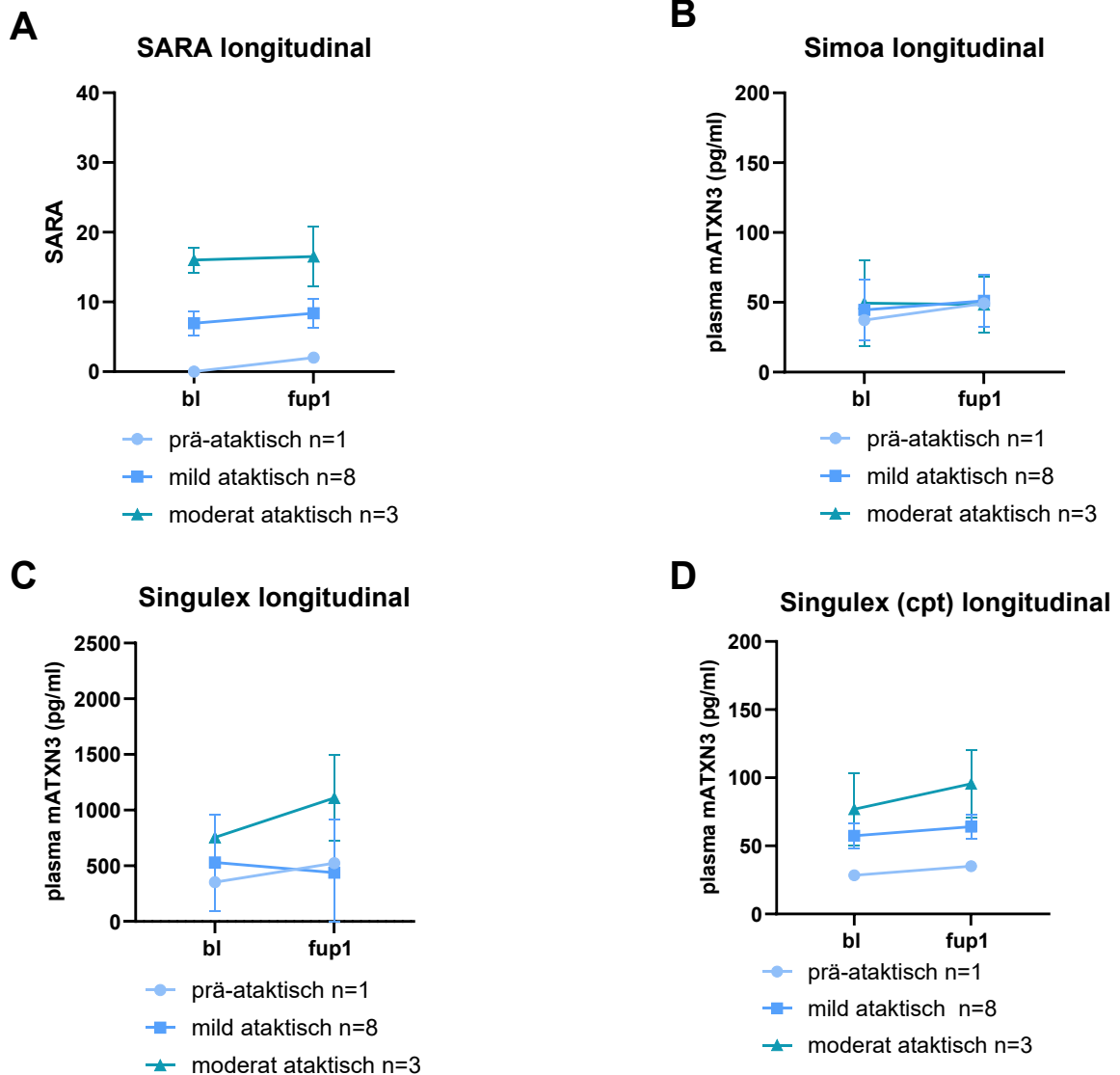


**Abbildung 3.54 A Singulex Baseline** Der Kruskal-Wallis Test ergab keine statistisch signifikante Differenzierbarkeit zwischen den prä-ataktischen, mild ataktischen und moderat ataktischen Probanden für die Analyse mit dem Singulex Assay. **B Singulex Follow Up 1:** Der Kruskal-Wallis Test ergab keine statistisch signifikante Differenzierbarkeit zwischen den prä-ataktischen, mild ataktischen und moderat ataktischen Probanden für die Analyse mit dem Singulex Assay.

Auch die Singulex Daten wurden auf die gleiche Weise analysiert (Abb. 3.54 A-B), um die Differenzierbarkeit zwischen den 3 Gruppen (prä-ataktisch, mild, ataktisch und moderat ataktisch) zu betrachten. Für die Untersuchung der Baseline Daten mit dem Kruskal-Wallis Test ergab sich für den Vergleich der prä-ataktischen mit der mild ataktischen Gruppe kein statistisch signifikantes Ergebnis  $p > 0,9999$ . Für den Kruskal-Wallis Test der prä-ataktischen im Vergleich zur moderat ataktischen Gruppe ergab sich kein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p = 0,8939$ ). Mit einem P-Wert von  $p = 0,3861$  war die Differenz der Ataxin-3 Werte der mild ataktischen und moderat ataktischen nicht statistisch signifikant (Abb. 3.54 A). Abbildung 3.54 B zeigt die expandierten Ataxin-3 Konzentrationen der Probanden im Follow Up 1. Für den Vergleich der prä-ataktischen mit den mild ataktischen Probanden ergab sich statistisch signifikante Differenz ( $p > 0,9999$ ). Auch für den Vergleich der prä-ataktischen mit den moderat ataktischen Probanden konnte mit dem Kruskal-Wallis Test keine statistisch signifikante Differenzierung zwischen den Gruppen errechnet werden ( $p > 0,9999$ ). Der

Kruskal-Wallis Test ergab für den Vergleich mild ataktisch mit moderat ataktisch  $p= 0,1374$ , also auch kein statistisch signifikantes Ergebnis.

Abbildung 3.55 A-D zeigt zusammenfassend den longitudinalen Verlauf des SARA Scores der Probanden sowie der Konzentration an expandiertem Ataxin-3 im Verlauf gemessen durch den Simoa Assay und den Singulex Assay sowie des Singulex Assays gemessen in CPT-Blut-Röhrchen. Das Plasma für den SIMOA Assay wurde ebenfalls in CPT-Blut-Röhrchen gesammelt, sodass zum Vergleich noch einmal die Daten einer früheren Arbeit herangezogen wurden. Der prä-ataktische Proband zeigte in der Messung mit den CPT-Röhrchen einen Anstieg der Konzentration an expandiertem Ataxin-3 von 28,4 pg/ml auf 35,07 pg/ml. Auch die  $n=8$  moderat ataktischen Probanden zeigten einen Anstieg von 57,47 pg/ml auf 64,09 pg/ml. Die schwer ataktischen Probanden haben durchschnittlich eine Konzentration von 78,79 pg/ml im Plasma, diese stieg auf 95,52 pg/ml im Follow Up Visit 1.



**Abbildung 3.55 A SARA Score longitudinal:** Darstellung der SARA Scores im Verlauf der prä-ataktischen, mild ataktischen und moderat ataktischen Probanden. Die beiden symptomatisch ataktischen Probanden haben höhere SARA Scores als der prä-ataktische Proband. **B Simoa Assay longitudinal:** Die Abbildung zeigt den Verlauf der Konzentrationen an expandiertem Ataxin-3 analysiert mit dem Simoa Assay. **C Singulex Assay longitudinal:** Während die expandierte Ataxin-3 Konzentration in den moderat ataktischen Probanden und im prä-ataktischen Probanden im Verlauf der Untersuchung anstieg, sank die Konzentration der mild ataktischen Probanden von 530,34 pg/ml auf durchschnittlich 438,19 pg/ml ab. **D Singulex longitudinal in CPT-Röhrchen:** Die höchsten Konzentrationen an expandiertem Ataxin-3 wurden durchschnittlich gemessen in den moderat ataktischen Probanden. Der prä-ataktische Proband hatte die niedrigsten Konzentrationen an Ataxin-3 in beiden Visiten. Die Werte der mild ataktischen Probanden liegen zwischen denen der prä-ataktischen und moderat ataktischen Probanden.

### 3.8 Vergleich der Ataxin-3 Konzentration in Simoa und TR-FRET

#### 3.8.1 Kohortenanalyse der Simoa und TR-FRET Kohorte

Der Simoa Assay misst das expandierte Ataxin-3 im Plasma der Probanden, während der n-Term Assay der TR-FRET Technik das Gesamt Ataxin-3 in den PBMCs der Probanden misst. Die Ergebnisse des Simoa Assays werden in pg/ml gemessen, während die Ergebnisse des n-Term TR-FRET Assays in  $\Lambda$  F angegeben werden. Diese beiden Messmethoden sollen nun an 44 Probanden miteinander verglichen werden. Es stehen Daten von 8 Kontrollprobanden, 4 prä-ataktischen Probanden und 32 ataktischen Probanden zur Verfügung. Zunächst erfolgte die Kohortenanalyse, dargestellt in Tabelle 33 Ein AAO lag nur bei 30 der 32 ataktischen Probanden vor. In der Tabelle 33 wird der Median und der Interquartilenabstand angegeben.

Tabelle 33 Kohortenanalyse der Simoa vs. n-Term Kohorte

	KONTROLLEN	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL</b>	8	4	32
<b>ALTER</b>	34,50 (27-58,75)	32,5 (23,5-35,5)	52,50 (43-61)
<b>SARA</b>	0 (0-0,375)	1 (0,25-1,375)	15,75 (6,125-21,38)
<b>EXPANDIERTES ALLEL</b>	-	70 (69,25-70,75)	70 (65,25-72)
<b>AAO</b>	-	-	38,50 (33-46,25)

Die jüngsten Probanden gab es statistisch gesehen in der Gruppe der prä-ataktischen Probanden mit einem Median von 32,5 Jahren und einem Interquartilenabstand von 23,5-35,5 Jahren. Am höchsten viel das durchschnittliche Alter der ataktischen Probanden aus mit 52,5 Jahren (IQA=43-61). Das mediane Alter der Kontrollen lag bei 34,50 Jahren (IQA 27-58,75). Signifikant zwischen den Gruppen?

Der SARA Score der Kontrollen lag im Median bei 0 Punkten mit einem Interquartilenabstand von 0-0,375 Punkten. Der SARA Score der prä-ataktischen Probanden betrug 1 Punkt im Durchschnitt (IQA=0,25-1,375). Der SARA Score

der ataktischen Probanden war im Median mit 15,75 Punkten und einem Interquartilenabstand von 6,125-21,38 Punkten am größten.

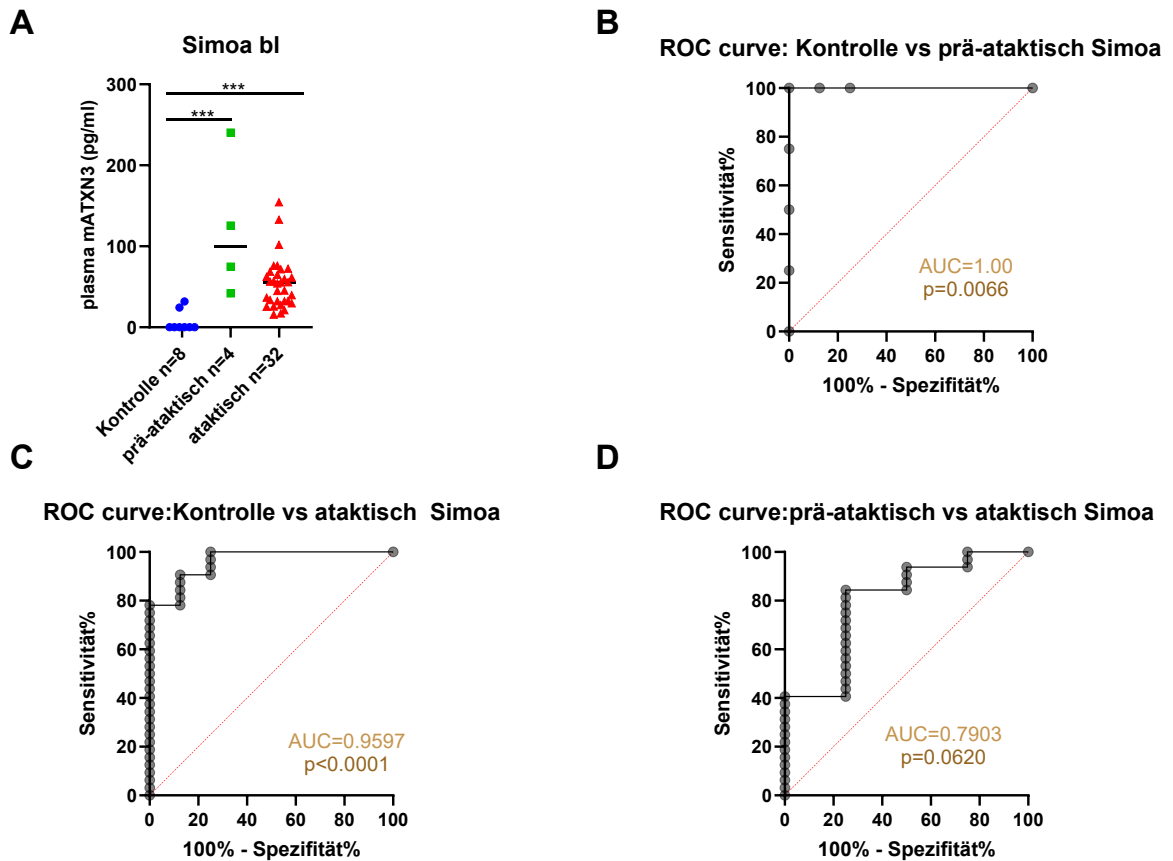
Die Länge des expandiertem CAG-Repeats beträgt 70 *CAG-Repeats* bei den prä-ataktischen Probanden (IQA=69,25-70,75). Für die ataktischen Probanden beträgt das expandierte Allel im Median ebenfalls 70 *CAG-Repeats* mit einem Interquartilenabstand von 65,25-72 *CAG-Repeats*.

Das AAO der ataktischen Probanden ergab im Median ein Alter von 38,5 Jahren mit einem Interquartilenabstand von 33-46,25 Jahren.

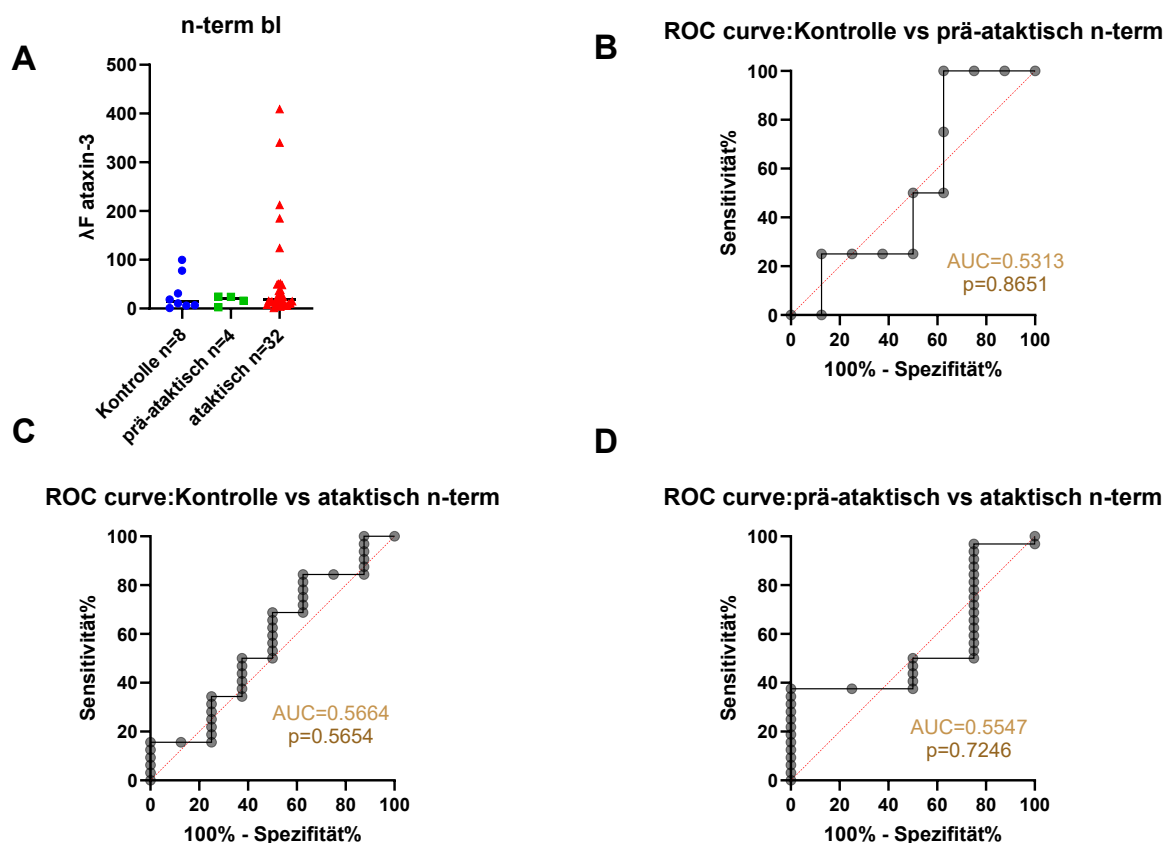
### **3.8.2 Vergleich der Trennschärfe für Simoa Assay vs. TR-FRET Assay**

Es wurden die Baseline Gruppe der Probanden weiter untersucht. Dafür ergab sich für eine Analyse der Ataxin-3 Konzentration der Simoa Daten für die Daten der Kontrollen eine Normalverteilung (Shapiro-Wilks Test;  $p=0,0002$ ). Für die prä-ataktischen Probanden ergab der Shapiro Wils Test eine Normalverteilung mit  $p=0,5720$ . Mit einem P-Wert von  $p=0,0010$  waren die Ataxin-3 Konzentrationen der ataktischen Probanden nicht normal verteilt. Der Kruskal-Wallis Test ergab eine statistisch signifikante Differenz zwischen den Werten der Kontrollen und der ataktischen Probanden ( $p= 0,0004$ ). Mit einem P-Wert  $p=0,0004$  ergab sich zwischen den Kontrollen und den prä-ataktischen Probanden eine statistisch signifikante Differenz der Ataxin-3 Konzentrationen. Der Vergleich der prä-ataktischen und ataktischen Probanden war nicht signifikant mit  $p=0,3178$ . Der Mittelwert der Konzentration der Kontrollprobanden lag bei 5,75 pg/ml. Für die prä-ataktischen Probanden wurde ein Mittelwert von 36 pg/ml berechnet und für die ataktischen Probanden eine Konzentration von 25 pg/ml an expandiertem Ataxin-3 (Abb. 3.56 A). Abbildung 3.56 B zeigt die *ROC Curve* der Kontrollen und prä-ataktischen Probanden. Die AUC lag bei 1,0 und der P-Wert bei  $p=0,066$ . Die Abbildung 3.56 C zeigt die *ROC Curve* der Analyse zwischen den Kontrollen und den ataktischen Probanden. Weiter wurde die AUC auf 0,9597 berechnet, es ergab sich eine gute Differenzierung zwischen den beiden Gruppen mit einem  $p<0,0001$ . Die *ROC Curve* für die Differenzierung zwischen den ataktischen und prä-ataktischen Probanden zeigt eine AUC=0,7903 mit einem P-Wert von  $p=0,0620$  (Abb. 3.56 D).

Dieselben statistischen Untersuchungen wurden auch für die Ergebnisse der TR-FRET Analyse durchgeführt. Ein Shapiro-Wilks Test auf Normalverteilung ergab für die Gruppe der Kontrollprobanden  $p=0,0238$ , also keine parametrische Verteilung. Die Daten der Gesamt Ataxin-3 Konzentration der prä-ataktischen Probanden zeigten eine Normalverteilung ( $p=0,2294$ ). Der durchgeführte Shapiro-Wilks Test für die ataktischen Probanden zeigte keine Normalverteilung ( $p<0,0001$ ). Abbildung 3.57 A zeigt die Ergebnisse der TR-FRET Messung der Probanden, aufgeteilt in die Gruppierungen Kontrollen, prä-ataktisch und ataktisch. Im Gegensatz zur quantitativen Messung des Simoa Assays in pg/ml werden die Ergebnisse des TR-FRET Durchganges in  $\Delta F$  angegeben. Es ergab sich bei der Berechnung des Mittelwertes sowohl für die Probanden der Kontrollgruppe als auch für die Probanden der prä-ataktischen Gruppe ein Mittelwert von 20,50  $\Delta F$  an Gesamt Ataxin-3. Der Mittelwert der ataktischen Probanden betrug 23,25  $\Delta F$ . Es zeigte sich im Kruskal-Wallis Test keine signifikante Differenz zwischen den Kontrollen und den ataktischen Probanden ( $p >0,9999$ ). Auch der Vergleich der Werte der Kontrollen und prä-ataktischen Probanden ergab mit  $p>0,9999$  kein statistisch signifikantes Ergebnis. Das gleiche gilt für den Kruskal-Wallis Test für die ataktischen und prä-ataktischen Probanden, der ebenfalls  $p>0,9999$  zeigte. In Abbildung 3.57 B wird die *ROC Curve* der Kontrollen und prä-ataktischen Probanden gezeigt, deren  $AUC=0,5313$  beträgt bei  $p=0,8651$ . Die Abbildung 3.57 C zeigt für die Analyse der *ROC Curve* der Kontrollen und ataktischen Probanden eine  $AUC= 0,5664$  und  $p=0,5654$ . Die Abbildung 3.57 D ergibt für die *ROC Curve* Analyse der Daten der ataktischen Probanden und der prä-ataktischen Probanden eine  $AUC= 0,5547$  sowie  $p=0,7246$ .



**Abbildung 3.56 A Konzentration an expandiertem Ataxin-3 in Kontrollen, prä-ataktische Probanden und ataktischen Probanden:** Es ergab sich eine rechnerisch signifikante Differenz zwischen den expandierten Ataxin-3 Werten der Kontrollen und ataktischen Probanden ( $p=0,00049$ ) und den Kontrollen und den prä-ataktischen Probanden ( $p=0,0004$ ). **B ROC Curve der Kontrollen vs. prä-ataktischen Probanden:** Es wurde eine  $AUC=1,0$  und  $p=0,0066$  berechnet. **C ROC Curve der Kontrollen vs. ataktischen Probanden:** Es wurde eine  $AUC=0,9597$  berechnet mit einem  $p<0,0001$  für die ROC Curve der Kontrollen und ataktischen Probanden. **D ROC Curve prä-ataktisch vs. ataktische Probanden:** Die  $AUC$  der ROC Curve für die ataktischen und prä-ataktischen Probanden lag bei  $0,7903$  mit einem  $p=0,0620$ .



**Abbildung 3.57 A Konzentration an Gesamt Ataxin-3 in Kontrollen, prä-ataktischen und ataktischen Probanden:** Es zeigt sich keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Ataxin-3 Konzentrationen der untersuchten Gruppe ( $p > 0,9999$ ). **B ROC Curve Kontrollen vs. prä-ataktisch:** Die AUC ergibt einen Wert von 0,5313 mit einem  $p = 0,8651$ . **C ROC Curve Kontrollen vs. ataktisch:** Die AUC ergibt einen Wert von 0,5664 und  $p = 0,5654$  für die ROC Curve Analyse der Kontrollen und ataktischen Probanden. **D ROC Curve prä-ataktisch vs. ataktisch:** Die ROC Curve der prä-ataktischen gegen die ataktischen Probanden ergibt eine AUC=0,5547 und  $p = 0,7246$ .

### 3.8.3 Longitudinale Analyse der Simoa und TR-FRET Daten im Vergleich

Es lagen Daten von 5 Probanden vor, die longitudinal mit beiden Assays- Simoa Assay und TR-FRET Assay- untersucht worden waren. Es wurden  $n = 3$  mild ataktische Probanden untersucht. Die Simoa Messung ergab für den Baseline Visit einen Mittelwert von 52,39 pg/ml mit einem Standardfehler von 14,65. Für die Follow Up1 Messung ergab sich als Mittelwert 55,23 pg/ml mit einem Standardfehler von 9,184 (Abb. 3.58 A). Dieselben 3 Probanden wurden mit dem TR-FRET Assay untersucht: Der Mittelwert des Baseline Visits lag bei 15,57 ΔF mit einem Standardfehler bei 10,52. Der Follow Up 1 Visit hat einen Mittelwert

von 37,82  $\Delta F$  (SEM=6,029), es ist also im longitudinalen Verlauf ein Anstieg der Gesamt Ataxin-3 Konzentration zu beobachten (Abb. 3.58 B). Abbildung 4.57 C zeigt die mit dem Simoa Assay gemessene Konzentration an expandiertem Ataxin-3 in einem moderat ataktischen Probanden. Der Wert der Baseline Probe lag bei 56,75 pg/ml und sank auf 47,71 pg/ml in der Follow Up 1 Probe ab. Das Gesamt Ataxin des Probanden, welches mit dem TR-FRET bestimmt wurde, stieg ausgehend von einem Baseline Wert von 51,32  $\Delta F$  stark auf einen Follow Up 1 Wert von 1697,66  $\Delta F$  an (Abb. 3.58 D). Der schwer ataktische Proband der mit beiden Untersuchungsmethoden analysiert werden konnte, zeigte im Simoa 59,72 pg/ml in der Baseline Visite und eine Konzentration von 48,06 pg/ml in der Follow Up 1 Visite (Abb. 4.57 E). Für den schwer ataktischen Probanden ergab sich mit dem n-Term Assay 5,2  $\Delta F$  als Konzentration beim Baseline Visit und 127,35  $\Delta F$  beim Follow Up 1 Visit (Abb. 3.58 F).

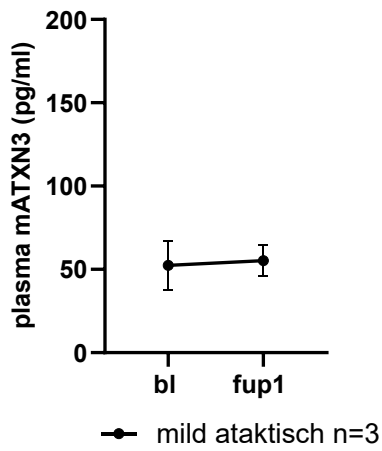
Es wurde ein Konverter untersucht, der sich in seiner ataktischen Symptomatik im Beobachtungszeitraum verbessert hat und von der Kategorie moderat ataktisch zu mild ataktisch wechselte. In der Untersuchung des Simoa Assays ergab sich ein Anstieg der Ataxin-3 Konzentration von 62,59 pg/ml auf 99,82 pg/ml (Abb. 3.59 A). Die Konzentration an Gesamt Ataxin-3 fiel im Beobachtungszeitraum ab von einem Baseline Wert von 49,17  $\Delta F$  auf 25,28  $\Delta F$  im Follow Up 1 Visit (Abb. 3.59 B).

