

**Zwischenbericht** für das von der Hilde-Ulrich-Stiftung geförderte Projekt