Die SARA Scores der untersuchten Probanden wurde in Abbildung 4.59 dargestellt. Der SARA Score der mild ataktischen Probanden lag im Mittelwert in der Baseline bei 5,667 Punkten (SEM=0,4410), lag im Follow Up 1 Visit bei 6,667 Punkte (SEM=0,7265) (Abb. 3.60 A). Der moderat ataktische Proband zeigte ebenfalls klinisch einen Anstieg des SARA Scores von 18 Punkte auf 21 Punkte (Abb. 4. 59 B). Abbildung 3.60 C zeigte den SARA Score des schwer ataktischen Probanden im longitudinalen Verlauf, der mit 28 Punkten stabil bleibt.

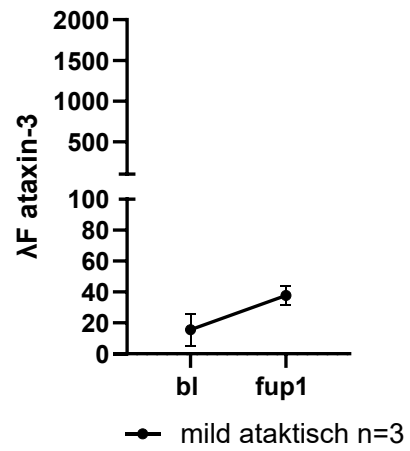
Abbildung 5.60 zeigt im longitudinalen Verlauf den SARA Score der Probanden. Den höchsten SARA Score hat der schwer ataktische Proband (Abb. 3.61 A). Den niedrigsten SARA Score hatte der mild ataktischen Proband. Die Abbildung 3.61 B zeigt die Ergebnisse der Simoa Assay Analyse, die Ergebnisse der Konzentrationsanalyse der mild ataktisch, moderat ataktischen und schwer

ataktischen Probanden liegen optisch eng beieinander. Die Abbildung 3.61 C zeigt die Ergebnisse des TR-FRET für das Gesamt Ataxin-3 zur Übersicht. Auch hier zeigt sich besonders der starke Konzentrationsanstieg des moderat ataktischen Probanden.

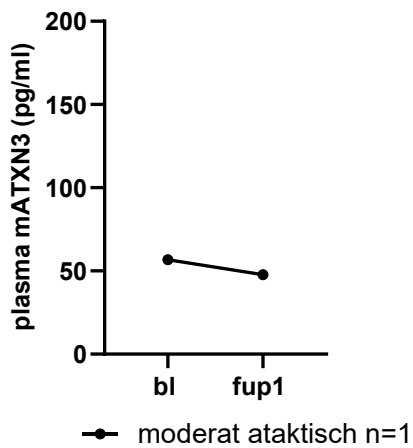
**A** mild ataktisch Simoa



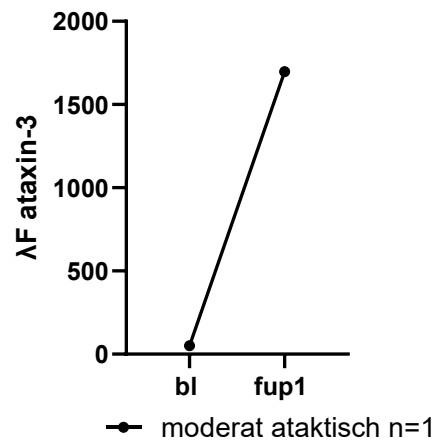
**B** mild ataktisch n-term



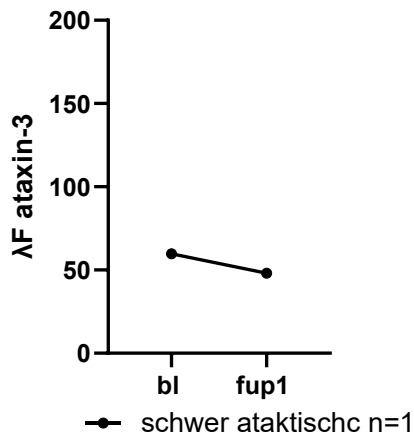
**C** moderat ataktisch Simoa



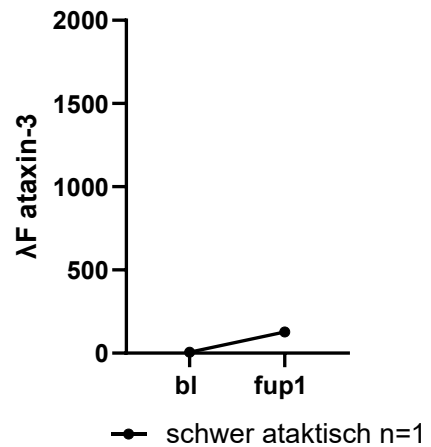
**D** moderat ataktisch n-term



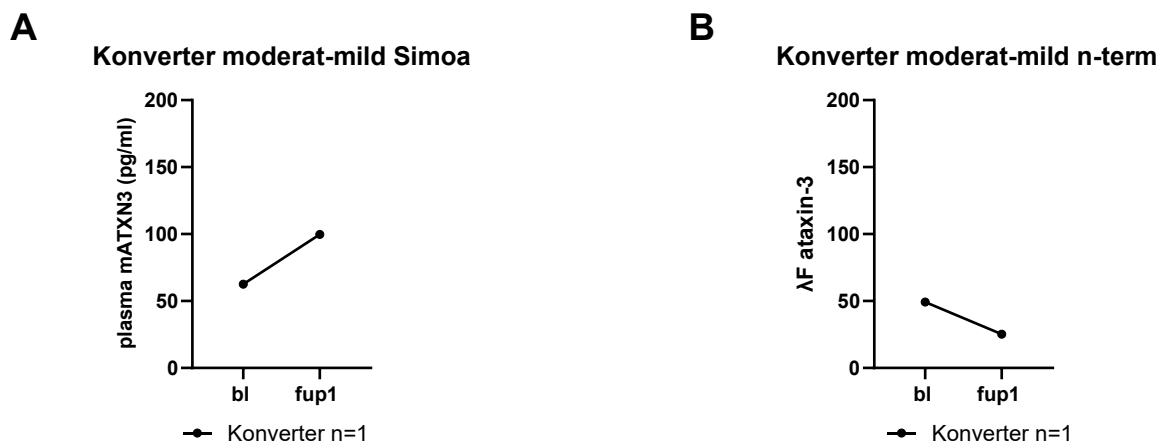
**E** schwer ataktisch Simoa



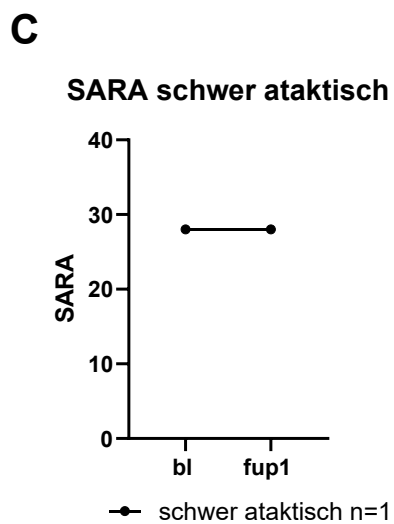
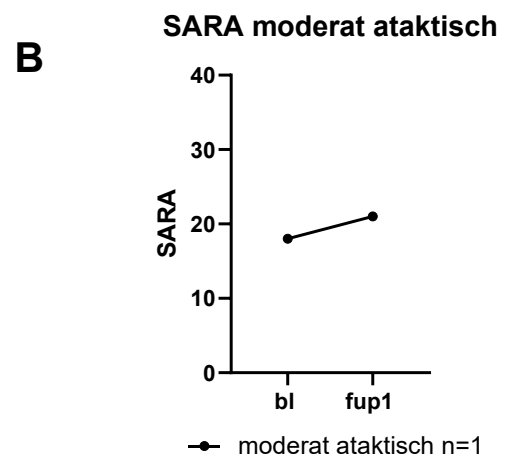
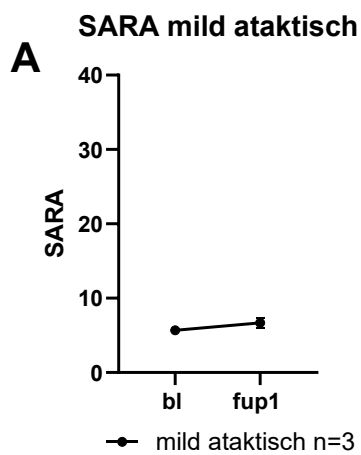
**F** schwer ataktisch n-term



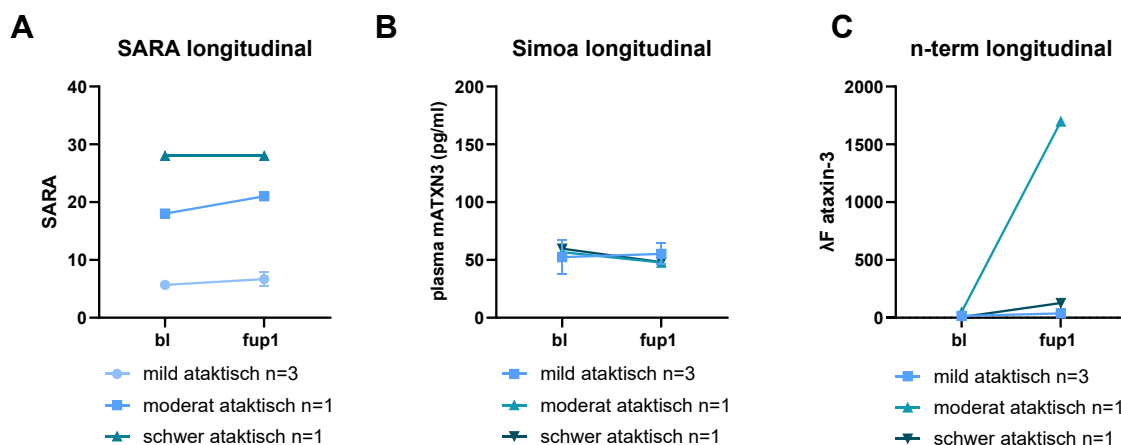
**Abbildung 3.58 A Expandierte Ataxin-3 Konzentration der mild ataktischen Probanden:** Der Mittelwert der expandierten Ataxin-3 Konzentration stieg im Beobachtungszeitraum von 52,39 pg/ml leicht auf 55,23 pg/ml an. **B Gesamt Ataxin-3 Konzentration der mild ataktischen Probanden:** Im Baseline wurde ein Mittelwert von 15,57  $\Delta$ F und im Follow Up 1 ein Mittelwert von 37,82  $\Delta$ F berechnet. **C Expandierte Ataxin-3 Konzentration des moderat ataktischen Probanden:** Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 sank von 56,75 pg/ml im Baseline auf 47,71 pg/ml im Follow Up 1 Visit ab. **D Gesamt Ataxin-3 Konzentration des moderat ataktischen Probanden:** Die Konzentration an Gesamt Ataxin-3 stieg im Verlauf an. Ausgehend von einer Baseline Konzentration von 51,32  $\Delta$ F auf eine Konzentration von 1697,66  $\Delta$ F im Follow Up 1 Visit. **E Expandierte Ataxin-3 Konzentration des schwer ataktischen Probanden 1:** Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 betrug im Plasma des schwer ataktischen Probanden im Baseline Visit 59,72 pg/ml und im Follow Up 1 Visit 48,06 pg/ml. **F Expandierte Ataxin-3 Konzentration des schwer ataktischen Probanden 2**



**Abbildung 3.59 A Konverter Simoa:** Das expandierte Ataxin-3 stieg von 62,59 pg/ml auf 99,82 pg/ml an. **B Konverter n-Term TR-FRET:** Die Konzentration an Gesamt Ataxin-3 sank im Verlauf von Baseline Visit zu Follow Up 1 Visit von 49,17  $\Delta$ F auf 25,28 ab.



**Abbildung 3.60** **A SARA Score der mild ataktischen Probanden:** Der SARA Score stieg von 5,67 Punkte auf 6,67 Punkte an. **B SARA Score des moderat ataktischen Probanden:** Der SARA Score lag bei 18 Punkten in der Baseline Untersuchung und bei 21 Punkten im Follow Up 1 Visit. **C SARA Score des schwer ataktischen Probanden:** Der SARA Score blieb bei 28 Punkten konstant.



**Abbildung 3.61 A SARA Score longitudinal:** Die Abbildung zeigt die SARA Scores der mild ataktischen und moderat ataktischen und der schwer ataktischen Probanden, wobei der SARA Score der schwer ataktisch Probanden die höchsten Werte sind. **B expandiertes Ataxin-3 Simoa longitudinal:** Die Abbildung zeigt eine Übersicht der Konzentrationsanalysen mit dem Simoa Assay für die ataktischen Probanden. **C full-length Ataxin-3 n-Term longitudinal:** Der longitudinale Verlauf der Gesamt Ataxin-3 Konzentration wird für die Ergebnisse des TR-FRET n-Term Assay dargestellt.

### 3.9 Vergleich Singulex vs. TR-FRET n-Term

#### 3.9.1 Kohortenanalyse für die Kohorte Singulex vs. TR-FRET

Es wurden 10 Kontrollprobanden, 11 prä-ataktische Probanden und 70 ataktische Probanden mit dem Singulex Assay und dem n-Term TR-FRET untersucht und die Daten miteinander verglichen. Zunächst wurde eine Kohortenanalyse dafür durchgeführt (Tabelle 34). Es liegen nur von 69 der 70 ataktischen Probanden die Länge des expandierten Alleles vor und nur von 63 das AAO. Abgebildet werden der Median und der Interquartilenabstand der Probandengruppe.

Tabelle 34 Kohortenanalyse der Kohorte Baseline Singulex vs. TR-FRET

	KONTROLLEN	PRÄ-ATAKTISCH	ATAKTISCH
<b>ANZAHL</b>	10	11	70
<b>ALTER</b>	41 (28,25-59)	34 (25,5-40)	52 (46-61)
<b>SARA SCORE</b>	0,5 (0-0,625)	1,5 (1,0-2,0)	11 (7,375-17)
<b>EXPANDIERTES ALLEL</b>	-	70 (64-70)	69 (66-71)
<b>AAO</b>	-	-	41 (34-47)

Es wurden 10 Kontrollen mit einem medianen Alter von 41 Jahren und einem Interquartilenabstand von 28,25-59 Jahren untersucht. Das niedrigste Alter haben im Durchschnitt die prä-ataktischen Probanden mit 34 Jahren (IQA=25,5-40), während die ataktischen Probanden am ältesten sind mit durchschnittlich 52 Jahren (IQA=46-61).

Der SARA Score der Kontrollen war durchschnittlich am niedrigsten mit 0,5 Punkten (0-0,625). Im Median lag der SARA Score der prä-ataktischen Probanden bei 1,5 Punkten mit einem Interquartilenabstand von 1,0-2,0. Den höchsten SARA Score hatten die ataktischen Probanden mit einem Median von 11 Punkten (IQA=7,375-17).

Die prä-ataktischen Probanden wiesen ein expandiertes Allel mit einer durchschnittlichen Länge von 70 *CAG-Repeats* auf (IQA=64-70). Damit war der Median etwas höher als der Median der ataktischen Probanden mit einer Länge von 69 *CAG-Repeats* (IQA=66-71).

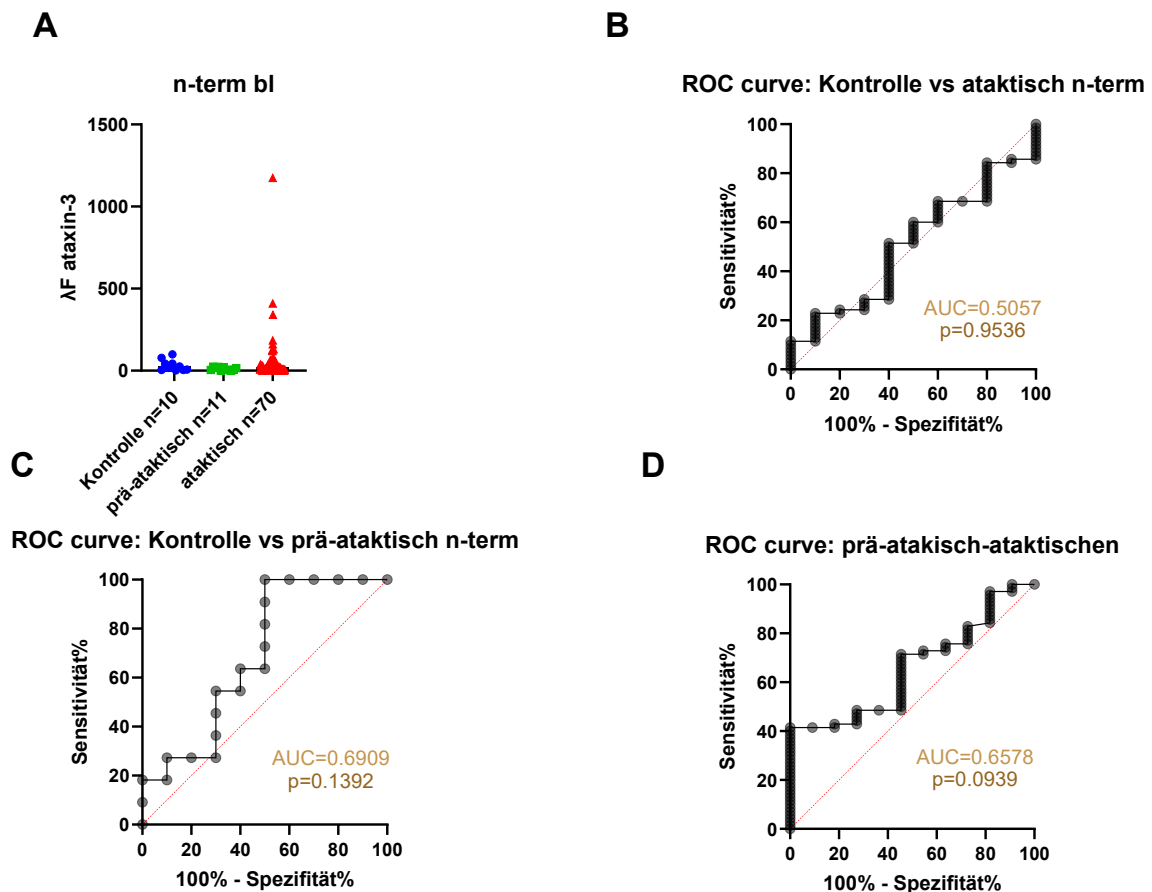
Das AAO lag bei durchschnittlich 40 Jahren mit einem Interquartilenabstand von 34 bis 47 Jahren.

### **3.9.2 Vergleich der Trennschärfe des Singulex Assay vs. n-Term TR-FRET Assay**

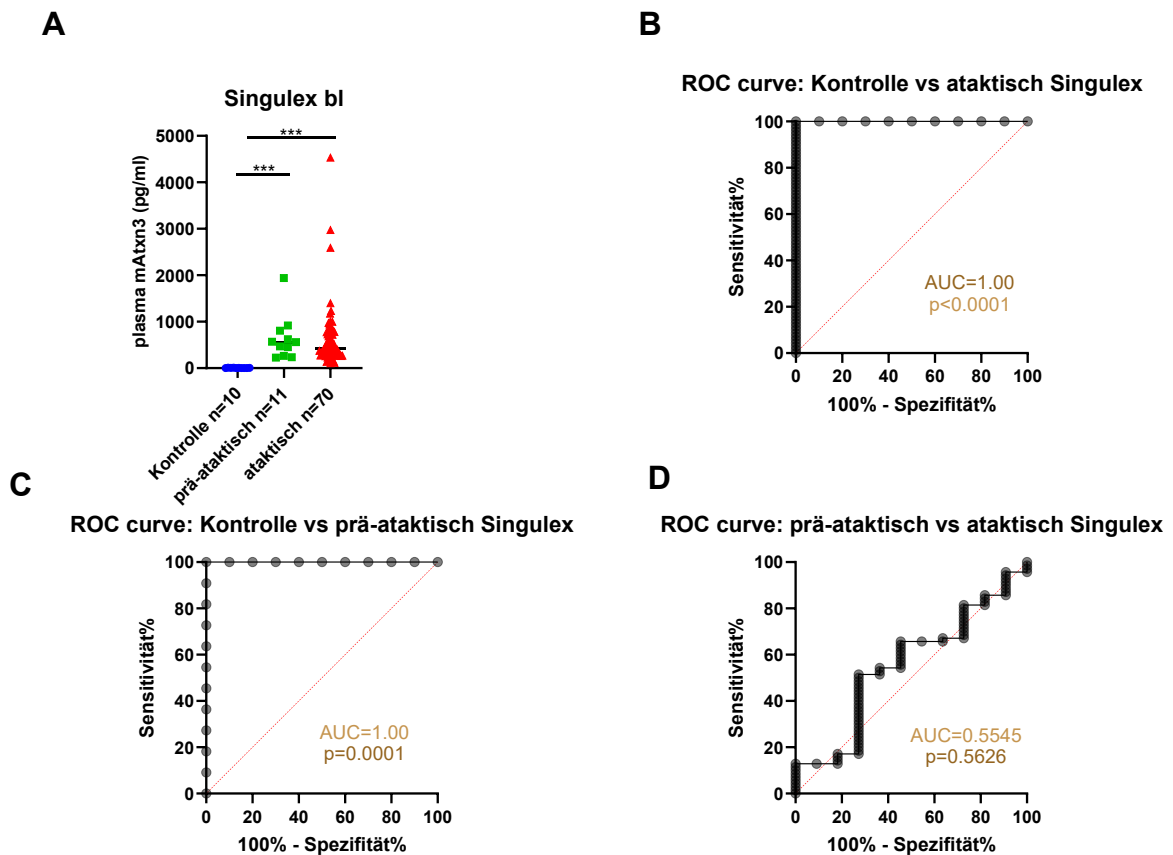
Abbildung 3.62 A zeigt die gemessenen Gesamt Ataxin-3 Konzentrationen in AF der Kontrollen, prä-ataktischen und ataktischen Probanden mit dem n-Term TR-FRET Assay. Zunächst wurde eine Testung auf Normalverteilung in allen Gruppen durchgeführt. Es ergab sich im Shapiro-Wilks Test eine parametrische Verteilung der Ataxin-3 Konzentrationen der Kontrollprobanden ( $p=0,0579$ ) und eine parametrische Verteilung der Werte der prä-ataktischen Probanden ( $p=0,0925$ ). Im Gegensatz dazu waren die Gesamt Ataxin-3 Werte der Probanden der ataktischen Gruppe nicht normalverteilt mit einem P-Wert  $p<0,0001$ . Da eine der zu vergleichenden Gruppen keine Normalverteilung aufweist wurde zum Vergleich der Werte ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Dieser wurde berechnet um zu erfahren, ob es zwischen den Werten der 3 Gruppen signifikante Differenzen gibt. Der Mittelwert der Kontrollen lag bei 48,50

ΔF, während der Mittelwert der prä-ataktischen Probanden bei 33,05 ΔF lag. Der Ataxin-3 Mittelwert der ataktischen Probanden lag bei 47,68 ΔF. Der Kruskal-Wallis Test des Vergleichs der Kontrollprobanden mit den prä-ataktischen Probanden ergab mit  $p=0,5416$  keine statistisch signifikante Differenz zwischen den beiden Gruppen. Der Kruskal-Wallis Test für den Vergleich der Kontrollprobanden mit den ataktischen Probanden ergab mit  $p>0,9999$  keine statistisch signifikante Differenz. Auch die Differenz zwischen den prä-ataktischen und ataktischen Probanden war statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallis Test;  $p=0,2628$ ). Abbildung 3.62 B zeigt die *ROC Curve* des Vergleichs der Kontrollen mit den ataktischen Probanden, dies dient der Untersuchung der Trennschärfe des Assays. Für die Untersuchung ergab sich eine AUC von 0,5057 mit einem  $p=0,9536$ . Die *ROC Curve* für die Untersuchung der Kontrollprobanden und prä-ataktischen Probanden ergab eine AUC=0,6909 mit einem  $p=0,1392$ . Dargestellt wird diese Berechnung in Abbildung 3.61 C. Abbildung 4.61 D zeigt die *ROC Curve* des Vergleichs der prä-ataktischen und ataktischen Probanden. Für die Untersuchung ergab sich eine AUC von 0,6578 mit einem  $p=0,0939$ . Abbildung 3.63 A zeigt die Konzentration an expandiertem Ataxin-3, die vom Singulex Assay gemessen wurde. Es wurde zunächst ein Shapiro-Wilks Test durchgeführt um die vorliegenden Daten auf Normalverteilung zu testen. Der Test der Daten für die Kontrollprobanden ergab eine parametrische Verteilung im Shapiro-Wilks Test mit  $p=0,1512$ . Der Shapiro-Wilks Test für die prä-ataktischen Patienten ergab keine Normalverteilung ( $p=0,0034$ ), ebenso der Test für die Normalverteilung der ataktischen Probanden mit einem P-Wert  $p<0,0001$ . Aufgrund dieser nicht parametrischen Verteilung der Ataxin-3 Konzentrationen, wurde für den Vergleich der Gruppen und für die Testung auf statistische Signifikanz ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Der Median des Hintergrundsignals, das in den Proben der Kontrollprobanden gemessen wurde betrug 5,5 pg/ml. Für die prä-ataktischen Probanden ergab sich ein Wert von 54,82 pg/ml als Median. Der Median der ataktischen Probanden lag bei 50,40 pg/ml. Der Kruskal-Wallis Test ergab für den Vergleich der Daten der Kontrollprobanden mit den prä-ataktischen Probanden ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p<0,0001$ ). Auch der Kruskal-Wallis Test für den

Vergleich der Kontrollprobanden mit den ataktischen Probanden war mit einem  $p < 0,0001$  statistisch hoch signifikant. Der Kruskal-Wallis Test für die Differenz zwischen ataktischen und prä-ataktischen Probanden ergab keinen statistisch signifikanten P-Wert ( $p = > 0,9999$ ). Abbildung 3.63 A zeigt die *ROC Curve* für die beiden Gruppen der Kontrollprobanden und ataktischen Probanden. Die *ROC Curve* der Kontrollen vs. ataktischen Probanden ergab eine  $AUC = 1,0$  mit einem  $p < 0,0001$ . Die *ROC Curve* der Kontrollen vs. prä-ataktischen Probanden wird in Abbildung 3.63 C gezeigt. Auch in dieser Berechnung ergibt sich eine  $AUC = 1,0$  mit einem  $p = 0,0001$ . Für die *ROC Curve* der prä-ataktischen und ataktischen Probanden wurde eine  $AUC = 0,5545$  mit einem  $p = 0,5626$  berechnet. Diese *ROC Curve* ist in Abbildung 3.63 D dargestellt.



**Abbildung 3.62 A Ataxin-3 Konzentration der Kontrollprobanden, prä-ataktischen und ataktischen Probanden mit dem n-term TR-FRET Assay:** Der Kruskal-Wallis Test ergab für die Differenzierbarkeit der Kontrollprobanden, der prä-ataktischen und der ataktischen Gruppe kein statistisch signifikantes Ergebnis. **B ROC Curve Kontrollen vs. ataktische Probanden:** Es wurde eine  $AUC = 0,5057$  mit einem P-Wert  $p = 0,9536$  berechnet. **C ROC Curve Kontrollen vs. prä-ataktisch:** **D ROC Curve prä-ataktische Probanden vs. ataktische Probanden:** Es wurde eine  $AUC = 0,6578$  mit einem  $p = 0,0939$  berechnet.



**Abbildung 3.63 A Ataxin-3 Konzentration der Kontrollprobanden, prä-ataktischen und ataktischen Probanden im Singulex Assay:** Der Kruskal-Wallis Test des vorliegenden Datensatzes ergab für den Vergleich der Werte an expandiertem Ataxin-3 der Kontrollen mit den prä-ataktischen Probanden eine statistisch signifikante Differenz ( $p < 0,0001$ ). Auch die Differenz der Ataxin-3 Werte der ataktischen Probanden zu dem Hintergrundsignal der Kontrollprobanden war statistisch signifikant mit  $p < 0,0001$ . **B ROC Curve Kontrollprobanden vs. ataktische Probanden:** Es wurde für die ROC Curve der Kontrollprobanden und der ataktischen Probanden eine AUC=1,0 und ein P-Wert  $p < 0,0001$  bestimmt. **C ROC Curve Kontrollprobanden vs. prä-ataktische Probanden:** Es wurde eine AUC=1,0 berechnet mit einem  $p < 0,0001$ . **D ROC Curve prä-ataktische vs. ataktische Probanden:** Es wurde eine AUC=0,5545 mit einem  $p = 0,5626$  berechnet.

### 3.9.3 Longitudinale Biomarker Analyse in den Singulex und n-term Daten

Der n-Term Assay misst das Gesamt Ataxin-3 in den PBMCs der Probanden, während der Singulex Assay die expandierte Ataxin-3 Konzentration im Plasma der Probanden misst. Es wurden zunächst die Probanden untersucht, die im Beobachtungszeitraum nicht die klinische Kategorie (prä-ataktisch, mild ataktisch, moderat ataktisch und schwer ataktisch) wechseln. Dafür wurden  $n=2$

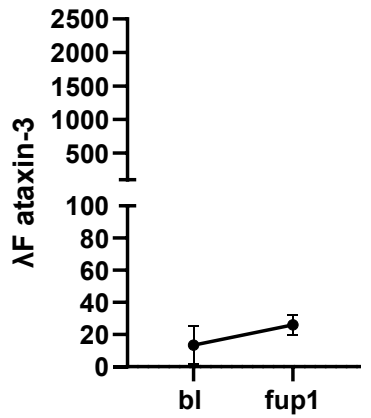
Kontrollprobanden sowohl mit dem n-term TR-FRET Assay als auch dem Singulex Assay untersucht. Für die Untersuchung der Kontrollprobanden mit dem n-term Assay ergab sich ein Anstieg der Konzentration an Gesamt Ataxin-3 von 13,48  $\Delta$ F (SEM=11,85) im Baseline Visit auf 26,02  $\Delta$ F (SEM=6,372) im Follow Up 1 Visit ( Abb. 3.64 A). Abbildung 3. 64 B zeigt die Ergebnisse der Kontrollen in der Singulex Assay Messung. In der Baseline wurde ein Wert von 3,091 pg/ml (SEM=1,332) an expandiertem Ataxin-3 bestimmt und in dem Follow Up 1 Visit ein Wert von 3,813 pg/ml (SEM=0,7631).

Es lagen n=3 prä-ataktische Probanden vor zum longitudinalen Vergleich. Für die Analyse der Werte des n-Term Assays ergibt sich ein Mittelwert von 15,58  $\Delta$ F (SEM=5,710) für die Baseline und ein Mittelwert von 25,42  $\Delta$ F (SEM=12,85) für den Follow Up 1 Visit (Abb. 3.64 C ). Abbildung 3.64 D zeigt den longitudinalen Verlauf für die expandierte Ataxin-3 Konzentration der prä-ataktischen Probanden. Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 nimmt von 1103 pg/ml auf 964,8 pg/ml ab.

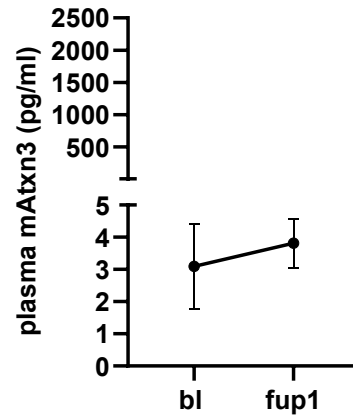
Es wurden n=12 mild ataktische Probanden im longitudinalen Vergleich untersucht. Für die Untersuchung des Gesamt Ataxin-3 in den mild ataktischen Probanden ergab sich im N-Term Assay für die Baseline Visite eine Konzentration von im Mittelwert 25,56  $\Delta$ F (SEM=9,775) mit einem Anstieg auf 32,30  $\Delta$ F (SEM=9,865) im Follow Up 1 (Abb. 3.64 E). Abbildung 3.64 F zeigt die longitudinale Entwicklung des expandierten Ataxin-3. Für die 12 mild ataktischen Probanden wurde jeweils für die beiden Visits ein Mittelwert berechnet. Dieser sinkt von der Baseline mit 768,4 pg/ml ( SEM=191,1) auf 390,5 pg/ml (SEM=94,81) ab.

Abbildung 3.65 A zeigt die longitudinale Entwicklung der n=2 moderat ataktischen Probanden. Beide Probanden wurden mit dem n-term Assay analysiert und die Mittelwerte abgebildet. Dieser Mittelwert steigt von 28,55  $\Delta$ F (SEM=22,77) auf 848,9  $\Delta$ F (SEM=848,8) im Verlauf stark an. Im Vergleich dazu war in den Analysen mit dem Singulex Assay nur ein dezentes Ansteigen der expandierten Ataxin-3 Konzentration zu sehen. Im Baseline wurde ein Mittelwert von 766,8 pg/ml (SEM=39,75) berechnet und im Follow Up 1 Visit 1090 pg/ml (SEM=381,8). Der Verlauf der Singulex Daten wurde in Abbildung 3.65 B dargestellt.

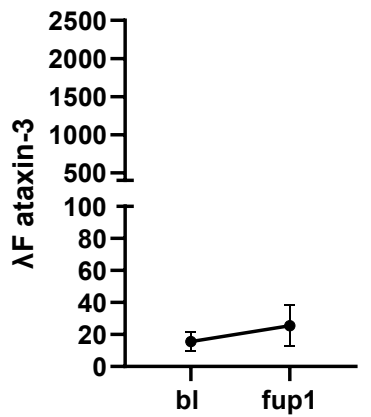
Es lag nur n=1 schwer ataktischer Proband vor um ihn im Vergleich mit n-Term und Singulex Assay zu untersuchen. Das Gesamt Ataxin-3 steigt in der Messung mit dem n-term Assay, dargestellt in Abb. 3.65 C, an: ausgehend von einem Baseline Wert 0,399  $\Delta$ F auf 2,538  $\Delta$ F. Das expandierte Ataxin-3 sank von einem Wert von 861,91 pg/ml ab. In der Follow Up 1 Plasma Probe wurde 231,85 pg/ml an expandiertem Ataxin-3 gemessen. Abbildung 3.65 D zeigt den longitudinalen Verlauf des expandiertem Ataxin-3 im Beobachtungszeitraum.

**A****Kontroll n-term**

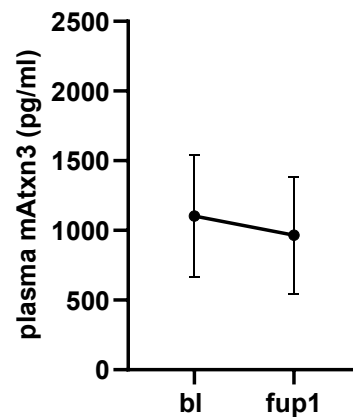
● Kontrolle n=2

**B****Kontrolle Singulex**

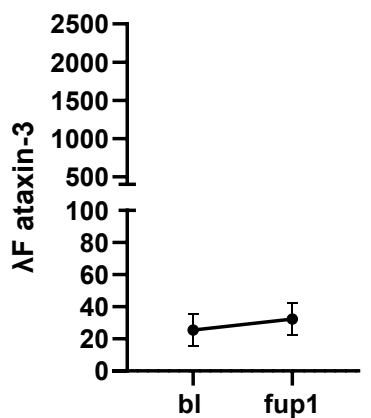
● Kontrolle n=2

**C****prä-ataktisch n-term**

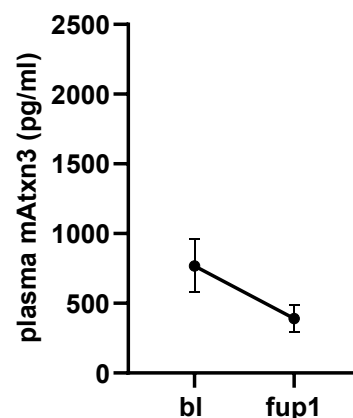
● prä-ataktisch n=3

**D****prä-ataktisch Singulex**

● prä-ataktisch n=3

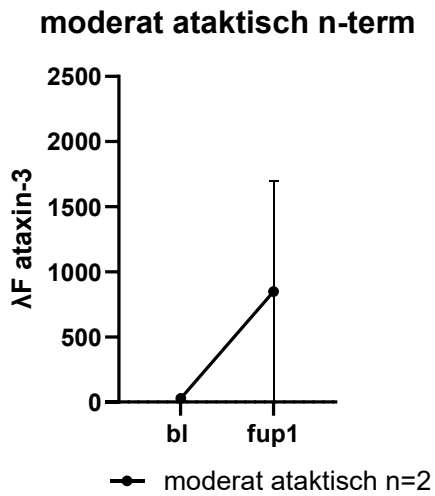
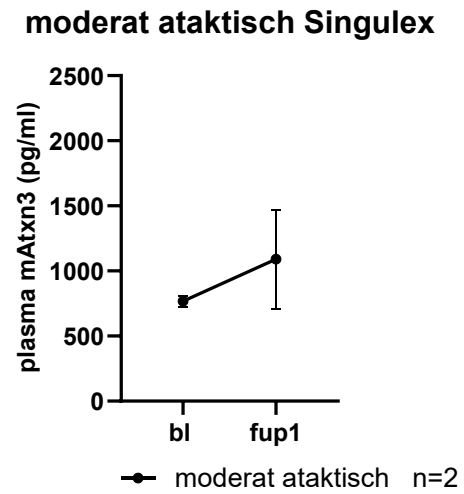
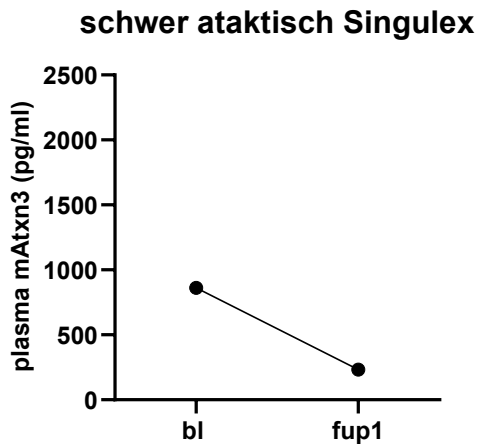
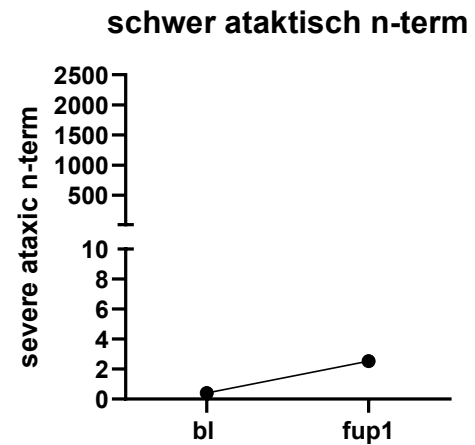
**E****mild ataktisch n-term**

● mild ataktisch n=12

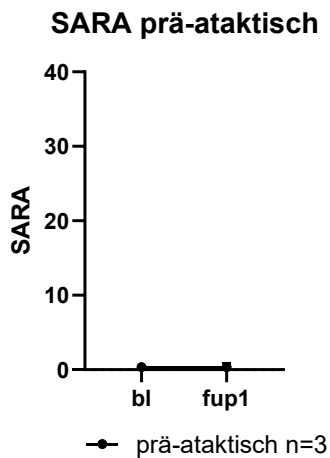
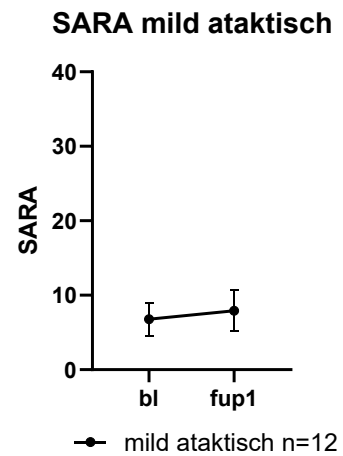
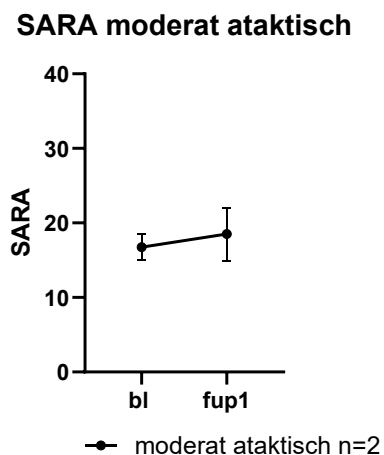
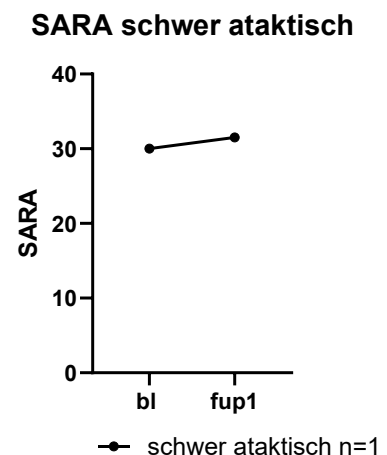
**F****mild ataktisch Singulex**

● mild ataktisch n=12

**Abbildung 3.64** **A Kontrollprobanden n-term** : Der Mittelwert des Gesamt Ataxin-3 für die n=2 Kontrollprobanden steigt im Beobachtungszeitraum von 13,48  $\Lambda$ F auf 26,02  $\Lambda$ F an. **B Kontrollprobanden Singulex**: In der Baseline wurde ein Mittelwert von 3,091 pg/ml berechnet und in der Follow Up 1 Untersuchung ein Mittelwert von 3,813 pg/ml. **C prä-ataktische Probanden n-term** : Der Mittelwert der ataktischen Probanden steigt an von 15,58  $\Lambda$ F auf 5,42  $\Lambda$ F im Follow Up 1. **D prä-ataktische Probanden Singulex**: Der Mittelwert des expandierten Ataxin-3 sinkt im Verlauf ab, von einem Wert von 1103 pg/ml auf 964,8 pg/ml. **E mild ataktische Probanden n-term**: Im longitudinalen Verlauf steigt die Konzentration an Gesamt Ataxin-3 von 25,56  $\Lambda$ F auf 32,30  $\Lambda$ F an. **F mild ataktische Probanden Singulex**: Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 sinkt im longitudinalen Verlauf von 768,4 pg/ml auf 390,5 pg/ml ab.

**A****B****C****D**

**Abbildung 3.65** **A moderat ataktische Probanden n-term:** Der Mittelwert an Gesamt-Ataxin-3 steigt bei den moderat ataktischen Probanden im Beobachtungszeitraum ausgehend von einem Baseline Wert von 28,55 ΔF stark an auf einen Follow Up 1 Mittelwert von 848,9 ΔF. **B moderat ataktische Probanden Singulex:** Es wurde in der Baseline ein Wert von 766,8 pg/ml an expandiertem Ataxin-3 als Mittenwert der beiden Probanden berechnet, im Follow Up1 wurde ein Wert von 1090 pg/ml gemessen. **C schwer ataktische Probanden n-term:** Das Gesamt Ataxin-3 steigt im schwer ataktischen Probanden von 0,399 ΔF in der Baseline Probe auf 2,538 ΔF im Follow Up 1 an. **D schwer ataktische Probanden Singulex:** Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 sinkt im zeitlichen Verlauf ab. Im Baseline lag der Wert bei 861,91 pg/ml und im Follow Up 1 bei 231,85 pg/ml.

**A****B****C****D**

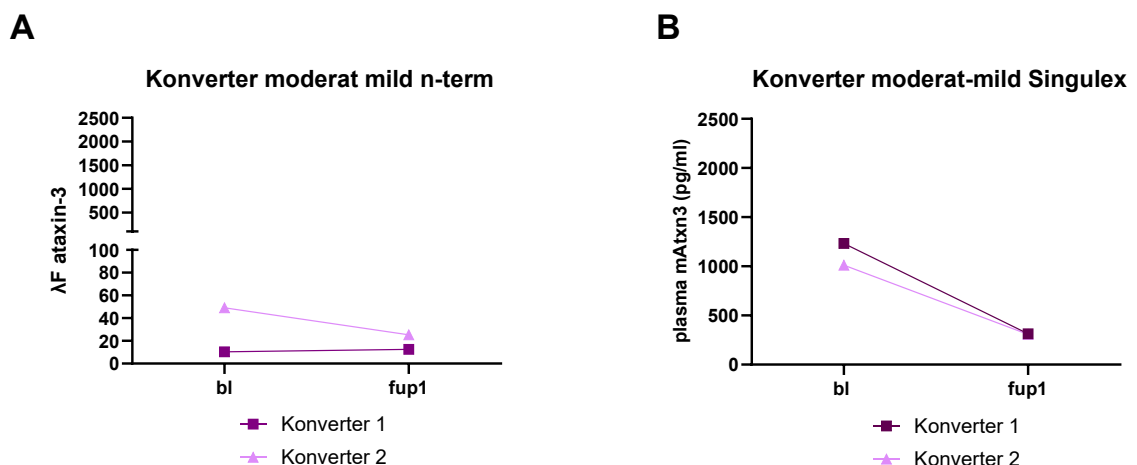
**Abbildung 3.66 A SARA Score prä-ataktische Probanden:** Der Mittelwert des SARA Scores der prä-ataktischen Probanden liegt bei 0,33 Punkten im Baseline Visit und im Follow Up 1 Visit. **B SARA Score mild ataktische Probanden:** Der SARA Score der mild ataktischen Probanden steigt im Mittelwert von 6,792 Punkten auf 7,917 Punkten an. **C SARA Score moderat ataktische Probanden:** Der SARA Score der moderat ataktischen Probanden steigt im Mittelwert von 16,75 Punkten auf 18,5 Punkte an. **D SARA Score schwer ataktische Probanden:** Der SARA Score des schwer ataktischen Probanden steigt von 30 Punkte auf 31,5 Punkte an.

Die Abbildung 3.66 A-D zeigt den longitudinalen Verlauf der SARA Scores der einzelnen Gruppen. Abbildung 3.66 A zeigt den longitudinalen Verlauf des SARA Scores der prä-ataktischen Probanden. Der Mittelwert der SARA Scores der prä-ataktischen Probanden liegt konstant bei 0,33 Punkten mit einem Standardfehler von 0,33 Punkten. Abbildung 3.66 B zeigt den SARA Verlauf der mild ataktischen Probanden. Hier steigt der SARA Score von 6,792 Punkte im Mittelwert auf 7,917

Punkte an. Als Standardfehler für die erste Messung ergibt sich hierbei 0,6350 und in der zweiten Messung 0,7949. Abbildung 3.66 C zeigt den Mittelwert für den SARA Score der moderat ataktischen Probanden in einem Baseline Visit bei einem Wert von 16,75 Punkten (SEM=1,250). Der Mittelwert beim zweiten Besuch lag bei 18,50 Punkten (SEM=2,5). Der SARA Score des n=1 schwer ataktischen Probanden stieg im Beobachtungszeitraum leicht an von 30 Punkten auf 31,5 Punkte.

Im folgenden Abschnitt sollen den Konverter beschrieben werde, also die Probanden, welche im Beobachtungszeitraum ihre klinisch zugeordnete Kategorie wechseln.

2 der Konverter ändern sich klinisch in ihrem SARA Score so, dass ihr ursprünglicher Status von moderat ataktisch auf mild ataktisch wechselt. Konverter 1 zeigt in Abbildung 3.67 A ein Ansteigen des Gesamt Ataxin-3 von 10,38  $\Delta$ F auf 12,59  $\Delta$ F. Der Wert des expandierten Ataxin-3 sinkt in diesem Zeitraum ab. In der Baseline Probe wurde ein Wert von 1232,95 pg/ml gemessen mit einer Konzentration von 313,94 als Follow Up 1 Wert (Abb. 3.67 B). Auch Konverter 2 wurde mit beiden Methoden untersucht. Das Gesamt Ataxin-3 sinkt in diesem Beobachtungszeitraum von 49,17  $\Delta$ F auf 25,28  $\Delta$ F ab (Abb. 3.67 A). Das expandierte Ataxin-3 sinkt in dem Beobachtungszeitraum ebenfalls ab. In der Baseline Probe wurde mit dem Singulex Assay eine Konzentration von 1010,89 pg/ml an expandiertem Ataxin-3 gemessen. In der Follow Up 1 Probe wurde eine Konzentration von 306,97 pg/ml gemessen ( Abb. 3.67 B).



**Abbildung 3.67 A Gesamt Ataxin-3 der Konverter moderat-mild ataktisch:** Das Gesamt Ataxin-3 des Konverter 1 steigt im Beobachtungszeitraum von 10,38  $\Delta F$  auf 12,59  $\Delta F$  an. Das Gesamt Ataxin-3 des Konverter 2 sinkt im Beobachtungszeitraum von 49,17  $\Delta F$  auf 25,28  $\Delta F$  ab.  
**B Expandiertes Ataxin-3 der Konverter moderat-mild ataktische:** Das expandierte Ataxin-3 von Konverter 1 sinkt im Beobachtungszeitraum von 1232,95 pg/ml auf 313,94 pg/ml ab. Das expandierte Ataxin-3 von Konverter 2 sinkt im Beobachtungszeitraum von 1010,89 pg/ml auf 306,97 pg/ml.

Abbildung 3.68 A zeigt einen Probanden, der im Verlauf von prä-ataktisch zu mild ataktisch konvertiert. Das Gesamt Ataxin-3 bleibt im Verlauf relativ konstant, mit einem Ursprungswert von 5,698  $\Delta F$  in der Baseline und einem Follow Up 1 Wert von 4,99  $\Delta F$ . Das expandierte Ataxin-3 des Probanden zeigt einen dezenten Anstieg von 263,87 pg/ml auf 266,10 pg/ml. Die Ergebnisse der longitudinalen Messung mit dem Singulex Assay werden in Abbildung 3.68 B dargestellt. In Abbildung 3.68 C und D wurde ein Konverter untersucht, welche sich im Beobachtungszeitraum über 3 Follow Ups klinisch in seiner ataktischen Symptomatik so veränderte, dass es 2 mal um kategorisiert werden musste. Im Baseline Visit wurde der Proband als prä-ataktisch beurteilt. Im Follow Up 1 Visit wurde der Proband als mild ataktisch beurteilt und im Follow Up 2 Visit wieder als prä-ataktisch. Im Baseline Visit wurde ein Gesamt Ataxin-3 mit dem n-term TR-FRET Assay gemessen mit einer Konzentration von 0,257  $\Delta F$ . Im Follow Up 1 Visit stieg das gesamt Ataxin auf 5,66  $\Delta F$  an, während es im Follow Up 2 Visit wieder bei 2,577  $\Delta F$  lag (Abb. 3.68 C). Die longitudinale Messung mit dem Singulex Assay werden in Abbildung 3.68 D dargestellt. Zunächst zeigt sich eine Senkung der Spiegel an expandiertem Ataxin-3 von 468,05 pg/ml auf 231,14 pg/ml. Im Follow Up 1 steigt der Spiegel dann wieder auf 314,11 pg/ml an.

Ein weiterer Konverter verschlechterte sich in seiner ataktischen Symptomatik im Beobachtungszeitraum, sodass er im Baseline Visit als moderat ataktisch beurteilt wurde und im Follow Up 1 Visit als schwer ataktisch. Abbildung 3.68 E zeigt den longitudinalen Verlauf des Gesamt Ataxin-3. Mit dem n-Term Assay wurde ein Absinken des Gesamt Ataxin-3 gemessen von einem Wert von 124,02  $\Delta F$  in der Baseline Probe auf 12,57  $\Delta F$  im Follow Up 1 Visit. Mit dem Singulex Assay wurde für den Baseline Visit zunächst ein Wert von 476,02  $\Delta F$  an expandiertem Ataxin-3 gemessen mit einem Anstieg auf 1360,46  $\Delta F$  (Abb. 3.68 F).

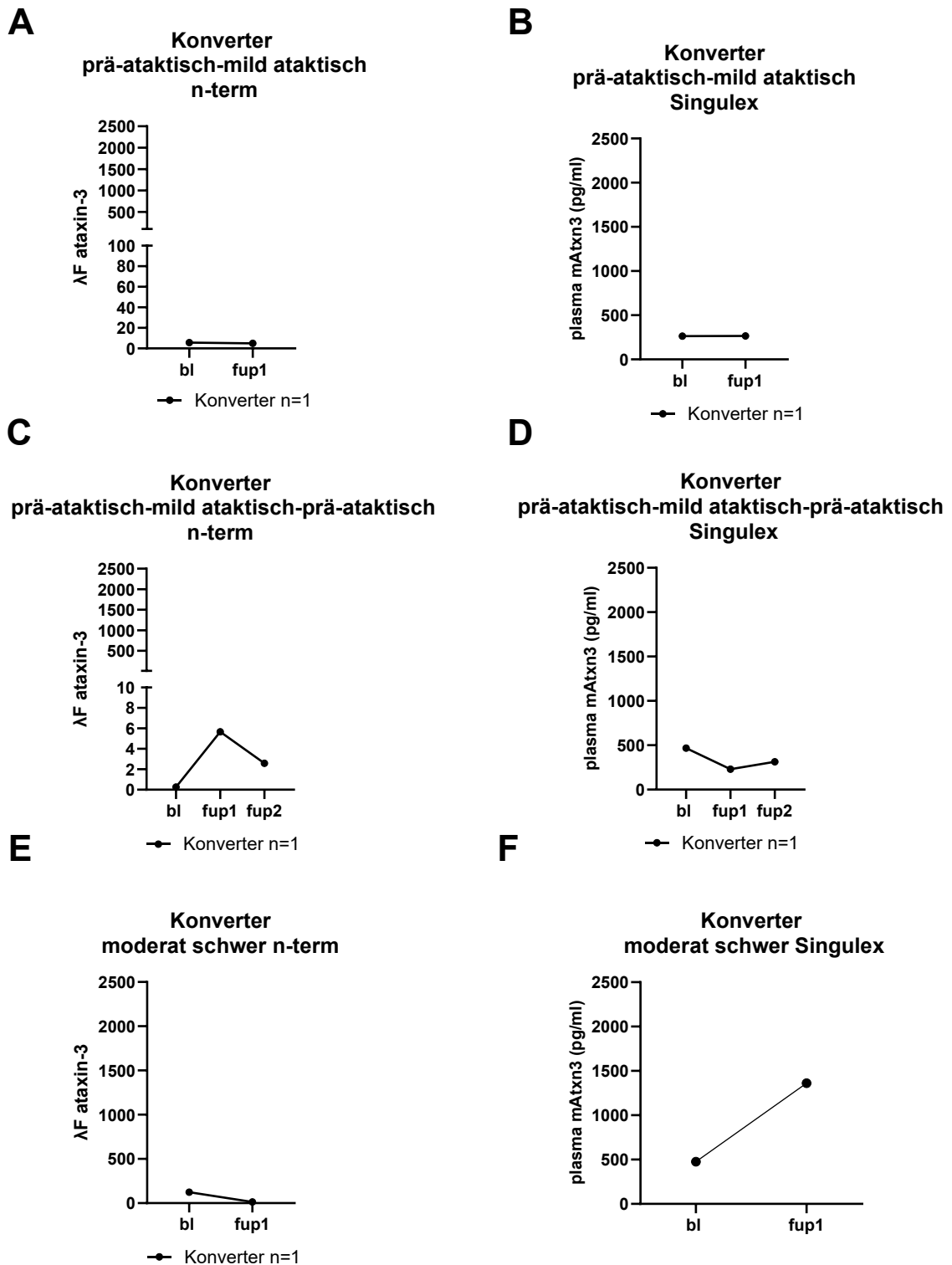


Abbildung 3.68 A Gesamt Ataxin-3 Konzentration des Konverter prä-ataktisch-mild ataktisch: Die Gesamt Ataxin-3 Konzentration des Konverter von prä-ataktisch zu mild ataktisch

sinkt im Beobachtungszeitraum leicht ab. Von einem Wert von 5,69  $\Delta F$  auf 4,99  $\Delta F$ . **B Expandierte Ataxin-3 Konzentration Konverter prä-ataktisch-mild ataktisch:** Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 steigt im Beobachtungszeitraum leicht an, von 263,87 pg/ml auf 266,10 pg/ml. **C Gesamt Ataxin-3 Konzentration des Konverters prä-ataktisch-mild ataktisch-prä-ataktisch:** Die Konzentration an Gesamt Ataxin 3 steigt zunächst an von 0,26  $\Delta F$  auf 5,66  $\Delta F$  und sinkt dann im Follow Up 2 Visit ab auf einen Wert von 2,58  $\Delta F$ . **D Expandierte Ataxin-3 Konzentration des Konverters prä-ataktisch-mild ataktisch-prä-ataktisch:** Im Baseline Visit wurde eine Konzentration von 468,05 pg/ml an expandiertem Ataxin-3 gemessen. Im Follow Up 1 Visite wurde ein Wert von 231,14 pg/ml bestimmt, der im Follow Up 2 Visit auf 314,12 pg/ml anstieg. **E Gesamt Ataxin-3 Konzentration des Konverter moderat ataktisch-schwer ataktisch:** Die Gesamt Ataxin-3 Konzentration des Konverters sinkt von 124,01  $\Delta F$  auf 12,57  $\Delta F$  ab. **F Expandierte Ataxin-3 Konzentration des Konverter moderat ataktisch-schwer ataktisch:** Die Konzentration an expandiertem Ataxin-3 steigt im Beobachtungszeitraum von 476,02 pg/ml auf 1360,46 pg/ml an.

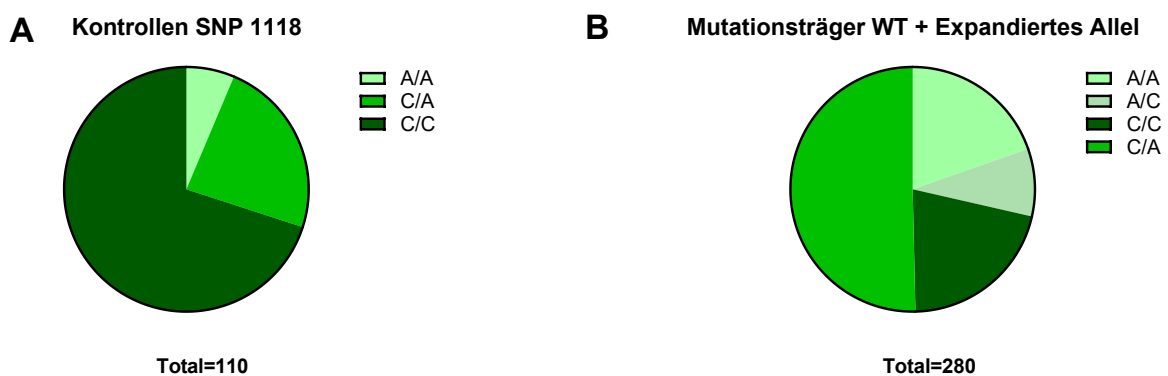
### 3.10 Analyse des ATXN3 SNPs an BP 1118

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) meint die Variation eines einzelnen Basenpaares in einem definierten Gen. Im Rahmen dieser Promotion wurden die SNP an bp 1118, 987 und 669 des ATXN3-Gens für die ESMI-Kohorte nochmal analysiert, da diese in der SCA3 Population besonders häufig sind. SNP 1118 beeinflusst die Stabilität des CAG-Repeats. SNP 1118 liegt auf dem Exon 10 des ATXN3-Gens in 3'Richtung zur CAG-Sequenz. Im Rahmen dieser Promotion wurde der SNP 1118 Status von 19 Probanden analysiert. Einer der von mir analysierten Probanden wurde nicht in die Auswertung miteinbezogen, weil dieser kein Mutationsträger der SCA3 war. Für den überwiegenden Teil der ESMI-Kohorte lag jedoch bereits eine Genotypisierung für diesen SNP vor, welche im Rahmen anderer Doktorarbeiten der AG Biomarker (Daniel Sturm, Melanie Gansel, Gabriele Anna Kaucher erfolgten (Gansel, 2020; Kaucher, 2020; Sturm, 2021)). Für die hier gezeigte Analyse lagen insgesamt 391 Probanden vor. Diese Kohorte setzte sich zusammen aus 110 Kontrollen, 280 heterozygoten Mutationsträger und 1 homozygoten Mutationsträgern.

Das SNP 1118 kann in den Varianten A (TAA) oder C (TAC) vorliegen, woraus sich die Kombinationsmöglichkeiten A/A, A/C und C/C ergeben. Die Variante A führt zu einem Stopcodon, und damit zu einer verkürzten Isoform des ATXN3 Gen. Variante C führt zum Einbau von Tyrosin ins ATXN3 Gen. Es wurde die Verteilung dieser 3 Varianten unter den ESMI Probanden untersucht. Wie Abbildung 3.69 A zeigt, ist unter den Kontrollprobanden die Kombinationsmöglichkeit C/C die häufigste mit einem relativen Anteil von 70 %.

In absoluten Zahlen ausgedrückt befanden sich 77 Probanden mit einem C/C Genotyp unter den 110 Kontrollprobanden. Der Anteil der Kontrollprobanden mit einem Genotyp C/A entsprach 23,6 % (absolut: 26 Probanden). Nur 6,4 % der Probanden wiesen den Genotyp A/A auf, was in absoluten Zahlen 7 Probanden entsprach.

Abbildung 3.69 B zeigt die Ergebnisse der Genotypisierung der Mutationsträger. Mit der angewendeten Technik der Fragmentlängenanalyse kann in den Mutationsträgern unterschieden werden, welches Allel – das Wildtyp oder das expandierte Allel- eine Variante trägt. Sodass sich für die Mutationsträger 4 Varianten ergaben-A/A; A/C; C/C; C/A-wobei der erste Buchstabe dem Wildtyp und der zweite Buchstabe dem expandierten Allel entspricht. Den größten Anteil haben die Probanden, deren Wildtyp Allel die Variante C und deren expandiertes Allel die Variante A trägt mit 50,4 %. In absoluten Zahlen ausgedrückt hatten 144 Probanden den Genotyp C/A für das SNP 1118. Der zweithäufigste Genotyp ist C/C mit einem Anteil von 21,1 % und 59 Probanden. Mit einem Anteil von 19,6% und 55 Probanden ist der Genotyp A/A der dritthäufigste Genotyp der Mutationsträger. Der homozygote Mutationsträger hatte einen A/A Genotyp. Nur bei 25 Probanden trug das Wildtyp Allel die Variante A und das expandierte Allel die Variante C, was einem Anteil von 8,9 % entsprach.



**Abbildung 3.69 A Verteilung der Genotypen der Kontrollprobanden für SNP 1118:** Mit 70% war der Genotyp C/C der häufigste Genotyp der Kontrollprobanden. **B Verteilung der Genotypen der Mutationsträger für SNP 1118:** Mit 50,4% war der Genotyp C/A der häufigste Genotyp unter den Mutationsträgern.

Abbildung 3.70 untersucht die Verteilung der Varianten A und C auf die zwei Allele der Mutationsträger genauer. Das Wildtyp Allel trägt zu 71,1 % die Variante C und zu 28,9 % die Variante A. (Abb. 4.69 A). Abbildung 3.70 B zeigt die Verteilung der Varianten A und C für das expandierte Allel der Mutationsträger. Mit insgesamt 196 Probanden, trägt die Mehrheit der Probanden auf dem mutierten Allel die Variante A, was einem Anteil von 70 % entspricht. 30% der Probanden tragen auf dem expandierten Allel die Variante A (absolut 84 Probanden).



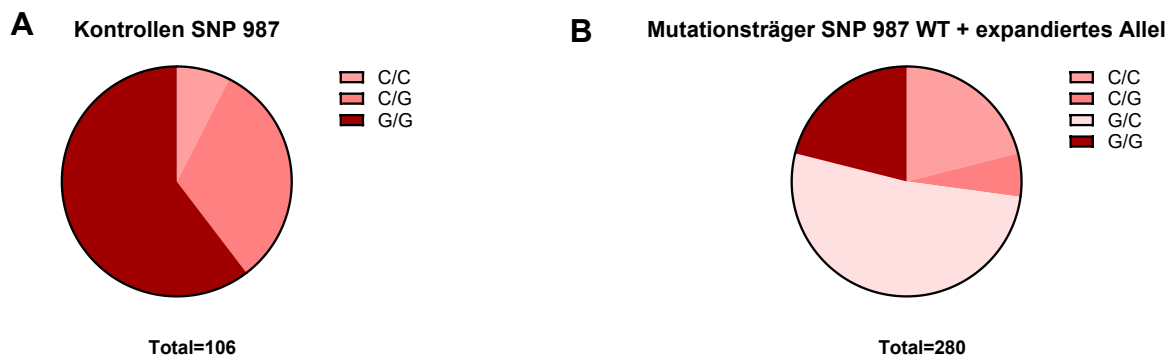
**Abbildung 3.70 A Wildtypallel der Mutationsträger:** 71,1 % der Mutationsträger tragen auf ihrem Wildtyp Allel die Variante C. **B Expandiertes Allel der Mutationsträger:** 70 % der Mutationsträger tragen auf ihrem expandierten Allel die Variante A.

### 3.11 Analyse des ATXN3 SNP an BP 987

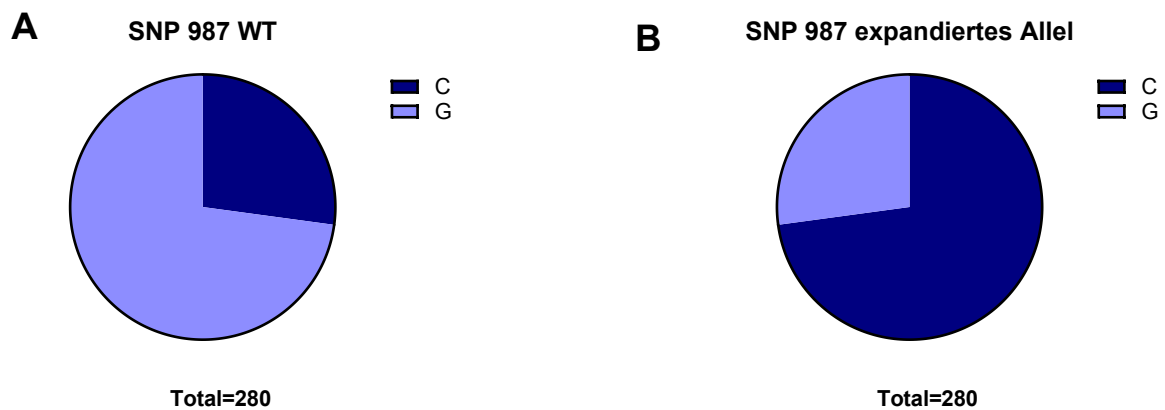
Das SNP 987 befindet sich auf Exon 10 des *ATXN3* Gen. Dort liegt es am 3' Ende des *CAG-Repeats*. Es liegen 387 Probanden vor, die für den SNP 987 genotypisiert wurden. Davon waren 106 Kontrollen, 280 heterozygote Mutationsträger und 1 Proband homozygoter Mutationsträger. Das SNP 987 kann in den Varianten G und C vorliegen, was die Kombinationsmöglichkeiten C/C, C/G und G/G für die zwei Allele ergibt. Variante G führt zum Einbau von Glycin und Variante C führt zu dem Einbau von Arginin. Von den 106 Kontrollprobanden wurden bei 64 der Genotyp G/G molekulargenetisch getestet, was einem prozentualen Anteil von 60,4 % entspricht. Der Genotyp C/G wurde bei 32,1 % der Kontrollprobanden erfasst, was einer absoluten Probandenzahl von 34 Probanden entspricht. Nur 8 der Kontrollprobanden (7,5 %) wiesen den Genotyp C/C auf (Abb. 3.71 A). Für die Analyse der Mutationsträger ergibt sich

ein anderes Bild. Hier gibt es 4 mögliche Genotypen, da durch die Fragmentlängenanalyse die Varianten C und G dem einzelnen Allel zugeordnet werden kann. Es kann also unterschieden werden, welches Allel welche Variante trägt. 51,8 % der Mutationsträger hatten den Genotyp G/C, bei dem das Wildtypallel die Variante G und das expandierte Allel die Variante C trug. Der andere Fall, bei dem das Wildtypallel die Variante C und das expandierte Allel die Variante G trug, traf nur in 6,1 % der Probanden zu. Die Genotypen C/C und G/G kamen in jeweils 21,1 % (absolut bei 59 Probanden) der Fälle vor (Abb. 3.71 B). Der homozygote Proband hatte einen C/G Genotyp, wobei zu bedenken ist, dass hier beide Allele expandiert sind.

Abbildung 3.72 A zeigt den Anteil der Varianten G und C am Wildtyp Allel der Mutationsträger Population. Mit 72,9 % war die Variante G auf dem Wildtyp Allel häufiger als die Variante C mit 27,1 %. In absoluten Zahlen lag bei 204 Probanden auf dem Wildtyp Allel die Variante G vor und bei 76 Probanden die Variante C. Für das expandierte Allel ergab sich ein Anteil von 72,9 % für die Variante C und ein prozentualer Anteil von 27,1 % für die Variante G. In absoluten Zahlen sind das 204 Probanden mit einer Variante C auf dem expandierten Allel und 76 Probanden mit einer Variante G auf dem expandierten Allel (Abb. 3.72 B).



**Abbildung 3.71 A Verteilung der Genotypen der Kontrollprobanden für SNP 987:** 60,4 % der Kontrollprobanden tragen einen G/G Genotyp, damit ist G/G in dieser Gruppe der häufigste Genotyp. **B Verteilung der Genotypen der Kontrollprobanden für SNP 987:** 51,8 % tragen den G/C Genotyp, damit ist der G/C Genotyp der häufigste unter den Mutationsträgern.

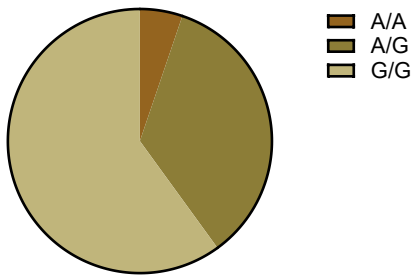


**Abbildung 3.72 A Wildtypallel der Mutationsträger:** 72,9 % der Mutationsträger tragen die Variante G auf dem Wildtyp Allel. Die Variante C kommt bei 27,1 % der Mutationsträger auf dem Wildtypallel vor. **B Expandiertes Allel der Mutationsträger:** Für das expandierte Allel ergab sich ein Anteil von 72,9 % für die Variante C und ein prozentualer Anteil von 27,1 % für die Variante G.

### 3.12 Analyse des ATXN3 SNP an BP 669

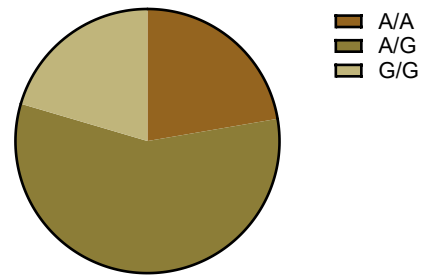
Der SNP 669 liegt in Exon 8 des ATXN3-Gens in 5'Richtung des CAG-Repeats. Der SNP 669 kann in der Variante G und in der Variante A vorliegen. Variante G führt zum Einbau von Valin in das Ataxin-3 Protein und Variante A zu Methionin. Es lagen 115 Kontrollprobanden, 269 heterozygote Mutationsträger und 1 homozygoter Mutationsträger zur Auswertung vor. Dadurch, dass ein *High Resolution Melting* durchgeführt wurde, konnte nicht differenziert werden, welche Variante auf welchem Allel lag, sondern nur die Kombinationen aus A/A A/G und G/G differenziert werden. In der Gruppe der Kontrollprobanden war der häufigste Genotyp G/G mit einem Anteil von 60 %. In absoluten Zahlen hatten damit 69 Probanden diesen Genotyp. 34,8 % der Probanden hatten einen A/G Genotyp, was in absoluten Zahlen 40 Probanden entsprach. 5,2 % also 6 Kontrollprobanden hatten einen A/A Genotyp (Abb. 3.73 A). Für die Mutationsträger wurde ebenfalls eine Analyse durchgeführt, welche in Abbildung 3.73 B zu sehen ist. Der häufigste Genotyp unter den Mutationsträgern war A/G mit einem Anteil von 57,2 % (154 Probanden). Der Genotyp A/A hatte einen Anteil von 22,3 %, da 60 Mutationsträger einen Genotyp A/A aufwiesen. Der homozygote Mutationsträger hatte einen A/A Genotyp. 55 Probanden der Mutationsträger hatten einen G/G Genotyp mit einem Anteil von 20,4%.

**A** SNP 669 Kontrollen



Total=115

**B** SNP 669 Mutationsträger



Total=269

**Abbildung 3.73** **A** Verteilung der Genotypen für die Kontrollprobanden des SNP 669: Mit einem Anteil von 60% an den Kontrollprobanden ist die häufigste Variante der Genotyp G/G. **B** Verteilung der Genotypen für die Mutationsträger des SNP 669: Mit einem Anteil von 57,2% an den Mutationsträger ist die häufigste Variante der Genotyp A/G.

## 4 Diskussion

Die Spinozerebelläre Ataxie 3 (SCA3), auch unter dem Namen Machado-Josephs Krankheit (MJD) bekannt, ist die weltweit häufigste autosomal-dominant vererbte Spinozerebelläre Ataxie (SCA). Die ursprünglichen Beschreibungen der Erkrankung beziehen sich zunächst auf zwei von den portugiesischen Azoren stammenden Familien, die Erkrankung selbst kann jedoch weltweit beobachtet werden (Costa Mdo & Paulson, 2012). In einer der ersten Beschreibungen der Erkrankung wurde bereits die gemeinsame Abstammung der Patienten von Wilhelm Machado betont (Nakano et al., 1972). Bei der zweiten namensgebenden Familie der Erkrankung handelt es sich um die Joseph Familie aus Flores (Rosenberg et al., 1976). Das Hauptsymptom besteht in einer fortschreitenden Ataxie, häufig begleitet von weiteren Symptomen wie Dysarthrie, Rigidität, Dystonie, extrapyramidalen Symptomen und Störungen der Augenmuskeln, auch ein Parkinsonismus kann auftreten (Rub et al., 2013). Bei vielen Patienten finden sich noch weitere Symptome wie Depressionen, Schlafstörungen und psychiatrische Auffälligkeiten, die die Lebensqualität belasten (Matos et al., 2019; Riess et al., 2008). Die Neurodegeneration lässt sich auch in der Bildgebung durch MRT-Diagnostik oder *post-mortem* pathologisch erfassen und betrifft vor allem die Gebiete des Cerebellums, der Pons, der Basalganglien, der Medulla oblongata und des Mesenzephalons (Seidel et al., 2012). Als Grundlage der Störung wurde in den 1990er Jahren ein verlängertes CAG-Repeat im *ATXN3* Gen ausgemacht (Kawaguchi et al., 1994; Takiyama et al., 1997). Das expandierte CAG-Repeat im Genom der Mutationsträger führt zu einem verlängerten und fehlgefalteten Ataxin-3 Protein (Kawaguchi et al., 1994). *ATXN3* ist ein Deubiquitinierungsenzym (Costa Mdo & Paulson, 2012) und reguliert die Stabilität und Aktivität vieler Proteine in unterschiedlichen zellulären Prozessen, die mit proteotoxischem Stress, Alterung und Zell-Differenzierung in Verbindung stehen. Die Expansion des PolyQ-Abschnitts bewirkt eine veränderte Konformation von *ATXN3*, die die Interaktion mit natürlichen Partnern beeinflusst und zur Bildung unlöslicher Aggregate führt (Costa Mdo & Paulson, 2012). Es wurden bereits mehrere SNP (*Single*

*Nucleotide Polymorphism*) im *ATXN3* Gen identifiziert, die in Verdacht stehen, die Stabilität des CAG Repeats und den Krankheitsverlauf mit zu beeinflussen (Maciel et al., 1999). Für die letal verlaufende SCA3 gibt es keine kausale Therapie, die Patienten werden lediglich symptomorientiert behandelt (Wu et al., 2022). Für die zukünftige Entwicklung gezielter Therapien bei SCA3 ist es wichtig, genau über die Stadien-abhängigen Veränderungen von Flüssigkeits- und MRT-Biomarkern informiert zu sein (Faber et al., 2023). Wie auch bei Chorea Huntington kommen für die SCA3 klinische Biomarker, *Neuroimaging* Biomarker und biochemische Biomarker in Betracht (Andre et al., 2014). Als biochemische Biomarker wurden verschiedene Proteine als Kandidaten untersucht: Plasmakonzentrationen von totalem Tau (Garcia-Moreno et al., 2022), glialem fibrillärem saurem Protein (Garcia-Moreno et al., 2022) Ubiquitin-C-terminaler Hydrolase L1 (UCL1) (Garcia-Moreno et al., 2022), und Neurofilament light Chain (NfL) (Byrne et al.; Garcia-Moreno et al., 2022; Wilke et al., 2020), wobei sich besonders Tau und NfL für frühe Krankheitsstadien bzw. der Differenzierung zwischen Kontrollen und Mutationsträgern eignet (Garcia-Moreno et al., 2022; Wilke et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit wird besonders auf die Rolle des Ataxin-3 als Target-Engagement Biomarker für die SCA3, sowie verschiedene sensitive Messmethoden für dieses Protein eingegangen. Anschließend erfolgt die Betrachtung der verschiedenen Haplotypen in der vorliegenden Population.

#### **4.1 Ataxin-3 als Biomarker**

Die Entwicklung von Biomarkern, welche auch als Endpunkt für Therapiestudien verwendet werden können, ist sehr wichtig, um die Forschung an der SCA3 voranzutreiben (Saute & Jardim, 2018). Die Ansprüche an einen Biomarker in einer neurodegenerativen Erkrankung sind vielfältig, besonders wichtig ist neben seiner möglichst interventionsarmen Gewinnung und der Unabhängigkeit von Komorbiditäten vor allem die Möglichkeit einer Differenzierung zwischen normaler Bevölkerung und Erkrankten, aber auch die lineare Korrelation mit der Krankheitsprogression (Henley et al., 2005). In dieser Studie wurden insgesamt

7 Kriterien für einen Biomarker in einer neurodegenerativen Krankheit aufgestellt (Henley et al., 2005):

- Leicht in zugänglichem Gewebe oder Bioflüssigkeit zu quantifizieren.
- Unterliegt bei Verwendung als diagnostischer Biomarker keinen großen Schwankungen in der Allgemeinbevölkerung.
- Unbeeinflusst von nicht verwandten Erkrankungen und komorbiden Faktoren.
- Die Messung ist zuverlässig und schnell.
- Die Messungen sind zu einem anderen Zeitpunkt oder in einem anderen Zentrum reproduzierbar.
- Der Biomarker verändert sich linear (Costa Mdo & Paulson) mit dem Fortschreiten der Krankheit.
- Der Biomarker verändert sich als Reaktion auf eine krankheitsmodifizierende therapeutische Intervention, die eng mit etablierten klinisch-pathologischen Parametern der Krankheit korreliert.

Für die SCA3 war bisher der klinische SARA Score der bedeutendste Marker einer Krankheitsprogression (Saute & Jardim, 2018). Daher wäre eine zuverlässige Korrelation zwischen SARA Score und Biomarker ein wichtiges Qualitätsmerkmal für einen zuverlässigen Biomarker. Es können Trait Biomarker und State Biomarker unterschieden werden (Weir et al., 2011). Trait Biomarker geben dabei darüber Aufschluss, ob eine Erkrankung vorhanden ist und die State Biomarker korrelieren mit der Schwere und dem Stadium einer Erkrankung.

Durch die unterschiedlich expandierten CAG-Repeats werden verschiedene Varianten an Ataxin-3 produziert. Ein physiologisch langes Repeat führt zur Produktion eines physiologischen *full-length* Ataxin-3 Protein, während ein Träger einer SCA3 Mutation, aufgrund des PolyQ expandierten CAG-Repeats ein PolyQ expandiertes Ataxin-3 Protein produziert. In der Untersuchung des *full-length* Ataxin-3 in dieser Arbeit, aber auch in der auf der gleichen TR-FRET-Technik basierenden Analyse ergab sich folgendes Bild (Gonsior et al., 2021): In früheren Studien zeigte sich das *full-length* Ataxin-3 als Trait Biomarker eher

ungeeignet (Gonsior et al., 2021). Das *full-length* Ataxin-3 zeigte keine statistisch signifikante Korrelation zu klinischen Parametern wie dem SARA Score und INAS Score in dieser Arbeit. Dies wurde ebenfalls bereits in einer früheren Studie gezeigt (Gonsior et al., 2021), was die *full-length* Ataxin-3 Konzentration als Kandidaten für einen State Biomarker eher disqualifiziert.

Das expandierte Ataxin-3 gilt als sehr vielversprechender Kandidat als Biomarker für Therapiestudien, sodass bereits an mehreren hoch- und ultrasensitiven Messmethoden spezifisch für das expandierte ATXN3 etabliert wurden (Koike et al., 2021; Prudencio et al., 2020; Saute & Jardim, 2018). Anhand des Vorkommens von expandiertem Ataxin-3 können Mutationsträger so in mehreren Studien an PBMC, CSF und Plasma von gesunden Kontrollen unterschieden werden (Gonsior et al., 2021; Goti et al., 2004; Hubener-Schmid et al., 2021; Nguyen et al., 2013; Prudencio et al., 2020). Im Gegensatz zum NfL hat das expandierte Ataxin-3 als Erkrankungsprotein den Vorteil, nicht multifaktoriell durch SCA3 unabhängige neurodegenerative Prozesse wie Alter, demenzielle Erkrankungen oder Schädel-Hirn-Traumata stark beeinflusst zu werden (Wilke et al., 2018; Wilke et al., 2020). In der Einzelanalyse der Kohorten in meiner Arbeit ergab sich eine zuverlässige Differenzierung zwischen den Kontrollen und den prä-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern anhand der gemessenen Konzentration an expandiertem Ataxin-3. Dies konnte sowohl mit dem Simoa Assay als auch mit dem Singulex Assay gezeigt werden. Diese Differenzierung zwischen Kontrollen und Mutationsträgern spricht für eine Verwendung von expandiertem Ataxin-3 als Trait Marker der SCA3, was sich auch mit der vorhandenen Literatur deckt (Gonsior et al., 2021; Paulson, 2012)

Um als State Biomarker fungieren zu können, ist die Korrelation zu den klinischen Parametern besonders wichtig. Das Ziel wäre langfristig eine Verwendung als Surrogate Marker, also ein Ersetzen eines klinischen Endpunkts durch einen Biomarker (Katz, 2004; Saute & Jardim, 2018). Für die Beurteilung des Zusammenhangs zwischen Krankheitsprogression und Ataxin-3 Level der Probanden sind eine Betrachtung der Differenzierung zwischen prä-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern nützlich, aber auch einer Beurteilung einer

linearen Regression der Proteinkonzentration und des SARA Scores. In der Literatur finden sich hier vielversprechende Ergebnisse, die expandiertes Ataxin-3 auch in unterschiedlichen Biomaterialien und Messtechniken mit der klinischen Progression der Ataxie korrelieren können. Der hoch-sensitive Mesoscale Assay konnte eine statistisch signifikante Differenz zwischen den PolyQ Ataxin-3 Konzentrationen im CSF von prä-ataktischen zu ataktischen Mutationsträgern zeigen. In den Plasmaanalysen war die Differenzierung zwischen prä-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern mit einer AUC=0,70 im mittleren Bereich (Prudencio et al., 2020). Im Vergleich des Mesoscale Assays mit dem Singulex ATXN3 Assays konnte eine Korrelation zwischen den Konzentrationen an PolyQ Ataxin-3 in Plasma und CSF feststellen werden (Hubener-Schmid et al., 2021; Prudencio et al., 2020). Bei ATXN3 Mesoscale Assay konnte zwischen den Protein Leveln im CSF und den klinischen Daten wie AAO, *Disease Duration* (DD), SARA Score, *Gait Mobility* und CAG-Repeat Länge keine statistische Korrelation berechnet werden (Prudencio et al., 2020). In Plasma Proben hingegen ließ sich ein statistischer Zusammenhang zwischen einem höheren Ataxin-3 Wert mit frühem AAO, längerem CAG-Repeat und schlechtere *Gait Mobility* zeigen; in der für Alter, Geschlecht und Erkrankungsdauer korrigierten Kohorte zeigte sich dieser Zusammenhang nicht mehr (Prudencio et al., 2020). Zusätzlich zeigte die Korrelation von INAS Score und im Plasma gemessenen PolyQ Ataxin-3 für die 40 Patienten der Validationskohorte keinen statistischen Zusammenhang. Dies passt zu den Analysen dieser Arbeit, in der weder physiologische Ataxin-3 Level noch PolyQ Ataxin-3 Level eine signifikante lineare Regression im Zusammenhang mit dem INAS Score aufwiesen. Eine frühere Studie zeigte auch die Möglichkeit PolyQ Ataxin-3 als möglichen Marker für die Effektivität einer Therapiestudie (Target-Engagement-Marker) zu verwenden, indem Zellkulturen aus Fibroblasten von SCA3-Patienten verwendet wurden. Durch eine Behandlung mit siRNA konnte in dieser Studie ein deutlicher Rückgang der PolyQ Ataxin-3-Level beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass dieser Ansatz hilfreich sein könnte, um den Erfolg einer Therapie direkt zu messen (Prudencio et al., 2020). Eine spätere Studie konnte im Plasma PolyQ Ataxin-3 messen und eine sehr gute Korrelation zwischen der ataktischen Klinik

(quantifiziert am SARA Score und den Level an PolyQ Ataxin-3 zeigen (Hubener-Schmid et al., 2021). (Gonsior et al., 2021) konnte eine sehr gute Korrelation zwischen SARA Score und PolyQ Ataxin-3 in PBMCs zeigen.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen PolyQ Ataxin-3 und der Krankheitsprogression, wie aus der Literatur beschrieben, hergestellt werden. In den beiden verwendeten ultra-sensitiven Assays -Simoa und Singulex- konnte keine signifikante lineare Regression zwischen dem expandiertem Ataxin-3 und dem SARA Score der Probanden gefunden werden. Es konnte zwar eine Tendenz eines früheren AAO mit einem höheren PolyQ Ataxin-3 Level festgestellt werden, allerdings war dieser nicht statistisch signifikant. Die Differenzierung zwischen der prä-ataktischen und ataktischen Gruppe, zeigte ebenfalls keine statistische Signifikanz zwischen diesen beiden Gruppen, was bedeutet, dass die ATXN3 Proteinlevel über den Erkrankungszeitpunkt, während der Konvertierung von der prä-ataktischen (SARA kleiner 3) und der ataktischen Phase (Sara gleich/ größer 3) stabil blieben. Der Singulex Assay war bei Betrachtung der AUC der jeweiligen ROC Kurve dem Simoa Assay leicht überlegen, erreichte aber nicht die im Paper (Hubener-Schmid et al., 2021) angegebenen Trennschärfe des Assays.

Vergleichen wir nun die Literatur und Ergebnisse mit den vorher genannten Kriterien an einen Biomarker einer neurodegenerativen Erkrankung (Henley et al., 2005) sehen wir, dass Ataxin-3 als Biomarker den Vorteil bietet, dass es in einem leicht zur Verfügung stehende Biomaterial (Blut) zu messen ist und so auch mehrere Probenentnahmen erfolgen können. Auch das Kriterium der zuverlässigen und schnellen Messung scheint durch mehrere etablierte Assays in der Literatur erfüllt. Für eine genauere Analyse werden das physiologische Ataxin-3 und das expandierte Ataxin-3 im folgenden Absatz getrennt betrachtet.

Abschließend lässt sich zur Beurteilung von Ataxin-3 als Biomarker sagen, dass das *full-length* Ataxin-3 als State und Trait Biomarker ungeeignet erscheint, da es keine gute Differenzierung zwischen Mutationsträgern und gesunden Probanden ermöglicht und auch keine gute Korrelation zur klinischen

Progression der Ataxie bietet. Bei einem Allel-spezifischen Ansatz für eine Therapie, wenn man versucht durch Medikamente (e.g. ASO oder siRNA) spezifisch das PolyQ-expandierte Ataxin-3 zu reduzieren könnte es sinnvoll sein, zu wissen wieviel vom totalen Ataxin-3 man erhalten kann, welches dann für eine normale Funktion zur Verfügung steht (Helm et al., 2022).

Die beiden Punkte „Unterliegt bei Verwendung als diagnostischer Biomarker keinen großen Schwankungen in der Allgemeinbevölkerung“ und „Unbeeinflusst von nicht verwandten Erkrankungen und komorbiden Faktoren“ aus (Henley et al., 2005) können auch als Kriterien für einen guten Trait Biomarker betrachtet werden. PolyQ Ataxin-3 erfüllt diese Kriterien, es kommt spezifisch in SCA3-Mutationsträgern vor. SCA3 Mutationsträger können anhand der PolyQ Ataxin-3 Konzentration in Plasma, CSF, PBMCs und Fibroblasten von gesunden Kontrollen mit verschiedenen Assays differenziert werden. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit für Simoa und Singulex Assay zeigen eine sehr gute Differenzierung zwischen Kontrollen und Mutationsträgern anhand ihrer PolyQ Ataxin-3 Level im Plasma.

Als State Biomarker sind vor allem die letzten beiden Punkte von (Henley et al., 2005) entscheidend: die Korrelation mit dem Krankheitsverlauf, aber auch die mögliche Anwendung zur Kontrolle der Effektivität einer Therapie. Im Bezug auf die Korrelation mit dem klinischen Verlauf, namentlich SARA Score und INAS Score zeigen sich in der für diese Arbeit untersuchten Kohorten kein statistisch belastbarer Zusammenhang. Auch wenn ein früheres AAO mit höheren Werten an PolyQ Ataxin-3 assoziiert zu sein scheint, konnte die Korrelation von hohem SARA Score mit hohem Ataxin-3 wie in vorherigen Studien mit einer größeren Kohorte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden (Gonsior et al., 2021; Hubener-Schmid et al., 2021). Eine abschließende Beurteilung von PolyQ Ataxin-3 als State Biomarker kann hier noch nicht getroffen werden, auch eine Anwendung als zukünftiger Surrogate Marker für Therapiestudien bleibt noch fraglich.

In unserer Kohorte konnte die Korrelation zwischen expandiertem Ataxin-3 und SARA Score nicht nachgewiesen werden, die zuvor in anderen Studien gezeigt wurde (Gonsior et al., 2021) (Hubener-Schmid et al., 2021). Beide Assays,

einschließlich des publizierten TR-FRET Assay und der Singulex Plattform, verwendeten dieselben Antikörper zur Bestimmung des PolyQ-expandiertem ATXN3 (Gonsior et al., 2021), (Hubener-Schmid et al., 2021). Um zu überlegen warum die publizierten Ergebnisse von den Ergebnissen dieser Arbeit für die Simoa und Singulex Proben abweichen, könnten multiple Faktoren eine Rolle spielen. Durch den multi-zentrischen Aufbau der Studie (namentlich dem Labor des Tübinger Instituts für Genetik, der Firma Evotec in Hamburg und dem NMI in Reutlingen) könnte es durch eine Störung beim Transport der Proben oder einer Störung in der Kühlkette oder dem mehrmaligen Auftauen der Proben zu einer Beschädigung der Proben gekommen sein. Dies wirft auch die Frage auf, wie lange gefrorene Plasma-Proben gelagert werden können und wie oft sie wieder aufgetaut und eingefroren werden können, um noch zuverlässige Ergebnisse zu liefern. Die Singulex und Simoa Assays sind ultrasensitiv und messen in pg/ml, diese extremen kleinen Mengen an Protein könnten durch die aufgezählten Faktoren gestört worden sein. Ein weiterer Faktor, der als möglicher Störfaktor in Betracht gezogen werden kann, ist die Verwendung von unterschiedlichen Materialien in den unterschiedlichen Laboren. Bereits in der Studie von Gonsior et al wurde auf die hohe Bedeutung der Standardisierung der Materialien hingewiesen, in beschriebenen Fall bezogen dies explizit auf die Untersuchung von PBMCs durch den TR-FRET deutlich gemacht (Gonsior et al., 2021). Für die Abnahme des Plasmas und der PBMCs wurden im Rahmen der ESMI Studie hochstandardisierte Protokolle verwendet, welche einen Einfluss durch verschiedene Blutabnahmesysteme auf die Ergebnisse minimieren soll.

Das expandierte Ataxin-3 korreliert spezifisch mit der Mutation und ist vielversprechend als Trait-Biomarker, da es Mutationsträger zuverlässig von Kontrollpersonen unterscheidet. Als State-Biomarker, der mit dem Krankheitsverlauf korrelieren sollte, zeigt sich jedoch ein uneinheitliches Bild. Frühere Studien konnten lineare Zusammenhänge zwischen expandiertem Ataxin-3 und klinischen Parametern wie dem SARA Score nachweisen, während dies in der vorliegenden Arbeit nicht statistisch signifikant bestätigt werden konnte. Im Folgende wird der longitudinale Teil der Studie betrachtet, die im Gegensatz zur cross-sektionalen Studie dieselbe Population über einen längeren

Zeitraum hinweg verfolgt. Dadurch sollen Entwicklungen des Ataxin-3 Protein und zeitliche Zusammenhänge untersucht werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Biomarkerfindung für SCA3 eine komplexe Herausforderung bleibt, die innovative Ansätze und interdisziplinäre Zusammenarbeit erfordert.

#### **4.2 Longitudinale Analyse der Ataxin-3 Level in den Messmethoden TR-FRET, Simoa und Singulex**

Die zweite Hauptfragestellung dieser Promotion ist die longitudinale Stabilität des Ataxin-3 im Krankheitsverlauf. Bisherige Literatur beschäftigte sich mit der Stabilität des expandierten Ataxin-3 über einen Zeitraum von ca. 1 Jahr. In dieser Arbeit soll ein längerer Zeitraum betrachtet werden. Hübener-Schmid und Kollegen beobachteten das Verhalten von PolyQ Ataxin-3 im Plasma von 33 SCA3 Probanden mit Hilfe des Singulex Assays (Hubener-Schmid et al., 2021). In Zeitraum von 1 Jahr zeigten sich die Ataxin-3 Level, auch beim Übergang zwischen prä-ataktisch und ataktisch, als sehr stabil. Nur in der Gruppe der Probanden, die bereits in der Baseline Visite einen SARA Score >20 Punkte hatten, zeigten sich höhere Werte im Follow Up 1 nach einem Jahr. In früheren Studie wurde eine positive Korrelation des expandierten Ataxin-3 Level mit der Erkrankungsdauer gezeigt, was dafürspricht, dass das expandierte Ataxin-3 langfristig im Krankheitsverlauf ansteigt (Gonsior et al., 2021; Hubener et al., 2013). In ihrer Promotion beschrieb Frau Dr.med. Melanie Gansel eine longitudinale Analyse zwischen Baseline und Follow Up 1 Visite aus 23 Probanden (Gansel, 2020). Die Messung des PolyQ Ataxin-3 erfolgte einmal mit der MW1-1H9 Antikörper Kombination und einmal mit der 1C2-1H9 Antikörper Kombination in PBMC, beide Assays messen spezifisch das PolyQ-expandierte ATXN3 (Gonsior et al., 2021). Bezogen auf den MW1 Assay, zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation oder lineare Regression zwischen der Veränderung des SARA Scores und INAS Scores mit der Veränderung der PolyQ Ataxin-3 Leveln in den Probanden. Es konnte in der Kohorte aber eine Tendenz eines steigenden PolyQ Ataxin-3 Levels mit einer steigenden Erkrankungsdauer

gezeigt werden. Bei mild betroffenen Probanden (SARA = 3-12) sank im Beobachtungszeitraum das PolyQ Ataxin-3 Level eher ab, in der moderat (SARA = 13-23) und schwer (SARA >23) ataktischen Gruppe zeigte es eine steigende Tendenz. Insgesamt betrachtet zeigte sich dort keine eindeutige Tendenz, da Proteinlevel bei fortschreitender Krankheit/SARA Score bei manchen Probanden sanken, bei anderen anstiegen (Gansel, 2020)(Promotionsarbeit Melanie Gansel, 2020).

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse dieser Arbeit in die vorliegende Literatur eingeordnet werden.

Es wurden im longitudinalen Studiendesign insgesamt 61 Probanden longitudinal mit dem TR-FRET Assay auf *full-length* Ataxin-3 untersucht. Bei den dabei untersuchten Probanden handelt es sich um 39 Probanden, die in der, ihnen in der Baseline Untersuchung zugewiesenen Kategorie „mild ataktisch“, „moderat ataktisch“ und „schwer ataktisch“ geblieben waren, und um 25 Konverter, die ihre Kategorie im Beobachtungszeitraum wechselten. Auffällig war zunächst, dass im Mittelwert die Kontrollen höhere *full-length* Ataxin-3 Werte hatten, als die prä-ataktischen, mild ataktischen und moderat ataktischen Probanden, während die schwer ataktischen Probanden im Mittelwert höhere *full-length* Ataxin-3 Konzentrationen in Bezug auf alle Gruppen zeigten. Dies passt zu früheren Studien, aber auch zu den Analysen dieser Arbeit, dass prä-ataktische und mild ataktische Probanden niedrigere *full-length* Ataxin-3 Konzentrationen aufwiesen als die Kontrollen und schwer ataktischen Probanden (Gonsior et al., 2021). Die prä-ataktischen, mild ataktischen und moderat ataktischen Probanden zeigten im Verlauf ein Ansteigen des SARA Scores im Mittelwert, was zur Krankheitsprogression der neurodegenerativen Erkrankung passt. In der Analyse des *full-length* Ataxin-3 zeigte sich kein eindeutiges Bild des Proteinverlaufs. Während die *full-length* Ataxin-3 Level in den prä-ataktischen Probanden konstant blieben von Baseline zu Follow Up 1, zeigte sich im gleichen Zeitraum ein Anstieg des *full-length* Ataxin-3 in den mild ataktischen Probanden und ein Absinken in den schwer ataktischen Probanden. Der konstante Verlauf in der prä-ataktischen Phase und der ansteigende Verlauf in der mild ataktischen Phase

sind auch in Zusammenhang mit den niedrigen *full-length* Ataxin-3 Konzentrationen im prä-ataktischen/mild ataktischen Krankheitsstadium zu sehen, die dann im weiteren Krankheitsverlauf wieder anstiegen (Gonsior et al., 2021). In der Doktorarbeit von Frau Dr.med. Kathrin Gonsior beschreibt sie ein Abfall der *full-length* Ataxin-3 Konzentration bei einer gleichzeitig sehr hohen PolyQ Ataxin-3 Konzentration (Promotion Kathrin Gonsior, 2020), diese Beobachtung könnte auch Grundlage sein für den Abfall der *full-length* Ataxin-3 Konzentration in den schwer ataktischen Probanden hier.

Für zwei Probanden aus der Kategorie moderat ataktisch lagen jeweils 3 Proben, entspricht einen Verlauf von insgesamt 2 Jahren, vor. Beide zeigten zunächst ein leichtes Absinken der Proteinkonzentration zum Follow Up 1, gefolgt von einem leichten Anstieg in Follow Up 2. Dieser Verlauf über einen Untersuchungszeitraum von 2 Jahren verdeutlicht, dass eine Probe nur eine Momentaufnahme darstellt und die *full-length* Ataxin-3 Konzentration in Probanden zu schwanken scheint. Diese unterschiedlichen Verläufe könnten auf individuelle Schwankungen der Biomarker-Konzentration, methodische Variabilität oder andere Einflussfaktoren wie Tagesform, Sportverhalten, Nüchternheit vor der Blutentnahme und weiteren äußere Umstände oder Komorbiditäten wie z.B weitere neurologische Erkrankungen hinweisen. Die Analyse der Konverter zeigt ein uneinheitliches Verhalten der *full-length* Ataxin-3-Level beim Übergang zwischen Krankheitsstadien. Insgesamt lässt sich sagen, dass in der longitudinalen Beobachtung für das Level an *full-length* Ataxin-3 über 2 bzw. 3 Visiten kein klarer Zusammenhang bezogen zum Krankheitsverlauf auszumachen war. Abgesehen von der beobachteten Tendenz von niedrigen Ataxin-3 Konzentrationen in den prä-ataktischen Probanden, liegt die Vermutung nahe, dass die *full-length* Ataxin-3 Konzentration individuell großen Schwankungen unterworfen ist. Ein interessanter Ansatzpunkt wäre hier eine noch langfristige Beobachtung der *full-length* Ataxin-3 Konzentrationen, eventuell über mehrere Jahrzehnte, im Vergleich zu den PolyQ Ataxin-3 Konzentrationen um den Anteil des PolyQ Ataxin-3 an dem *full-length* Ataxin-3 bestimmen und beobachten zu können. In Kombination mit dem generell schlechten Zusammenhang zwischen *full-length* Ataxin-3 mit klinischem Zustand

des Patienten, zeigen die hier präsentierten Ergebnisse einer longitudinalen Studie, die geringe Eignung des *full-length*Ataxin-3 als Surrogate Marker und Endpunkt einer Therapiestudie auf. Das hier bei einigen Probanden beobachtete Absinken des SARA Scores scheint für Patienten mit einer neurodegenerativen Erkrankung zunächst ungewöhnlich. Mögliche Erklärungen dafür wären, dass der SARA Score als klinischer Parameter auch Tagesform abhängig ist und trotz hoher Standardisierung in der ESMI Studie die Erhebung des SARA Scores durch einen Arzt auch immer eine subjektive Komponente hat. Eine frühere Studie die mit einem Video-basierten Tool zur SARA Messung arbeitete stellte, intraindividuellen Unterschiede der Probanden zwischen dem niedrigsten und höchsten SARAhome-Score im Bereich von 1 bis 5,5 Punkten fest (Grobe-Einsler et al., 2021). Es könnte erwogen werden, einen Probanden auch im Verlauf bei weiteren Kontrollen immer von derselben Person beurteilen zu lassen oder für eine möglichst große Objektivität KI-gestützt auf Grundlage von Videomaterial oder den Mittelwert aus mehreren Untersuchungen innerhalb eines definierten Zeitraums zu berechnen. In einer prospektiven Validierungsstudie mit 50 Ataxie-Patienten wurde das Video basierte SARAhome bereits direkt mit der herkömmlichen SARA verglichen, dabei zeigte sich eine hohe Korrelation der beiden Messmethoden (Grobe-Einsler et al., 2021). Die videobasierte Selbstmessung zu Hause könnte ein wichtiger Schritt sein, um die Patienten noch regelmäßiger klinisch beurteilen zu können (Grobe-Einsler et al., 2021).

Für die longitudinale Analyse mit dem Simoa Assay lagen 30 Probanden mit einem Follow Up 1 vor. Auch in der Follow Up 1 Kohorte zeigte der Simoa Assay eine sehr gute Differenzierung zwischen Kontrollen und prä-ataktischen Probanden (AUC=1,0) und eine sehr gute Differenzierung zwischen den Kontrollen und ataktischen Probanden (AUC=1,0). In der durchgeführten klinischen Korrelation ergab sich für die Follow Up Kohorte im Gegensatz zur Baseline Kohorte eine statistisch signifikante lineare Regression zwischen AAO und PolyQ Ataxin-3. Dieser Zusammenhang war bereits in einer vorherigen Studie gezeigt worden (Hubener-Schmid et al., 2021).

Es ergab sich als Intraklassenkorrelationskoeffizient (ICC) ein Wert von 0,723 für die Mutationsträger im Baseline und der Follow Up 1 Visite. Dies spricht für eine gute Stabilität des expandierten Ataxin-3 im 1 Jahres Verlauf. In einer früheren Untersuchung konnte mit dem Singulex Assay eine höhere Stabilität des Ataxin-3 beobachten mit einem ICC=0,848 (0,693-0,925) (Hubener-Schmid et al., 2021). Es gab in der statistischen Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen den Werten der Baseline Visite und der Follow Up Visite in den Kohorten mild ataktisch, moderat ataktisch und schwer ataktisch. Auch wenn die PolyQ Ataxin-3 Konzentration insgesamt sehr stabil war, ließ sich für die prä-ataktischen, mild ataktischen und moderat ataktischen Probanden eine steigende Tendenz an PolyQ Ataxin-3 in dieser Studie? messen. In der Gruppe der schwer ataktischen Probanden fiel die Protein Konzentration ab. Im Vergleich dazu hatte Frau Dr. med. Melanie Gansel in ihrer Promotion einen Anstieg an PolyQ Ataxin-3 in mild ataktischen Probanden und ein Abfallen in moderat und schwer ataktischen Probanden beobachtet (Gansel, 2020) (Promotionsarbeit Melanie Gansel, 2020). Als Erklärung für diese teilweise gegensätzlichen Beobachtungen können hier die jeweils relativ kleine Gruppengröße genannt werden, sowie die unterschiedlichen verwendeten Assays und Biomaterialien. Für die Gruppe der schwer ataktischen Probanden konnte im Bezug auf die klinische Situation noch angefügt werden, dass im Zeitraum von Baseline Visite zum Follow Up 1 der SARA Score im Mittelwert ebenfalls gesunken war. Eine frühere Studie stellte die Abnahme von löslichem PolyQ Ataxin-3 im Cerebellum von Mäusen gegen Ende der Erkrankung fest, die mit zunehmender nukleärer Aggregatbildung erfolgte (Nguyen et al., 2013). Diese Beobachtung könnte eine mögliche Erklärung für die fallenden PolyQ Ataxin-3 Level hier sein. Allerdings kann man Aggregate nur im Gehirn beobachten und nicht im Plasma! In der Analyse mittels der ultrasensitiven Methode Simoa konnten vor allem bei den Konverter Probanden wieder vermehrt interindividuelle Schwankungen beobachtet werden. Auch in der Promotion von Dr.med. Melanie Gansel zeigte sich bereits ein uneindeutiges Verhalten der Konverter, nicht nur für den hier verwendeten MW1 Antikörper, sondern auch für den 1C2 Antikörper, deren Ergebnisse sie in ihrer Promotion verglich (Gansel, 2020) (Promotionsarbeit Melanie Gansel, 2020).

Insgesamt kann man jedoch zum Schluss kommen, dass die hohe Stabilität über einen Zeitraum von einem Jahr eine relevante Information für die Anwendung in künftigen Therapiestudien ist. Da PolyQ Ataxin-3 sich in dieser Arbeit als stabil zeigte, kann vermutet werden, dass der Effekt einer *protein-lowering* Therapie an der PolyQ Ataxin-3 Konzentration gezeigt werden kann. In der Literatur wird neben dem Trait Marker und dem State Marker noch als dritte Kategorie der Pharmakodynamischen Marker ins Spiel gebracht, der dazu verwendet wird einen bestimmten Mechanismus zu zeigen (Andre et al., 2014). Dieser Marker muss aber nicht immer wie ein State Marker stark mit der Klinik des Patienten korrelieren. Auf Grund der in dieser Arbeit nicht optimalen klinischen Korrelation des PolyQ Ataxin-3 ist die Zukunft von Ataxin-3 als State/Surrogate Marker noch abzuwägen. Als Pharmakodynamischer Marker in Kombination mit einem klinischen Biomarker ist das PolyQ Ataxin-3 jedoch vielversprechend für Therapiestudien. Dies zeigt sich auch in der Literatur, wo Prudencio und seine Kollegen die löslichen von expandiertem Ataxin-3 in Plasma und CSF untersuchten und dessen Verwendbarkeit als pharmakodynamischer Biomarker prüften (Prudencio et al., 2020). Die Studie untersuchte eine Kohorte aus Mutationsträgern und Kontrollen und korrelierte das expandierte Ataxin-3 im Plasma und CSF mit der Schwere der klinischen Ausprägung der SCA3, die am SARA Score gemessen wurde. Diese Studie bestätigte durch die gute Korrelation zwischen gemessenem expandiertem Ataxin-3 und dem klinischen Zustand der Probanden, dessen Position als aussichtsreichen Kandidaten für einen pharmakodynamischen Biomarker der SCA3 (Prudencio et al., 2020).

Mit dem Singulex Assay wurde in dieser Arbeit eine Kohorte von Probanden mit 2 Visiten analysiert, diese umfasste 83 Probanden davon 77 Mutationsträger. Die Kohorte der Probanden mit 3 Visiten, die mit dem Singulex Assay analysiert wurden, umfasst 19 Probanden davon 15 Mutationsträger. Betrachtet man den ICC der Kohorte im Vergleich zur publizierten Analyse von Hübener-Schmid genannt Zahl von ICC=0,848 (0,693-0,925) fällt der niedrigere ICC-Wert in den Kohorten dieser Arbeit auf (Hübener-Schmid et al., 2021). Für die Kohorte der

Probanden mit 3 Visiten ergab sich ICC=0,592 (0,128-0,830) und damit noch eine durchschnittliche Stabilität des PolyQ Ataxin-3. Besonders auffällig ist die berechnete niedrige Stabilität in der 2 Visiten Kohorte mit ICC=0,225 (-0,226-0,509). Da aber gleichzeitig die Werte der Baseline statistisch im Wilcoxon Test keine signifikante Differenz zu denen des Follow Up 1 zeigten, wurden die einzelnen Gruppe der 2 Visiten Kohorte noch einmal einzeln analysiert. Für die Gruppe der prä-ataktischen mit 2 Visiten ergab sich dabei ICC=0,833 (0,537-0,940) und für die moderat ataktischen mit 2 Visiten ICC=0,767 (0,276-0,928) und damit eine mit Hübener-Schmid vergleichbare Stabilität des PolyQ Ataxin-3 (Hübener-Schmid et al., 2021). In den Gruppen mild ataktisch 2 Visiten (ICC=0,182) und schwer ataktisch 2 Visiten (ICC=0,485 (-1,884-0,899)) wurden sehr niedrige ICC-Werte berechnet und vor allem der große Anteil der mild ataktischen Probanden (39 Probanden) trug einen großen Teil zur Gesamt-Analyse bei. Diese Beobachtung könnte dafürsprechen, dass vor allem in der frühen und in der sehr späten Erkrankungsphase die PolyQ Ataxin-3 Konzentration eher Schwankungen unterworfen ist.

Der einzige prä-ataktische Proband mit 3 Visiten hat auffällig hohe PolyQ Ataxin-3 Werte, sogar höher als der schwer ataktische Proband der Kohorte. Dies könnte einen Hinweis darauf sein, dass nicht nur das Krankheitsstadium, sondern auch persönliche Veranlagung das Level an PolyQ Ataxin-3 mit beeinflussen. Interessant wäre hier ein Vergleich mit weiteren Angehörigen, um zu beobachten, ob vielleicht Mutationsträger seiner Familie ebenfalls sehr hohe Ataxin-3 Werte bereits im prä-ataktischen Stadium haben. Der Proband hatte in allen 3 Visiten einen SARA Score von 0 Punkten, war also klinisch (bezogen auf ataktische Symptome) nicht vom gesunden Probanden zu unterscheiden. Das Ataxin-3 Level fiel von der Baseline Visite zur Follow Up 2 Visite ab, interessant wäre hier eine weitere Beobachtung bis zum AAO (SARA Score>3 Punkte).

Insgesamt betrachtet sank in der Kohorte über 2 Visite die PolyQ Ataxin-3 Konzentration in den prä-ataktischen und schwer ataktischen Probanden ab und stieg in der mild ataktischen und moderat ataktischen Gruppe an. Das Absinken der Proteinkonzentration in den schwer ataktischen Probanden ist hier gegenläufig zur Literatur, die ein Ansteigen der Proteinkonzentration in schwer

betroffenen Probanden (SARA<20 Punkte) beobachteten. In der Kohorte mit 3 Visiten zeigte sich für mild ataktische, moderat ataktische und schwer ataktische PolyQ Ataxin-3 Konzentration (Hubener-Schmid et al., 2021), dabei ist hier im Vergleich zu den 2 Visiten Daten aber auch die kleinere Gruppengröße zu beachten. Das Absinken des Ataxin-3 ist hier anders als eigentlich vermutet mit einem Anstieg des SARA Scores in allen 3 Gruppen verbunden. Wie in zuvor beschriebenen Analyse mittels SIMOA, zeigte sich bei den zahlreichen Konvertern ein widersprüchliches Verhalten des Ataxin-3 zum SARA Score.

Der Simoa-Assay sowie der Singulex-Assay messen das expandierte Ataxin-3 im Plasma der Probanden. Es wurde sowohl auf der Simoa-Plattform als auch auf der Singulex-Plattform mit den beiden Antikörpern MW1 und 1H9 gearbeitet. Diese Klone wurden bereits in der Literatur mehrfach verwendet (Gonsior et al., 2021; Hubener-Schmid et al., 2021; Nguyen et al., 2013). Die in dieser Arbeit mit dem Singulex untersuchte Kohorte umfasste 147 Probanden. Der Singulex-Assay wurde bereits etabliert und an 90 Probanden validiert (Hubener-Schmid et al., 2021). Es wurden 58 Probanden mit dem Simoa-Assay durch das NMI Reutlingen untersucht.

Die Analysen der expandierten Ataxin-3-Level der Probanden zeigten in beiden Kohorten eine signifikante Differenz zwischen den expandierten Ataxin-3-Werten der Kontrollen und prä-ataktischen Mutationsträgern sowie zwischen den Kontrollen und den ataktischen Mutationsträgern. Diese Differenzierung zwischen den Kontrollen und den prä-ataktischen bzw. ataktischen Mutationsträgern anhand der Konzentration an expandiertem Ataxin-3 konnte in der Literatur bereits gezeigt werden (Gonsior et al., 2021; Hubener-Schmid et al., 2021). In der Simoa-Kohorte zeigte sich im Gegensatz zur vorhandenen Literatur keine höheren expandierten Ataxin-3-Werte der ataktischen Probanden gegenüber den prä-ataktischen Probanden (Hubener-Schmid et al., 2021). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass für die Simoa-Analyse nur 9 prä-ataktische Probanden zur Verfügung standen. In der Singulex-Kohorte dieser Arbeit zeigte sich ebenfalls in der ROC-Analyse für die Differenzierung zwischen prä-ataktischen und ataktischen Probanden keine optimale Differenzierung, aber

wieder eine sehr gute Differenzierung zwischen Kontrollen und Mutationsträgern in einer großen Kohorte.

In der von der Firma Evotec mit dem Singulex-Assay untersuchten Kohorte konnte erneut ein starker statistischer Zusammenhang in der linearen Regression zwischen dem AAO und dem SARA Score ( $p < 0,0001$ ) dargestellt werden. Es zeigte sich in der Singulex-Kohorte und ebenfalls in der Simoa-Kohorte eine negative Korrelation zwischen früherem AAO und expandierten Ataxin-3-Werten im Plasma, welche jedoch nicht signifikant war. In der Literatur konnte jedoch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einem früheren AAO und einem höheren Level an expandiertem Ataxin-3 nachgewiesen werden (Hubener-Schmid et al., 2021). Der in der Literatur mit dieser Antikörperkombination signifikante Zusammenhang zwischen steigendem SARA Score und steigenden expandierten Ataxin-3-Leveln war in der Singulex- und Simoa-Kohorte dieser Arbeit so nicht reproduzierbar (Hubener-Schmid et al., 2021). Die lineare Regression zwischen dem INAS Score und dem expandierten Ataxin-3 war auf der Singulex-Plattform sowie der Simoa-Plattform nicht statistisch signifikant.

Faber und Kollegen sehen das NfL Protein als zuverlässigeren Biomarker als PolyQ Ataxin-3, um zwischen Carrier, Biomarker und ataktischer Phase der Erkrankung zu unterscheiden (Faber et al., 2023). Das NfL stieg bis zu 11,9 Jahre vor AAO kontinuierlich an und blieb dann auf einem stabilen Level. Diese steigende Tendenz am AAO konnte für PolyQ Ataxin-3 nicht beobachtet werden. NfL ist von PolyQ Ataxin-3 und SARA der erste Biomarker der vor erkrankungsbeginn stark anstieg. Das PolyQ-expandierte Ataxin-3 zeigte in der Literatur eine weit gestreute Verteilung über den Krankheitsverlauf hinweg (Faber et al., 2023). Die in der Veröffentlichung vorgeschlagene Einteilung des Krankheitsverlaufs in ein Biomarker Stadium (Vorkommen PolyQ Ataxin-3), ein Carrier Stadium ( $SARA > 2$  und  $NfL > 2$ ) und ein ataktisches Stadium mit SARA über 3 Punkten, zeigt einerseits die hohe Bedeutung von PolyQ Ataxin-3 als Trait Biomarker, die auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte,

andererseits aber auch seine noch nicht sichere Qualität als State Biomarker. Betrachtet man die Beobachtungen dieser Arbeit der Messungen des expandierten ATXN3 mittels SIMOA oder Singulex so kommt man ebenfalls wie Faber und Kollegen zu dem Schluss, dass das PolyQ Ataxin-3 für den Übergang von prä-ataktisch zu ataktisch kein eindeutiger Marker sein kann (Faber et al., 2023). Grund dafür sind die widersprüchlichen Tendenzen in den individuellen Probanden nicht nur in dieser Arbeit, sondern auch in der TR-FRET Analyse von Dr.med. Melanie Gansel in ihrer Promotion (Gansel, 2020). Nicht nur im Verhalten der PolyQ Ataxin-3 Konzentration zum Zeitpunkt des AAO, sondern auch in der übrigen Auswertung zeigten sich keine eindeutigen Tendenzen für das Verhalten der Veränderung des SARA Scores zur Veränderung des PolyQ Ataxin-3 im Zeitraum von 1 bzw. 2 Jahren. In einem Großteil der Probanden verhielt sich der PolyQ Ataxin-3 Spiegel relativ stabil, was wie bereits in der Literatur angeführte Potential als pharmakodynamischer Marker in Therapiestudien bietet (Hubener-Schmid et al., 2021). Andererseits zeigten individuelle Probanden, eine unerwartete nicht klinisch zu korrelierende Instabilität ihrer Ataxin-3 Level, daher sollte die Stabilität des Ataxin-3 in einer größeren Kohorte über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Dazu wäre es nötig weitere potentielle Einflussfaktoren, wie Nahrungsaufnahme kurz vor der Blutabnahme, Sportliche Betätigung, das Vorliegen einer kürzlichen Impfung oder eines Infektes. Außerdem ist zu bedenken, dass auch in longitudinalen Studien nur ein kleiner Teil des langen Krankheitsverlaufes der SCA3 abgebildet werden kann (Faber et al., 2023). Somit sollten längere longitudinale Studie über mehrere Jahre in einer möglichst großen Kohorte initiiert werden.

### **4.3 Genotypen der Kohorte**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 SNPs an Probanden der ESMI Kohorte evaluiert: SNP 669 (rs1048755), SNP 987 (rs12895357) und SNP 1118 (rs7158733). Es handelt sich um 3 intragenetische Marker, wobei der SNP 1118 ein STOP-Codon in Exon 10 hervorrufen kann, was zur Produktion eines

verkürzten Ataxin-3 führt (Gaspar et al., 2001; Maciel et al., 1999). Durch Varianten des SNP 1118 entstehen die Isoformen Ataxin-3aL und Ataxin3aS (Ataxin-3a Uniprot ID P54252-19) (Goto et al., 1997). Der Ataxin-3aS Form fehlen durch das Stop-Codon 16 Aminosäuren am C-terminalen Ende im Vergleich zur Referenzform Ataxin-3c (UniProt ID P54252-2) (Weishaupl et al., 2019). Diese Ataxin-3aS Isoform ist besonders häufig in Mutationsträgern zu finden (Maciel et al., 1999). Die verschiedenen Isoformen des ATX3 die aus diesen SNP-Varianten entstehen, stehen in Verdacht den Krankheitsverlauf zu beeinflussen, wie die Ataxin-3aS Form, von welcher gezeigt wurde, dass sie zu einer stärkeren Aggregation neigt (Weishäupl et al., 2019). Durch die detaillierte Analyse von Haplotypen in Patientenfamilien auf globaler Ebene wird es möglich, die Verbreitung genetischer Merkmale oder spezifischer Genvarianten über verschiedene Regionen und Zeiträume hinweg nachzuvollziehen und daraus Rückschlüsse auf die historische Verbreitung der SCA3 zu ziehen (Gaspar et al., 2001). Diese Haplotypen sind nicht nur für die genetische Analyse von Patientenfamilien geeignet um die weltweite Ausbreitung der SCA3 nachzuvollziehen zu können, sondern stellen auch interessante Ansatzpunkte möglicher Allel-spezifischer Therapien dar.

Für den SNP 1118, bei dem ein Tyrosin Codon durch ein Stop-Codon ersetzt wird (TAC1118>TAA1118), wurde von Prudencio und Kollegen ein Anteil von bis zu 87% unter den Mutationsträgern nachgewiesen und eine signifikante Assoziation zwischen den Status als Mutationsträger und Träger der TAA-Version des SNP 1118 hergestellt (Prudencio et al., 2020). Durch spezifische Protein-Reduktions- (*protein lowering*) Therapien, die an einem SNP ansetzen, könnte so selektiv das mutierte Ataxin-3 runterreguliert werden und so die Funktion des regulären Ataxin-3 erhalten werden. Dafür kommen sowohl ASO (Antisense-Oligonukleotiden), als auch siRNA Therapien in Frage. Eine zielgerichtete Therapie bezogen auf SNP 1118 kann insbesondere in Populationen in denen die Joseph-Linie dominiert angewandt werden, da hier die TAA1118 Variante mehrheitlich vorhanden ist (Prudencio et al., 2020). Ein weiterer interessanter Ansatz bietet die SNP 987 G>C Variante, welche 70% aller Mutationsträger tragen (Gaspar et al., 2001). Eine spezifische *protein lowering*

Therapie für den SNP 987 G>C wurde bereits mehrfach mittels siRNAs in der Zellkultur erprobt (Alves et al., 2008; Li et al., 2004). Für die Behandlung von autosomal-dominanten neurodegenerativen Erkrankungen wie der SCA3 und Chorea Huntington bietet auch die ASO Technik viele Möglichkeiten, die darauf beruhen dass sich eine ASO gezielt an mRNA legen und somit die Produktion des fehlproduzierten Proteins, im Falle von Chorea Huntington Huntingtin und SCA3 Ataxin-3 unterdrückt (Helm et al., 2022). Potentiell kommen als Kandidaten für so eine Allel-spezifische ASO Therapie vor allem SNP als Ansatzpunkt infrage, welche auf dem gleichen Allel wie die pathogene Mutation liegen und in einem ausreichenden Prozentsatz der Mutationsträger verändert vorliegen (Helm et al., 2022). Es wurde bereits eine ASO-Therapie spezifisch für SNP 987 in der Zellkultur erprobt (Hauser et al., 2022). In dieser ASO-Studie gelang im Zellmodell eine Reduktion von 80% der mutierten Ataxin-3 Level bei gleichbleibenden Wildtyp Ataxin-3 Leveln innerhalb von 10 Tagen im Zellmodell (Hauser et al., 2022).

Beim hier ebenfalls untersuchten SNP 669 handelt es sich um einen Austausch von ATG>GTG. Durch diesen Austausch wird Valin statt Methionin in die Proteinsequenz eingefügt (Goto et al., 1997). Aus methodischen Gründen konnte bei der Analyse des SNP 669 in der Kohorte nicht bestimmt werden, welches Allel die jeweilige Variante trägt, da der Abstand zur CAG-Repeat Wiederholung 9000 bp beträgt (Ichikawa et al., 2001). Eine Allel-spezifische Analyse war jedoch für dies war jedoch für die Analyse von SNP 987 und SNP 1118 möglich. In dieser Arbeit wurden die Genotypen der ESMI-Kohorte untersucht, die nun mit der vorhandenen Literatur verglichen werden sollen. Für den überwiegenden Teil der ESMI-Kohorte lag jedoch bereits eine Genotypisierung für diese 3 SNPs vor, welche im Rahmen anderer Doktorarbeiten der AG Biomarker (Daniel Sturm, Melanie Gansel, Gabriele Anna Kaucher) erfolgten und durch meine Analysen ergänzt wurden (Gansel, 2020; Kaucher, 2020; Sturm, 2021).

Für das SNP 1118 gilt in der ESMI Kohorte das die Kontrollgruppe der dominante Genotyp C/C war, also die Variante TAC1118 auf beiden Allelen getragen wurde. Der häufigste Genotyp bei den Mutationsträgern war mit 50,4% C/A mit Genotyp TAC1118 auf dem Wildtyp Allel und Genotyp TAA1118 auf dem expandierten

Allel. Eine genauere Betrachtung des expandierten Allels ergab bei den Mutationsträger einen Anteil von 70%. Für diese Analyse wurden 390 Probanden der ESMI-Kohorte miteinbezogen. Eine frühere Studie gibt mit einem Anteil von 76% für TAA1118 auf dem expandierten Allel ähnliche Zahlen an (Gaspar et al., 2001). Auch der dominierende Anteil der Variante TAC 1118, sowohl auf dem Wildtyp Allel der Mutationsträger als auch auf beiden Allelen der Kontrollen, konnte in beiden Populationen gezeigt werden. Bei der Kohorte von Gaspar und Kollegen handelte es sich zum einen um eine größere Kohorte als auch um eine ethnisch diversere (Gaspar et al., 2001). Während in ESMI europäische Probanden untersucht wurden, rekrutierten Gaspar und Kollegen zusätzlich Familien aus Brasilien, China, Taiwan, Japan, Frankreich, Kanada, die Vereinigten Staaten, Norwegen, Indien, die Britischen Westindischen Inseln, Ghana, Jemen, Marokko, Französisch-Guayana, Kambodscha, die Elfenbeinküste und aus Algerien (Gaspar et al., 2001). Mit 601 Probanden wurden in dieser Studie auch fast doppelt so viele Probanden untersucht wie in der Analyse in dieser Arbeit. Aus der Tatsache, dass sowohl in einer europäischen als auch einer internationalen Kohorte ähnliche Prozentsätze für die in der Kontrollgruppe eher seltene Variante TAA1118 ergaben, könnte eine gemeinsame Abstammung der SCA3 Familien geschlossen werden und eine weltweite Ausbreitung ausgehend von wenigen Founder-Mutationen, worauf im Folgenden noch weiter eingegangen wird. Diese bereits in der Literatur aufgestellte Hypothese wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit weiter bestärkt (Gaspar et al., 2001; Takiyama et al., 1997). Eine weitere Studie an 23 japanischen SCA3 Familien untersuchte den SNP 1118, wobei hier ca. die Hälfte der Probanden die Variante A/A trug und die andere Hälfte die Variante C/A, wobei sich eine starke Assoziation zwischen der Variante TAA1118 und dem mutierten Allel zeigte (Goto et al., 1997).

Der SNP 987 kann in den Varianten C987GG/G987GG vorliegen. In der in dieser Arbeit analysierten ESMI-Kohorte lag bei 60,4% der Kontrollen der G/G Genotyp vor und bei 51,8% der Mutationsträger der G/C Genotyp. Das expandierte Allel trug zu 72,9% den Genotyp C. In der Analyse von Gaspar und Kollegen (Gaspar et al., 2001) trugen ebenfalls 73 % der Mutationsträger den Genotyp C auf ihrem

expandierten Allel und auch in der japanischen SCA3 Population zeigte sich eine starke Assoziation zwischen Mutationsträgerstatus und dem C987GG Genotyp (Goto et al., 1997).

Der SNP 669 kann in den Varianten A669TG und G669TG vorliegen. In der hier analysierten ESMI-Kohorte war unter den Kontrollen der Genotyp G/G der häufigste (60%) und unter den Mutationsträgern der Genotyp A/G (57,2%). Der einzig vorliegende homozygote Proband trug den Genotyp A/A, was mit einem dominanten Vorkommen der Variante A auf dem expandierten Allel der Mutationsträger zu vereinbaren wäre. In der Literatur fanden sich Angaben von 76 % der Mutationsträger bei denen ebenfalls die Variante A669TG vorlag (Gaspar et al., 2001). Einen vermuteten Einfluss des SNP 669 auf die Stabilität des CAG- Repeats konnte in der Literatur aber nicht bestätigt werden (Maciel et al., 1999).

Sowohl im Rahmen dieser Analyse als auch in der Literatur fällt auf, dass bei Mutationsträgern der SNP 1118 mehrheitlich in der Variante A vorliegt, SNP 987 in Variante C und SNP 669 in Variante A (Gaspar et al., 2001). Diese Ausprägung an genetischen Merkmalen wird in der Literatur als ACA-Haplotyp zusammengefasst (Gaspar et al., 2001). In den untersuchten SCA3 Familien wurde der ACA-Haplotyp in 72 % der Fälle gefunden, aber in der Kontrollgruppe konnte dies nur 2% der Probanden bestätigt werden. Dies zeigt, dass der A-C-A-Haplotyp stark mit der SCA3 assoziiert ist, wobei die Bedeutung des SNP 987 besonders hervorgehoben wird und auf ein Gründungsmutationsereignis hinweist. In den Azoren wurden zwei unterschiedliche Haplotypen im Zusammenhang mit der SCA3 identifiziert, was auf eine separate Entstehung der Mutation auf den Inseln hindeutet. Der Joseph-Haplotyp (A-C-A) ist mit Familien der Insel Flores verknüpft, während der Machado Haplotyp (G-G-C) bei Familien aus São Miguel häufig ist. Während die meisten nicht-portugiesischen Familien den Joseph/A-C-A Haplotyp teilen, gibt es einige Variationen, z.B. in Japan, Marokko und den USA. Das deutet auf weitere unabhängige bzw. parallele Mutationsereignisse neben dem A-C-A-Haplotyp hin (Gaspar et al., 2001). Auch in der japanischen Population zeigt sich eine starke Assoziation zwischen der Variante SNP 1118 A und SNP 987 C, welche gemeinsam auf dem expandierten

Allele der Mutationsträger liegen (Goto et al., 1997). Die Ergebnisse der ESMI-Kohorte passen also zur bereits vorhandenen Literatur über den A-C-A-Haplotyp. Weitere Untersuchungen könnten dahin gehen zusätzliche genetische und populationsspezifische Marker untersuchen, um ein noch präziseres Verständnis der Verbreitungsmuster der SCA3 in verschiedenen ethnischen Populationen zu erlangen, um damit auch potenzielle weitere Ansatzpunkte für zukünftige *protein-lowering* Therapien in bestimmten Populationen zu identifizieren.

#### **4.4 Stärken und Schwächen der Promotion**

Für die Beurteilung der Aussagekraft dieser Arbeit ist ein wichtiges Kriterium die untersuchte Probandenanzahl. Dabei ist es jedoch wichtig zu beachten, dass in diesem Fall eine sehr seltene Erkrankung, eine sogenannte *Orphan Disease*, untersucht wird. Dies kann die Rekrutierung einer großen Probandenzahl erschweren, wodurch die Stichprobengröße zwangsläufig kleiner ausfallen kann. Hier ist es sinnvoll die Gruppengröße auch mit den Gruppengrößen in der Literatur zu vergleichen. Frau Dr. med. Kathrin Gonsior etablierte und publizierte im Rahmen ihrer Promotion einen TR-FRET Assay zur Messung von *full-length* Ataxin-3 (Gonsior et al., 2021). Dieser Assay wurde auch in dieser Arbeit zur Analyse von 243 ESMI-Probanden verwendet. Von den 243 analysierten ESMI-Probanden waren 70 Kontrollprobanden, 31 Probanden waren prä-ataktische Mutationsträger. „Prä-ataktisch“ entsprach einem SARA Score von <3 Punkten in der Auswertung dieser Arbeit. 142 Probanden waren ataktische Mutationsträger mit einem SARA Score >3 Punkten. Eine Stichprobe von 243 Probanden kann bei einer seltenen Krankheit wie der SCA3 als angemessene Größe betrachtet werden. Ähnlich angelegte Studien zur Untersuchung von Biomarkern in der SCA3 wie umfassten beispielsweise 65 Probanden, eine weitere Studie umfasste 45 Probanden (Gonsior et al., 2021; Wilke et al., 2018). 2 große longitudinale Studien, die EUROSCA und RISCA Studie umfassten jeweils 526 bzw. 252 Probanden, von denen jedoch nur ein Teil SCA3 Mutationsträger waren, da im Rahmen dieser Studien auch SCA1, SCA2, SCA3 und SCA6 Mutationsträger untersucht wurden (Jacobi et al., 2022). Die mit dem

Singulex untersuchte Kohorte umfasst 147 Probanden. Der Singulex Assay wurde zuvor an einer etwas kleineren Kohorte von insgesamt 90 Probanden etabliert und validiert (Hubener-Schmid et al., 2021). In der hier untersuchten Kohorte zeigte der Singulex Assay eine sehr gute Diskriminierung zwischen den Kontrollen und prä-ataktischen Probanden und eine sehr gute Diskriminierung zwischen Kontrollen und ataktischen Probanden, wie auch in der vorangegangenen Studie. Es wurden 58 Probanden mit dem Simoa Assay durch das NMI Reutlingen untersucht. Der Simoa Assay misst ausschließlich das expandierte Ataxin-3 im Plasma der Probanden. Es wurde mit den beiden Antikörpern MW1 und 1H9 gearbeitet. Diese Antikörper wurden bereits bei verschiedenen Studien verwendet um expandiertes Ataxin-3 zu messen (Gonsior et al., 2021; Hubener-Schmid et al., 2021; Nguyen et al., 2013). In der Literatur findet sich für diese Antikörper Kombination eine 59-köpfige Kohorte für die Untersuchung von expandiertem Ataxin-3 als potenziellen Biomarker, sowie zunächst eine 19-köpfige Kohorte zur Etablierung eines Assays, um expandiertes Ataxin-3 zu messen und dann 71 Probanden als Validationskohorte (Gonsior et al., 2021; Hubener-Schmid et al., 2021). Im Vergleich mit diesen Studien kann die Größe der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte als sehr gut betrachtet werden, die longitudinale ESMI Kohorte war jedoch relativ klein. In Zukunft sollte hier eine Untersuchung in einer größeren Kohorte und über einen längeren Beobachtungs-Zeitraum durchgeführt werden, wie auch bereits in der bestehenden Literatur vorgeschlagen (Faber et al., 2023).

Es gab teilweise starke Abweichungen in den longitudinalen Messungen der Probanden in ihrer expandierten Ataxin-3 Konzentration, dies könnte im Rahmen individueller Schwankungen erklärt werden, aber auch dadurch, dass die hier verwendeten Methoden ultra-sensitiv sind und schon auf die geringsten Umgebungseinflüsse reagieren. Das Abnahme-Protokoll für die Plasma- bzw. PBMC-Proben ist stark reguliert im Rahmen der ESMI-Studie. Interessant war in dieser Arbeit, wie auch bei in früheren Studien beobachtete Absinken der full-length Ataxin-3 Konzentrationen am Übergang zum Krankheitsbeginn (Gonsior et al., 2021). Hier wäre eventuell eine Messung der full-length Ataxin-3

Konzentration und der expandierten Ataxin-3 Konzentration über einen längeren longitudinalen Zeitraum von 5-10 Jahren interessant.

Als weiterer Kritikpunkt könnte genannt werden, dass aufgrund der Technik des *High Resolution Melting* für die Analyse des SNP 669 nicht zwischen dem expandierten Allel und Wildtyp Allel differenziert werden konnte.

Die vorgestellte Arbeit liefert eine detaillierte und umfassende Charakterisierung sowohl genetischer als auch Protein-basierter Biomarker, die für die Erforschung einer seltenen Erkrankung von hoher Relevanz sind. Besonders hervorzuheben ist, dass die untersuchte ESMI-Kohorte einen großen Umfang besitzt. Dies wird durch die konsequente Standardisierung sämtlicher Prozesse – von der Blutabnahme über die Lagerung bis hin zum Versand – ermöglicht. Diese sorgfältige Methodik stellt sicher, dass die verwendeten multizentrischen Biomaterialien von hoher Qualität und Validität sind und somit belastbare sowie reproduzierbare Ergebnisse liefern.

## 5 Zusammenfassung

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine autosomal-dominant vererbte, unheilbare, seltene neurodegenerative Krankheit. Als Auslöser der Erkrankung wurde eine instabile CAG-Repeat-Wiederholung auf dem ATXN3 Gen identifiziert, welches zur Bildung eines Polyglutamin-expandierten Ataxin-3 Proteins führt. Derzeit gibt es für die SCA3 erste Gentherapie-Versuche zur Proteinreduktion, die in klinischen Versuchen erprobt werden. Als seltene Erkrankung ist die Planung von Therapiestudien eine besondere Herausforderung. Aktuell ist der klinisch erhobene SARA Score das Mittel der Wahl zur Einschätzung der Wirksamkeit einer Therapie in Studien. Zum genaueren Monitoring dieser Studien und um schneller und mit weniger Probanden die benötigte Effektstärke zu erreichen, sind Biomarker nötig, die einfach zu gewinnen sind und zuverlässig mit dem klinischen Progress der Patienten korrelieren. Als vielversprechender Kandidat für einen molekularen Biomarker hat sich in der Literatur das PolyQ-expandierte Ataxin-3 hervorgetan. In dieser Promotion wurde sowohl das *full-length* Ataxin-3 als auch das PolyQ-expandierte Ataxin-3 im longitudinalen Studiendesign an Probanden der ESMI Kohorte untersucht. Ziel dieser Arbeit war an einer großen Kohorte die Rolle von Ataxin-3 als Biomarker der Erkrankung, sowie dessen longitudinalen Verlauf zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Biomaterial von Probanden im longitudinalen Studiendesign über mehrere Jahre (bis zu 4 Jahre im Verlauf) analysiert und ausgewertet. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es unterschiedliche Methoden der Quantifizierung der Proteinmenge des Ataxin-3 zu vergleichen. Dabei erfolgte der Vergleich der drei Methoden: (A) TR-FRET (selbst durchgeführt), sowie der Vergleich zu ultra-sensitiven Messmethoden: (B) SIMOA-Plattform (Messung durchgeführt NMI Reutlingen) und (C) Singulex-Plattform (Messung durchgeführt Evotec SE). Die Messung des *full-length* Ataxin-3 mit dem TR-FRET Assay unter Verwendung der Antikörperkombination (1H9-N-term) ergab erwartungsgemäß keine gute Differenzierung zwischen den gesunden Kontrollen und den Mutationsträgern. Für die Analyse der Baseline Untersuchung standen im TR FRET 243 Probanden zur Verfügung, im Simoa

Assay 58 Probanden und im Singulex Assay 147 Probanden. Die gemessene Konzentration an Ataxin-3 wurde mit klinischen Daten (SARA Score, INAS Score, AAO) der ESMI Probanden korreliert. Sowohl im Ergebnis der Simoa Assay Messung als auch der Singulex Assay Messung mit der 1H9-MW1 Antikörperkombination ergab sich eine spezifische Messung des expandierten Ataxin-3 in prä-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern. Die für das expandierte Ataxin-3 in anderen Kohorten in der Literatur gezeigte signifikante Differenzierung zwischen prä-ataktischen und ataktischen Probanden konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Das expandierte Ataxin-3 zeigte sich vielversprechend als Trait Biomarker, da es Mutationsträger zuverlässig von Kontrollpersonen unterscheiden kann. Als State-Biomarker, der mit dem Krankheitsverlauf korrelieren sollte, zeigt sich jedoch ein uneinheitliches Bild, da die statistisch signifikante Korrelation zwischen expandiertem Ataxin-3 Level und klinische Parametern wie SARA Score und INAS Count, wie sie in der Literatur gezeigte wurde, in dieser Arbeit nicht reproduziert werden konnte. Im longitudinalen Studiendesign ergaben sich keine eindeutigen Tendenzen für das Verhalten der Veränderungen des SARA Scores zur Veränderung des PolyQ-expandierten Ataxin-3 im Zeitraum der beobachteten 2 Jahre. Im Rahmen dieser Promotion wurden 3 ATXN3-spezifische SNP an Probanden der ESMI Kohorte analysiert. Die Ergebnisse der ESMI Kohorte bestätigen die Literatur, in der Mutationsträger mehrheitlich den sogenannte A-C-A Haplotyp, auch bekannt als Joseph-Haplotyp tragen. Bereits in der vorhandenen Literatur zeigte sich die Dominanz dieser Varianten in den expandierten Allelen der Mutationsträger, was somit spannende Ansätze für eine noch zielgenauere Gentherapie bieten kann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in dieser Arbeit das expandierte Ataxin-3 in einer großen Kohorte als guter Trait Biomarker erwies und dass sowohl der Simoa Assay als auch der Singulex Assay sehr zuverlässig anhand des expandierten Ataxin-3 Kontrollen und Mutationsträger differenzieren können. Über den Beobachtungszeitraum zeigte sich die Konzentration des expandierten Ataxin-3 im Großteil der Kohorte stabil. Das macht das expandierte Ataxin-3 zu einem interessanten Parameter für die Überwachung einer Proteinreduktions-Therapie, aber möglicherweise nicht als Krankheitsverlaufsmarker.

## 6 Literaturverzeichnis:

- Alves, S., Nascimento-Ferreira, I., Auregan, G., Hassig, R., Dufour, N., Brouillet, E., Pedroso de Lima, M. C., Hantraye, P., Pereira de Almeida, L., & Deglon, N. (2008). Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PLoS One*, 3(10), e3341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003341>
- Andre, R., Scahill, R. I., Haider, S., & Tabrizi, S. J. (2014). Biomarker development for Huntington's disease. *Drug Discov Today*, 19(7), 972-979. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.002>
- Berke, S. J., Schmied, F. A., Brunt, E. R., Ellerby, L. M., & Paulson, H. L. (2004). Caspase-mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin-3. *J Neurochem*, 89(4), 908-918. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02369.x>
- Bettencourt, C., & Lima, M. (2011). Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 35. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-35>
- Burk, K., Abele, M., Fetter, M., Dichgans, J., Skalej, M., Laccone, F., Didierjean, O., Brice, A., & Klockgether, T. (1996). Autosomal dominant cerebellar ataxia type I clinical features and MRI in families with SCA1, SCA2 and SCA3. *Brain*, 119 ( Pt 5), 1497-1505. <https://doi.org/10.1093/brain/119.5.1497>
- Byrne, L. M., Rodrigues, F. B., Blennow, K., Durr, A., Leavitt, B. R., Roos, R. A. C., Scahill, R. I., Tabrizi, S. J., Zetterberg, H., Langbehn, D., & Wild, E. J. (2017). Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis. *Lancet Neurol*, 16(8), 601-609. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30124-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30124-2)
- Carvalho, D. R., La Rocque-Ferreira, A., Rizzo, I. M., Imamura, E. U., & Speck-Martins, C. E. (2008). Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatr Neurol*, 38(4), 296-299. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.12.006>
- Cerritelli, S. M., & Crouch, R. J. (2009). Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J*, 276(6), 1494-1505. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06908.x>
- Cohen, L., Keegan, A., Melanson, S. E. F., & Walt, D. R. (2019). Impact of clinical sample handling and processing on ultra-low level measurements of plasma cytokines. *Clin Biochem*, 65, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.01.001>
- Costa Mdo, C., & Paulson, H. L. (2012). Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol*, 97(2), 239-257. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.006>
- Cui, X., Liang, Q., Liang, Y., Lu, M., Ding, Y., & Lu, B. (2014). TR-FRET assays of Huntingtin protein fragments reveal temperature and polyQ length-dependent conformational changes. *Sci Rep*, 4, 5601. <https://doi.org/10.1038/srep05601>
- Daldin, M., Fodale, V., Cariulo, C., Azzollini, L., Verani, M., Martufi, P., Spiezia, M. C., Deguire, S. M., Cherubini, M., Macdonald, D., Weiss, A., Bresciani, A., Vonsattel, J. G., Petricca, L., Marsh, J. L., Gines, S., Santimone, I., Marano, M., Lashuel, H. A.,...Caricasole, A. (2017). Polyglutamine expansion affects huntingtin

- conformation in multiple Huntington's disease models. *Sci Rep*, 7(1), 5070. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05336-7>
- de Oliveira, C. M., Leotti, V. B., Polita, S., Anes, M., Cappelli, A. H., Rocha, A. G., Ecco, G., Bolzan, G., Kersting, N., Duarte, J. A., Saraiva-Pereira, M. L., Junior, M. C. F., Rezende, T. J. R., & Jardim, L. B. (2023). The longitudinal progression of MRI changes in pre-ataxic carriers of SCA3/MJD. *J Neurol*, 270(9), 4276-4287. <https://doi.org/10.1007/s00415-023-11763-6>
- Diaferia, G., Bommarito, S., Braga Neto, P., Park, S. W., Padovani, M., Haddad, F., Haddad, L., Voos, M. C., Chien, H. F., Pedroso, J. L., & Barsottini, O. (2022). Effect of speech therapy on quality of life in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Arq Neuropsiquiatr*, 80(10), 1017-1025. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1755203> (Efeito da terapia fonoaudiologica na qualidade de vida de pacientes com ataxia espinocerebelar tipo 3.)
- Durr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Duyckaerts, C., Abbas, N., Didierjean, O., Chneiweiss, H., Benomar, A., Lyon-Caen, O., Julien, J., Serdaru, M., Penet, C., Agid, Y., & Brice, A. (1996). Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol*, 39(4), 490-499. <https://doi.org/10.1002/ana.410390411>
- ESMI, A. S. (2024). / [www.ataxia-study-group.net/html/studies/esmi](http://www.ataxia-study-group.net/html/studies/esmi).
- Evers, M. M., Tran, H. D., Zalachoras, I., Pepers, B. A., Meijer, O. C., den Dunnen, J. T., van Ommen, G. J., Aartsma-Rus, A., & van Roon-Mom, W. M. (2013). Ataxin-3 protein modification as a treatment strategy for spinocerebellar ataxia type 3: removal of the CAG containing exon. *Neurobiol Dis*, 58, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.04.019>
- Faber, J., Berger, M., Carlo, W., Hubener-Schmid, J., Schaprian, T., Santana, M. M., Grobe-Einsler, M., Onder, D., Koyak, B., Giunti, P., Garcia-Moreno, H., Gonzalez-Robles, C., Lima, M., Raposo, M., Melo, A. R. V., de Almeida, L. P., Silva, P., Pinto, M. M., van de Warrenburg, B. P.,...Klockgether, T. (2023). Stage-dependent biomarker changes in spinocerebellar ataxia type 3. *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.04.21.23287817>
- Finkel, R. S., Chiriboga, C. A., Vajsaar, J., Day, J. W., Montes, J., De Vivo, D. C., Yamashita, M., Rigo, F., Hung, G., Schneider, E., Norris, D. A., Xia, S., Bennett, C. F., & Bishop, K. M. (2016). Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet*, 388(10063), 3017-3026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31408-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31408-8)
- Gaetani, L., Blennow, K., Calabresi, P., Di Filippo, M., Parnetti, L., & Zetterberg, H. (2019). Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 90(8), 870-881. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-320106>
- Gansel, M. (2020). *Validierung von potentiellen Biomarkern für die neurodegenerative Erkrankung Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) und des krankheitsmodulierenden Einflusses intragenetischer Polymorphismen im Gen ATXN3* [Eberhard-Karls Universität Tübingen]. Tübingen.
- Garcia-Moreno, H., Prudencio, M., Thomas-Black, G., Solanky, N., Jansen-West, K. R., Hanna Al-Shaikh, R., Heslegrave, A., Zetterberg, H., Santana, M. M., Pereira de

- Almeida, L., Vasconcelos-Ferreira, A., Januario, C., Infante, J., Faber, J., Klockgether, T., Reetz, K., Raposo, M., Ferreira, A. F., Lima, M.,...Giunti, P. (2022). Tau and neurofilament light-chain as fluid biomarkers in spinocerebellar ataxia type 3. *Eur J Neurol*, 29(8), 2439-2452. <https://doi.org/10.1111/ene.15373>
- Gaspar, C., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Goto, J., Arvidsson, K., Dias, A., Silveira, I., Maciel, P., Coutinho, P., Lima, M., Zhou, Y. X., Soong, B. W., Watanabe, M., Giunti, P., Stevanin, G., Riess, O., Sasaki, H., Hsieh, M., Nicholson, G. A.,...Rouleau, G. A. (2001). Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet*, 68(2), 523-528. <https://doi.org/10.1086/318184>
- Gonsior, K., Kaucher, G. A., Pelz, P., Schumann, D., Gansel, M., Kuhs, S., Klockgether, T., Forlani, S., Durr, A., Hauser, S., Rattay, T. W., Synofzik, M., Hengel, H., Schols, L., Riess, O. H., & Hubener-Schmid, J. (2021). PolyQ-expanded ataxin-3 protein levels in peripheral blood mononuclear cells correlate with clinical parameters in SCA3: a pilot study. *J Neurol*, 268(4), 1304-1315. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10274-y>
- Goti, D., Katzen, S. M., Mez, J., Kurtis, N., Kiluk, J., Ben-Haiem, L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kakizuka, A., Sharp, A. H., Ross, C. A., Mouton, P. R., & Colomer, V. (2004). A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci*, 24(45), 10266-10279. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2734-04.2004>
- Goto, J., Watanabe, M., Ichikawa, Y., Yee, S. B., Ihara, N., Endo, K., Igarashi, S., Takiyama, Y., Gaspar, C., Maciel, P., Tsuji, S., Rouleau, G. A., & Kanazawa, I. (1997). Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neurosci Res*, 28(4), 373-377. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(97\)00056-4](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(97)00056-4)
- Grobe-Einsler, M., Taheri Amin, A., Faber, J., Schaprian, T., Jacobi, H., Schmitz-Hubsch, T., Diallo, A., Tezenas du Montcel, S., & Klockgether, T. (2021). Development of SARA(home) , a New Video-Based Tool for the Assessment of Ataxia at Home. *Mov Disord*, 36(5), 1242-1246. <https://doi.org/10.1002/mds.28478>
- Haacke, A., Hartl, F. U., & Breuer, P. (2007). Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3. *J Biol Chem*, 282(26), 18851-18856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611914200>
- Harp, C., Thanei, G. A., Jia, X., Kuhle, J., Leppert, D., Schaedelin, S., Benkert, P., von Budingen, H. C., Hendricks, R., & Herman, A. (2022). Development of an age-adjusted model for blood neurofilament light chain. *Ann Clin Transl Neurol*, 9(4), 444-453. <https://doi.org/10.1002/acn3.51524>
- Harris, G. M., Dodelzon, K., Gong, L., Gonzalez-Alegre, P., & Paulson, H. L. (2010). Splice isoforms of the polyglutamine disease protein ataxin-3 exhibit similar enzymatic yet different aggregation properties. *PLoS One*, 5(10), e13695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013695>
- Hauser, S., Helm, J., Kraft, M., Korneck, M., Hubener-Schmid, J., & Schols, L. (2022). Allele-specific targeting of mutant ataxin-3 by antisense oligonucleotides in

- SCA3-iPSC-derived neurons. *Mol Ther Nucleic Acids*, 27, 99-108.  
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.11.015>
- Helm, J., Schols, L., & Hauser, S. (2022). Towards Personalized Allele-Specific Antisense Oligonucleotide Therapies for Toxic Gain-of-Function Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics*, 14(8).  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081708>
- Hengel, H., Martus, P., Faber, J., Giunit, P., Garcia-Moreno, H., Solanky, N., Klockgether, T., Reetz, K., van de Warrenburg, B. P., Santana, M. M., Silva, P., Cunha, I., de Almeida, L. P., Timmann, D., Infante, J., de Vries, J., Lima, M., Pires, P., Bushara, K.,...Schols, L. (2023). The frequency of non-motor symptoms in SCA3 and their association with disease severity and lifestyle factors. *J Neurol*, 270(2), 944-952.  
<https://doi.org/10.1007/s00415-022-11441-z>
- Henley, S. M., Bates, G. P., & Tabrizi, S. J. (2005). Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol*, 18(6), 698-705.  
<https://doi.org/10.1097/01.wco.0000186842.51129.cb>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338449/> Co-published by National Institutes of Health (US), B. C. M. P. (2024). *Biomarkers, EndpointS, and other Tools* Resource [Internet]. Silver Spring (Costa Mdo & Paulson): Food and Drug Administration (US); 2016-. FDA-NIH Biomarker Working Group. 2016 Jan 28 [Updated 2021 Jan 25]. Retrieved 09.03 from
- Hubener-Schmid, J., Kuhlbrodt, K., Peladan, J., Faber, J., Santana, M. M., Hengel, H., Jacobi, H., Reetz, K., Garcia-Moreno, H., Raposo, M., van Gaalen, J., Infante, J., Steiner, K. M., de Vries, J., Verbeek, M. M., Giunti, P., Pereira de Almeida, L., Lima, M., van de Warrenburg, B.,...Riess, O. (2021). Polyglutamine-Expanded Ataxin-3: A Target Engagement Marker for Spinocerebellar Ataxia Type 3 in Peripheral Blood. *Mov Disord*, 36(11), 2675-2681.  
<https://doi.org/10.1002/mds.28749>
- Hubener, J., Weber, J. J., Richter, C., Honold, L., Weiss, A., Murad, F., Breuer, P., Wullner, U., Bellstedt, P., Paquet-Durand, F., Takano, J., Saido, T. C., Riess, O., & Nguyen, H. P. (2013). Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Hum Mol Genet*, 22(3), 508-518. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds449>
- Hwang, J., Banerjee, M., Venable, A. S., Walden, Z., Jolly, J., Zimmerman, C., Adkisson, E., & Xiao, Q. (2019). Quantitation of low abundant soluble biomarkers using high sensitivity Single Molecule Counting technology. *Methods*, 158, 69-76.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.10.018>
- Ichikawa, Y., Goto, J., Hattori, M., Toyoda, A., Ishii, K., Jeong, S. Y., Hashida, H., Masuda, N., Ogata, K., Kasai, F., Hirai, M., Maciel, P., Rouleau, G. A., Sakaki, Y., & Kanazawa, I. (2001). The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet*, 46(7), 413-422.  
<https://doi.org/10.1007/s100380170060>
- Ilg, W., Brotz, D., Burkard, S., Giese, M. A., Schols, L., & Synofzik, M. (2010). Long-term effects of coordinative training in degenerative cerebellar disease. *Mov Disord*, 25(13), 2239-2246. <https://doi.org/10.1002/mds.23222>

- Jacobi, H., Schaprian, T., Beyersmann, J., Tezenas du Montcel, S., Schmid, M., Klockgether, T., Euroasca, & Groups, R. S. (2022). Evolution of disability in spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, and 6. *Ann Clin Transl Neurol*, 9(3), 286-295. <https://doi.org/10.1002/acn3.51515>
- Jiang, H., Tang, B., Xu, B., Zhao, G. H., Shen, L., Tang, J. G., Li, Q. H., & Xia, K. (2005). [Frequency analysis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias in Han population in the Chinese mainland and clinical and molecular characterization of spinocerebellar ataxia type 6]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 22(1), 1-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15696468>
- Johnson, S. L., Blount, J. R., Libohova, K., Ranxhi, B., Paulson, H. L., Tsou, W. L., & Todi, S. V. (2019). Differential toxicity of ataxin-3 isoforms in *Drosophila* models of Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neurobiol Dis*, 132, 104535. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104535>
- Katz, R. (2004). Biomarkers and surrogate markers: an FDA perspective. *NeuroRx*, 1(2), 189-195. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.189>
- Kaucher, G. A. (2020). *Ataxin-3 als potenzieller Biomarker in der neurodegenerativen Erkrankung der Spinozerebellären Ataxie Typ 3* [Eberhard-Karls Universität Tübingen]. Tübingen.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., & et al. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*, 8(3), 221-228. <https://doi.org/10.1038/ng1194-221>
- Khalil, M., Teunissen, C. E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M. P., Gattringer, T., Barro, C., Kappos, L., Comabella, M., Fazekas, F., Petzold, A., Blennow, K., Zetterberg, H., & Kuhle, J. (2018). Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*, 14(10), 577-589. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>
- Kieling, C., Prestes, P. R., Saraiva-Pereira, M. L., & Jardim, L. B. (2007). Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet*, 72(6), 543-545. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00910.x>
- Klein, F. A., Zeder-Lutz, G., Cousido-Siah, A., Mitschler, A., Katz, A., Eberling, P., Mandel, J. L., Podjarny, A., & Trottier, Y. (2013). Linear and extended: a common polyglutamine conformation recognized by the three antibodies MW1, 1C2 and 3B5H10. *Hum Mol Genet*, 22(20), 4215-4223. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt273>
- Klockgether, T., Mariotti, C., & Paulson, H. L. (2019). Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0074-3>
- Ko, J., Ou, S., & Patterson, P. H. (2001). New anti-huntingtin monoclonal antibodies: implications for huntingtin conformation and its binding proteins. *Brain Res Bull*, 56(3-4), 319-329. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00599-8](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00599-8)
- Koike, Y., Jansen-West, K. R., Hanna Al-Shaikh, R., Carlomagno, Y., Song, Y., Dunmore, J. A., LeDoux, M. S., Friedman, J. H., Pena, A. B., Uitti, R. J., Zaremba, J., van Gerpen, J. A., Pfeiffer, R. F., Veerappan, V., Aiba, I., Hashimoto, R., Giles, S. S., Shah, J. S., Tipton, P. W.,...Prudencio, M. (2021). Urine levels of the polyglutamine ataxin-3 protein are elevated in patients with spinocerebellar

- ataxia type 3. *Parkinsonism Relat Disord*, 89, 151-154.  
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.07.018>
- Li, Q. F., Dong, Y., Yang, L., Xie, J. J., Ma, Y., Du, Y. C., Cheng, H. L., Ni, W., & Wu, Z. Y. (2019). Neurofilament light chain is a promising serum biomarker in spinocerebellar ataxia type 3. *Mol Neurodegener*, 14(1), 39.  
<https://doi.org/10.1186/s13024-019-0338-0>
- Li, Y., Yokota, T., Matsumura, R., Taira, K., & Mizusawa, H. (2004). Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol*, 56(1), 124-129.  
<https://doi.org/10.1002/ana.20141>
- Lima, L., & Coutinho, P. (1980). Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorena Portuguese family. *Neurology*, 30(3), 319-322.  
<https://doi.org/10.1212/wnl.30.3.319>
- Lima, M., & Raposo, M. (2018). Towards the Identification of Molecular Biomarkers of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3)/Machado-Joseph Disease (MJD). *Adv Exp Med Biol*, 1049, 309-319. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_16)
- Lin, Z., Shu, A. D., Bach, M., Miller, B. S., & Rogol, A. D. (2022). Average IGF-1 Prediction for Once-Weekly Lonapegsomatropin in Children With Growth Hormone Deficiency. *J Endocr Soc*, 6(1), bvab168.  
<https://doi.org/10.1210/jendso/bvab168>
- Lopes-Cendes, I., Teive, H. G., Calcagnotto, M. E., Da Costa, J. C., Cardoso, F., Viana, E., Maciel, J. A., Radvany, J., Arruda, W. O., Trevisol-Bittencourt, P. C., Rosa Neto, P., Silveira, I., Steiner, C. E., Pinto Junior, W., Santos, A. S., Correa Neto, Y., Werneck, L. C., Araujo, A. Q., Carakushansky, G.,...Rouleau, G. A. (1997). Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large group of Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr*, 55(3B), 519-529. <https://doi.org/10.1590/s0004-282x1997000400001>
- Lopes-Ramos, C. M., Pereira, T. C., Dogini, D. B., Gilioli, R., & Lopes-Cendes, I. (2016). Lithium carbonate and coenzyme Q10 reduce cell death in a cell model of Machado-Joseph disease. *Braz J Med Biol Res*, 49(12), e5805.  
<https://doi.org/10.1590/1414-431X20165805>
- Luo, L., Wang, J., Lo, R. Y., Figueroa, K. P., Pulst, S. M., Kuo, P. H., Perlman, S., Wilmot, G., Gomez, C. M., Schmahmann, J., Paulson, H., Shakkottai, V. G., Ying, S. H., Zesiewicz, T., Bushara, K., Geschwind, M., Xia, G., Subramony, S. H., Ashizawa, T., & Kuo, S. H. (2017). The Initial Symptom and Motor Progression in Spinocerebellar Ataxias. *Cerebellum*, 16(3), 615-622.  
<https://doi.org/10.1007/s12311-016-0836-3>
- Maciel, P., Gaspar, C., DeStefano, A. L., Silveira, I., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D. M., Sudarsky, L., Guimaraes, J., Loureiro, J. E., & et al. (1995). Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet*, 57(1), 54-61.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7611296>
- Maciel, P., Gaspar, C., Guimaraes, L., Goto, J., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Arvidsson, K., Dias, A., Sequeiros, J., Sousa, A., & Rouleau, G. A. (1999). Study of three

- intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)<sub>n</sub> tract. *Eur J Hum Genet*, 7(2), 147-156. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200264>
- Martier, R., Sogorb-Gonzalez, M., Stricker-Shaver, J., Hubener-Schmid, J., Keskin, S., Klima, J., Toonen, L. J., Juhas, S., Juhasova, J., Ellederova, Z., Motlik, J., Haas, E., van Deventer, S., Konstantinova, P., Nguyen, H. P., & Evers, M. M. (2019). Development of an AAV-Based MicroRNA Gene Therapy to Treat Machado-Joseph Disease. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 15, 343-358. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.10.008>
- Martins, S., Calafell, F., Gaspar, C., Wong, V. C., Silveira, I., Nicholson, G. A., Brunt, E. R., Tranebjaerg, L., Stevanin, G., Hsieh, M., Soong, B. W., Loureiro, L., Durr, A., Tsuji, S., Watanabe, M., Jardim, L. B., Giunti, P., Riess, O., Ranum, L. P.,...Sequeiros, J. (2007). Asian origin for the worldwide-spread mutational event in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 64(10), 1502-1508. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.10.1502>
- Martins, S., & Sequeiros, J. (2018). Origins and Spread of Machado-Joseph Disease Ancestral Mutations Events. *Adv Exp Med Biol*, 1049, 243-254. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_12)
- Martins, S., Soong, B. W., Wong, V. C., Giunti, P., Stevanin, G., Ranum, L. P., Sasaki, H., Riess, O., Tsuji, S., Coutinho, P., Amorim, A., Sequeiros, J., & Nicholson, G. A. (2012). Mutational origin of Machado-Joseph disease in the Australian Aboriginal communities of Groote Eylandt and Yirrkala. *Arch Neurol*, 69(6), 746-751. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.2504>
- Martins, S., Yahia, A., Costa, I. P. D., Siddig, H. E., Abubaker, R., Koko, M., Corral-Juan, M., Matilla-Duenas, A., Brice, A., Durr, A., Leguern, E., Ranum, L. P. W., Amorim, A., Elsayed, L. E. O., Stevanin, G., & Sequeiros, J. (2023). Machado-Joseph disease in a Sudanese family links East Africa to Portuguese families and allows reestimation of ancestral age of the Machado lineage. *Hum Genet*, 142(12), 1747-1754. <https://doi.org/10.1007/s00439-023-02611-8>
- Masino, L., Musi, V., Menon, R. P., Fusi, P., Kelly, G., Frenkiel, T. A., Trottier, Y., & Pastore, A. (2003). Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Lett*, 549(1-3), 21-25. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00748-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00748-8)
- Matos, C. A., de Almeida, L. P., & Nobrega, C. (2019). Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy. *J Neurochem*, 148(1), 8-28. <https://doi.org/10.1111/jnc.14541>
- McLoughlin, H. S., Moore, L. R., Chopra, R., Komlo, R., McKenzie, M., Blumenstein, K. G., Zhao, H., Kordasiewicz, H. B., Shakkottai, V. G., & Paulson, H. L. (2018). Oligonucleotide therapy mitigates disease in spinocerebellar ataxia type 3 mice. *Ann Neurol*, 84(1), 64-77. <https://doi.org/10.1002/ana.25264>
- McLoughlin, H. S., Moore, L. R., & Paulson, H. L. (2020). Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiol Dis*, 134, 104635. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104635>

- Meira, A. T., Pedroso, J. L., Boller, F., Franklin, G. L., Barsottini, O. G. P., & Teive, H. A. G. (2020). Reconstructing the History of Machado-Joseph Disease. *Eur Neurol*, 83(1), 99-104. <https://doi.org/10.1159/000507191>
- Nakano, K. K., Dawson, D. M., & Spence, A. (1972). Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22(1), 49-55. <https://doi.org/10.1212/wnl.22.1.49>
- Nalavade, R., Griesche, N., Ryan, D. P., Hildebrand, S., & Krauss, S. (2013). Mechanisms of RNA-induced toxicity in CAG repeat disorders. *Cell Death Dis*, 4(8), e752. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.276>
- Nguyen, H. P., Hubener, J., Weber, J. J., Grueninger, S., Riess, O., & Weiss, A. (2013). Cerebellar soluble mutant ataxin-3 level decreases during disease progression in Spinocerebellar Ataxia Type 3 mice. *PLoS One*, 8(4), e62043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062043>
- Nicastro, G., Menon, R. P., Masino, L., Knowles, P. P., McDonald, N. Q., & Pastore, A. (2005). The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(30), 10493-10498. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501732102>
- Park, H., Kim, H. J., & Jeon, B. S. (2015). Parkinsonism in spinocerebellar ataxia. *Biomed Res Int*, 2015, 125273. <https://doi.org/10.1155/2015/125273>
- Paulson, H. (2012). Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handb Clin Neurol*, 103, 437-449. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51892-7.00027-9>
- Paulson, H. L., Perez, M. K., Trottier, Y., Trojanowski, J. Q., Subramony, S. H., Das, S. S., Vig, P., Mandel, J. L., Fischbeck, K. H., & Pittman, R. N. (1997). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron*, 19(2), 333-344. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80943-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80943-5)
- Paulson, H. L., Shakkottai, V. G., Clark, H. B., & Orr, H. T. (2017). Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments. *Nat Rev Neurosci*, 18(10), 613-626. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.92>
- Pfeiffer, A., Herzog, L. K., Luijsterburg, M. S., Shah, R. G., Rother, M. B., Stoy, H., Kuhbacher, U., van Attikum, H., Shah, G. M., & Dantuma, N. P. (2021). Poly(ADP-ribosyl)ation temporally confines SUMO-dependent ataxin-3 recruitment to control DNA double-strand break repair. *J Cell Sci*, 134(3). <https://doi.org/10.1242/jcs.247809>
- Pfeiffer, A., Luijsterburg, M. S., Acs, K., Wiegant, W. W., Helfricht, A., Herzog, L. K., Minoia, M., Bottcher, C., Salomons, F. A., van Attikum, H., & Dantuma, N. P. (2017). Ataxin-3 consolidates the MDC1-dependent DNA double-strand break response by counteracting the SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4. *EMBO J*, 36(8), 1066-1083. <https://doi.org/10.15252/embj.201695151>
- Prudencio, M., Garcia-Moreno, H., Jansen-West, K. R., Al-Shaikh, R. H., Gendron, T. F., Heckman, M. G., Spiegel, M. R., Carlomagno, Y., Daugherty, L. M., Song, Y., Dunmore, J. A., Byron, N., Oskarsson, B., Nicholson, K. A., Staff, N. P., Gorcenco, S., Puschmann, A., Lemos, J., Januario, C.,...Petrucci, L. (2020). Toward allele-specific targeting therapy and pharmacodynamic marker for spinocerebellar ataxia type 3. *Sci Transl Med*, 12(566). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb7086>

- Raposo, M., Hubener-Schmid, J., Tagett, R., Ferreira, A. F., Vieira Melo, A. R., Vasconcelos, J., Pires, P., Kay, T., Garcia-Moreno, H., Giunti, P., Santana, M. M., Pereira de Almeida, L., Infante, J., van de Warrenburg, B. P., de Vries, J. J., Faber, J., Klockgether, T., Casadei, N., Admard, J.,...Lima, M. (2024). Blood and cerebellar abundance of ATXN3 splice variants in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Neurobiol Dis*, *193*, 106456. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2024.106456>
- Reina, C. P., Zhong, X., & Pittman, R. N. (2010). Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum Mol Genet*, *19*(2), 235-249. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp482>
- Riess, O., Rub, U., Pastore, A., Bauer, P., & Schols, L. (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum*, *7*(2), 125-137. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0013-4>
- Ristori, G., Romano, S., Visconti, A., Cannoni, S., Spadaro, M., Frontali, M., Pontieri, F. E., Vanacore, N., & Salvetti, M. (2010). Riluzole in cerebellar ataxia: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Neurology*, *74*(10), 839-845. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d31e23>
- Romano, S., Coarelli, G., Marcotulli, C., Leonardi, L., Piccolo, F., Spadaro, M., Frontali, M., Ferraldeschi, M., Vulpiani, M. C., Ponzelli, F., Salvetti, M., Orzi, F., Petrucci, A., Vanacore, N., Casali, C., & Ristori, G. (2015). Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, *14*(10), 985-991. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00201-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00201-X)
- Rosenberg, R. N., Nyhan, W. L., Bay, C., & Shore, P. (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology*, *26*(8), 703-714. <https://doi.org/10.1212/wnl.26.8.703>
- Rub, U., de Vos, R. A., Brunt, E. R., Schultz, C., Paulson, H., Del Tredici, K., & Braak, H. (2002). Degeneration of the external cuneate nucleus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Brain Res*, *953*(1-2), 126-134. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03278-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03278-x)
- Rub, U., de Vos, R. A., Schultz, C., Brunt, E. R., Paulson, H., & Braak, H. (2002). Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus. *Brain*, *125*(Pt 9), 2115-2124. <https://doi.org/10.1093/brain/awf208>
- Rub, U., Schols, L., Paulson, H., Auburger, G., Kermer, P., Jen, J. C., Seidel, K., Korf, H. W., & Deller, T. (2013). Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog Neurobiol*, *104*, 38-66. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.01.001>
- Sahrai, H., Norouzi, A., Hamzehzadeh, S., Majdi, A., Kahfi-Ghaneh, R., & Sadigh-Eteghad, S. (2023). SIMOA-based analysis of plasma NFL levels in MCI and AD patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol*, *23*(1), 331. <https://doi.org/10.1186/s12883-023-03377-2>
- Santana, M. M., Gaspar, L. S., Pinto, M. M., Silva, P., Adao, D., Pereira, D., Ribeiro, J. A., Cunha, I., Huebener-Schmid, J., Raposo, M., Ferreira, A. F., Faber, J., Kuhs, S.,

- Garcia-Moreno, H., Reetz, K., Thieme, A., Infante, J., van de Warrenburg, B. P. C., Giunti, P.,...European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative Study, G. (2023). A standardised protocol for blood and cerebrospinal fluid collection and processing for biomarker research in ataxia. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 49(2), e12892. <https://doi.org/10.1111/nan.12892>
- Saute, J. A. M., & Jardim, L. B. (2016). Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia. *Lancet Neurol*, 15(8), 788-789. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00128-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00128-9)
- Saute, J. A. M., & Jardim, L. B. (2018). Planning Future Clinical Trials for Machado-Joseph Disease. *Adv Exp Med Biol*, 1049, 321-348. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_17)
- Schmidt, J., Schmidt, T., Golla, M., Lehmann, L., Weber, J. J., Hubener-Schmid, J., & Riess, O. (2016). In vivo assessment of riluzole as a potential therapeutic drug for spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurochem*, 138(1), 150-162. <https://doi.org/10.1111/jnc.13606>
- Schmidt, T., Landwehrmeyer, G. B., Schmitt, I., Trottier, Y., Auburger, G., Laccone, F., Klockgether, T., Volpel, M., Epplen, J. T., Schols, L., & Riess, O. (1998). An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol*, 8(4), 669-679. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1998.tb00193.x>
- Schmidt, U., Hulkkonen, J., & Naue, J. (2016). Detection of a G>C single nucleotide polymorphism within a repetitive DNA sequence by high-resolution DNA melting. *Int J Legal Med*, 130(5), 1181-1184. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1350-3>
- Schmitt, I., Linden, M., Khazneh, H., Evert, B. O., Breuer, P., Klockgether, T., & Wuellner, U. (2007). Inactivation of the mouse Atxn3 (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(3), 734-739. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.062>
- Schmitz-Hubsch, T., du Montcel, S. T., Baliko, L., Berciano, J., Boesch, S., Depondt, C., Giunti, P., Globas, C., Infante, J., Kang, J. S., Kremer, B., Mariotti, C., Melegh, B., Pandolfo, M., Rakowicz, M., Ribai, P., Rola, R., Schols, L., Szymanski, S.,...Fancellu, R. (2006). Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*, 66(11), 1717-1720. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000219042.60538.92>
- Schols, L., Amoiridis, G., Buttner, T., Przuntek, H., Epplen, J. T., & Riess, O. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol*, 42(6), 924-932. <https://doi.org/10.1002/ana.410420615>
- Schouwstra, K. J., Polet, S. S., Hbrahimgel, S., Tadema, A. S., Burgerhof, J. G. M., Brandsma, R., & Sival, D. A. (2022). Application of the Scale for Assessment and Rating of Ataxia in toddlers. *Eur J Paediatr Neurol*, 40, 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2022.07.001>
- Schulz, J. B., Borkert, J., Wolf, S., Schmitz-Hubsch, T., Rakowicz, M., Mariotti, C., Schols, L., Timmann, D., van de Warrenburg, B., Durr, A., Pandolfo, M., Kang, J. S., Mandly, A. G., Nagele, T., Grisoli, M., Boguslawska, R., Bauer, P., Klockgether,

- T., & Hauser, T. K. (2010). Visualization, quantification and correlation of brain atrophy with clinical symptoms in spinocerebellar ataxia types 1, 3 and 6. *Neuroimage*, *49*(1), 158-168.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.07.027>
- Seidel, K., Siswanto, S., Brunt, E. R., den Dunnen, W., Korf, H. W., & Rub, U. (2012). Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol*, *124*(1), 1-21.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-012-1000-x>
- Seidel, K., Siswanto, S., Fredrich, M., Bouzrou, M., Brunt, E. R., van Leeuwen, F. W., Kampinga, H. H., Korf, H. W., Rub, U., & den Dunnen, W. F. (2016). Polyglutamine aggregation in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 3: similar mechanisms in aggregate formation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *42*(2), 153-166. <https://doi.org/10.1111/nan.12253>
- Semaka, A., Kay, C., Doty, C., Collins, J. A., Bijlsma, E. K., Richards, F., Goldberg, Y. P., & Hayden, M. R. (2013). CAG size-specific risk estimates for intermediate allele repeat instability in Huntington disease. *J Med Genet*, *50*(10), 696-703.  
<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101796>
- Sequeiros, J., & Coutinho, P. (1993). Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Adv Neurol*, *61*, 139-153.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8421964>
- Shang, X. J., Xu, H. L., Yang, J. S., Chen, P. P., Lin, M. T., Qian, M. Z., Lin, H. X., Chen, X. P., Chen, Y. C., Jiang, B., Chen, Y. J., Chen, W. J., Wang, N., Zhou, Z. M., & Gan, S. R. (2018). Homozygote of spinocerebellar Ataxia type 3 correlating with severe phenotype based on analyses of clinical features. *J Neurol Sci*, *390*, 111-114.  
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.04.026>
- Silveira, I., Manaia, A., Melki, J., Magarino, C., Lunke, A., Hernandez, A., Gispert, S., Burlet, P., Rozet, J. M., Coutinho, P., & et al. (1993). Machado-Joseph disease is genetically different from Holguin dominant ataxia (SCA2). *Genomics*, *17*(3), 556-559. <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1371>
- Silveira, I., Miranda, C., Guimaraes, L., Moreira, M. C., Alonso, I., Mendonca, P., Ferro, A., Pinto-Basto, J., Coelho, J., Ferreirinha, F., Poirier, J., Parreira, E., Vale, J., Janeiro, C., Barbot, C., Tuna, A., Barros, J., Koide, R., Tsuji, S.,...Sequeiros, J. (2002). Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG)<sub>n</sub> allele at the SCA17 locus. *Arch Neurol*, *59*(4), 623-629.  
<https://doi.org/10.1001/archneur.59.4.623>
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, *5*(6), 463-466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
- Sturm, D. J. (2021). *Analyse der Rolle von Einzelnukleotid-Polymorphysmen im Ataxin-3- und PARK2-Gen in der Spinocerebellären Ataxie Typ 3* [Eberhard-Karls-Universität Tübingen]. Tübingen.
- Sudarsky, L., & Coutinho, P. (1995). Machado-Joseph disease. *Clin Neurosci*, *3*(1), 17-22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7614089>
- Takano, H., Cancel, G., Ikeuchi, T., Lorenzetti, D., Mawad, R., Stevanin, G., Didierjean, O., Durr, A., Oyake, M., Shimohata, T., Sasaki, R., Koide, R., Igarashi, S., Hayashi, S., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Zoghbi, H., Brice, A., & Tsuji, S. (1998). Close associations between prevalences of dominantly inherited

- spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *Am J Hum Genet*, 63(4), 1060-1066. <https://doi.org/10.1086/302067>
- Takiyama, Y., Sakoe, K., Nakano, I., & Nishizawa, M. (1997). Machado-Joseph disease: cerebellar ataxia and autonomic dysfunction in a patient with the shortest known expanded allele (56 CAG repeat units) of the MJD1 gene. *Neurology*, 49(2), 604-606. <https://doi.org/10.1212/wnl.49.2.604>
- Temple, R. (1999). Are surrogate markers adequate to assess cardiovascular disease drugs? *JAMA*, 282(8), 790-795. <https://doi.org/10.1001/jama.282.8.790>
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 19(1), 94-102. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.94>
- Tu, Y., Liu, H., Zhu, X., Shen, H., Ma, X., Wang, F., Huang, M., Gong, J., Li, X., Wang, Y., Guo, C., & Tang, T. S. (2017). Ataxin-3 promotes genome integrity by stabilizing Chk1. *Nucleic Acids Res*, 45(8), 4532-4549. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx095>
- Tuite, P. J., Rogaeva, E. A., St George-Hyslop, P. H., & Lang, A. E. (1995). Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Ann Neurol*, 38(4), 684-687. <https://doi.org/10.1002/ana.410380422>
- van Alfen, N., Sinke, R. J., Zwarts, M. J., Gabreels-Festen, A., Praamstra, P., Kremer, B. P., & Horstink, M. W. (2001). Intermediate CAG repeat lengths (53,54) for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. *Ann Neurol*, 49(6), 805-807. <https://doi.org/10.1002/ana.1089>
- van de Warrenburg, B. P., Sinke, R. J., Verschuuren-Bemelmans, C. C., Scheffer, H., Brunt, E. R., Ippel, P. F., Maat-Kievit, J. A., Dooijes, D., Notermans, N. C., Lindhout, D., Knoers, N. V., & Kremer, H. P. (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology*, 58(5), 702-708. <https://doi.org/10.1212/wnl.58.5.702>
- Wan, N., Chen, Z., Wan, L., Tang, B., & Jiang, H. (2020). MR Imaging of SCA3/MJD. *Front Neurosci*, 14, 749. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00749>
- Weir, D. W., Sturrock, A., & Leavitt, B. R. (2011). Development of biomarkers for Huntington's disease. *Lancet Neurol*, 10(6), 573-590. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70070-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70070-9)
- Weishaupt, D., Schneider, J., Peixoto Pinheiro, B., Ruess, C., Dold, S. M., von Zweydford, F., Gloeckner, C. J., Schmidt, J., Riess, O., & Schmidt, T. (2019). Physiological and pathophysiological characteristics of ataxin-3 isoforms. *J Biol Chem*, 294(2), 644-661. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005801>
- Wellington, C. L., Singaraja, R., Ellerby, L., Savill, J., Roy, S., Leavitt, B., Cattaneo, E., Hackam, A., Sharp, A., Thornberry, N., Nicholson, D. W., Bredesen, D. E., & Hayden, M. R. (2000). Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *J Biol Chem*, 275(26), 19831-19838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001475200>
- Weyer, A., Abele, M., Schmitz-Hubsch, T., Schoch, B., Frings, M., Timmann, D., & Klockgether, T. (2007). Reliability and validity of the scale for the assessment

- and rating of ataxia: a study in 64 ataxia patients. *Mov Disord*, 22(11), 1633-1637. <https://doi.org/10.1002/mds.21544>
- Wild, E. J., Boggio, R., Langbehn, D., Robertson, N., Haider, S., Miller, J. R., Zetterberg, H., Leavitt, B. R., Kuhn, R., Tabrizi, S. J., Macdonald, D., & Weiss, A. (2015). Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients. *J Clin Invest*, 125(5), 1979-1986. <https://doi.org/10.1172/JCI80743>
- Wilke, C., Bender, F., Hayer, S. N., Brockmann, K., Schols, L., Kuhle, J., & Synofzik, M. (2018). Serum neurofilament light is increased in multiple system atrophy of cerebellar type and in repeat-expansion spinocerebellar ataxias: a pilot study. *J Neurol*, 265(7), 1618-1624. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8893-9>
- Wilke, C., Haas, E., Reetz, K., Faber, J., Garcia-Moreno, H., Santana, M. M., van de Warrenburg, B., Hengel, H., Lima, M., Filla, A., Durr, A., Melegh, B., Masciullo, M., Infante, J., Giunti, P., Neumann, M., de Vries, J., Pereira de Almeida, L., Rakowicz, M.,...Synofzik, M. (2020). Neurofilaments in spinocerebellar ataxia type 3: blood biomarkers at the preataxic and ataxic stage in humans and mice. *EMBO Mol Med*, 12(7), e11803. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911803>
- Wu, Y. L., Chang, J. C., Sun, H. L., Cheng, W. L., Yen, Y. P., Lin, Y. S., Chao, Y. C., Liu, K. H., Huang, C. S., Liu, K. L., & Liu, C. S. (2022). Coenzyme Q10 Supplementation Increases Removal of the ATXN3 Polyglutamine Repeat, Reducing Cerebellar Degeneration and Improving Motor Dysfunction in Murine Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Nutrients*, 14(17). <https://doi.org/10.3390/nu14173593>
- [www.ataxia-study-group.net/html/studies/esmi](http://www.ataxia-study-group.net/html/studies/esmi). (2024). [www.ataxia-study-group.net/html/studies/esmi](http://www.ataxia-study-group.net/html/studies/esmi). Retrieved 09.03 from [www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker](http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker). (2024). <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker>". Retrieved 06.03 from [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov). (2024). [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov). Retrieved 06.03 from [www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi](http://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi). (2024). [www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi](http://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi). Retrieved 09.03 from
- Xu, H. L., Su, Q. N., Shang, X. J., Sikandar, A., Lin, M. T., Wang, N., Lin, H., & Gan, S. R. (2019). The influence of initial symptoms on phenotypes in spinocerebellar ataxia type 3. *Mol Genet Genomic Med*, 7(7), e00719. <https://doi.org/10.1002/mgg3.719>
- Yamada, M., Sato, T., Tsuji, S., & Takahashi, H. (2008). CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*, 115(1), 71-86. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0287-5>
- Zhang, Y., & Hunter, T. (2014). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int J Cancer*, 134(5), 1013-1023. <https://doi.org/10.1002/ijc.28226>

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in dem Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik unter Betreuung von Herr Prof. Dr.med. Olaf Rieß durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau PD Dr. rer.nat. Jannette Hübener-Schmid (Arbeitsgruppenleiterin AG Biomarker, Universität Tübingen). Die demographische und klinische Datenerhebung sowie die Kollektion der Blutproben wurde von den involvierten ESMI-Zentren Tübingen, Bonn, Nijmegen, Groningen, London, Coimbra und Ponta Delgada (Azoren) übernommen.

Folgende Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau PD Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid von mir eigenständig durchgeführt: Von mir wurden eigenständig von 16 Probanden die DNA aus EDTA Vollblutproben isoliert. Für 15 Probanden habe ich eigenständig die SNP 1118 Genotyp bestimmt. Für 16 Probanden habe ich eigenständig den SNP 987 Genotyp bestimmt. Für 28 Probanden habe ich eigenständig den SNP 669 Genotyp bestimmt. Für 21 Probanden habe ich eigenständig den CAG-Repeat bestimmt. Die übrigen Daten zur Auswertung lagen bereits durch andere Mitglieder der AG Biomarker vor.

Die Daten für die Untersuchung der expandierten Ataxin-3 Level mit dem Simoa Assay wurden durch das NMI Reutlingen erhoben. Die Daten für die Untersuchung des expandierten Ataxin-3 Level mit dem Singulex Assay wurden durch die Firma Evotec (Hamburg) erhoben. Den TR-FRET für die Bestimmung des *full-length* Ataxin-3 mit dem n-Term Antikörper habe ich selbständig an 232 Proben durchgeführt, die übrigen Werten lagen bereits durch andere Mitarbeiter der AG Biomarker in der Arbeitsgruppe vor.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau PD Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid durch mich.

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

Tübingen, den 30.03.2025

Marie Heide

## 8 Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Herrn Professor Dr. med. Olaf Rieß bedanken, der mir diese spannende Promotion und die Mitarbeit an seinem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik ermöglicht hat.

Ich danke dem/ der 2. Prüfer/in für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation.

Ich danke allen SCA3 Patienten und ihren Angehörigen und den Teilnehmern des ESMI Projekts für ihre Teilnahme, sowie die Bereitstellung Ihrer Daten und Biomaterialien. Auch den ESMI Zentren möchte ich für den Versand der Proben und Übermittlung der Patientendaten danken.

Ich bedanke mich bei dem Labor Team in der Nägelestraße 5, für die herzliche Aufnahme und den Austausch während der Laborarbeit.

Ich danke dem IZKF Promotionskolleg Tübingen, dass diese Promotion durch ein Stipendium mitunterstützt hat.

Ich bedanke mich ganz besonders bei Frau PD Dr. rer.nat. Jeannette Hübener-Schmid, für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die wirklich einzigartige Betreuung, sowohl der Laborarbeit als auch der Begleitung des Schreibprozesses dieser Arbeit. Die Betreuung war fachlich wie menschlich hervorragend und mein besonderer Dank gilt ihrer Geduld und ihrem Feedback während des Schreibprozesses. Danke für diesen Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten!

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die immer hinter mir standen und mir so viel ermöglicht haben.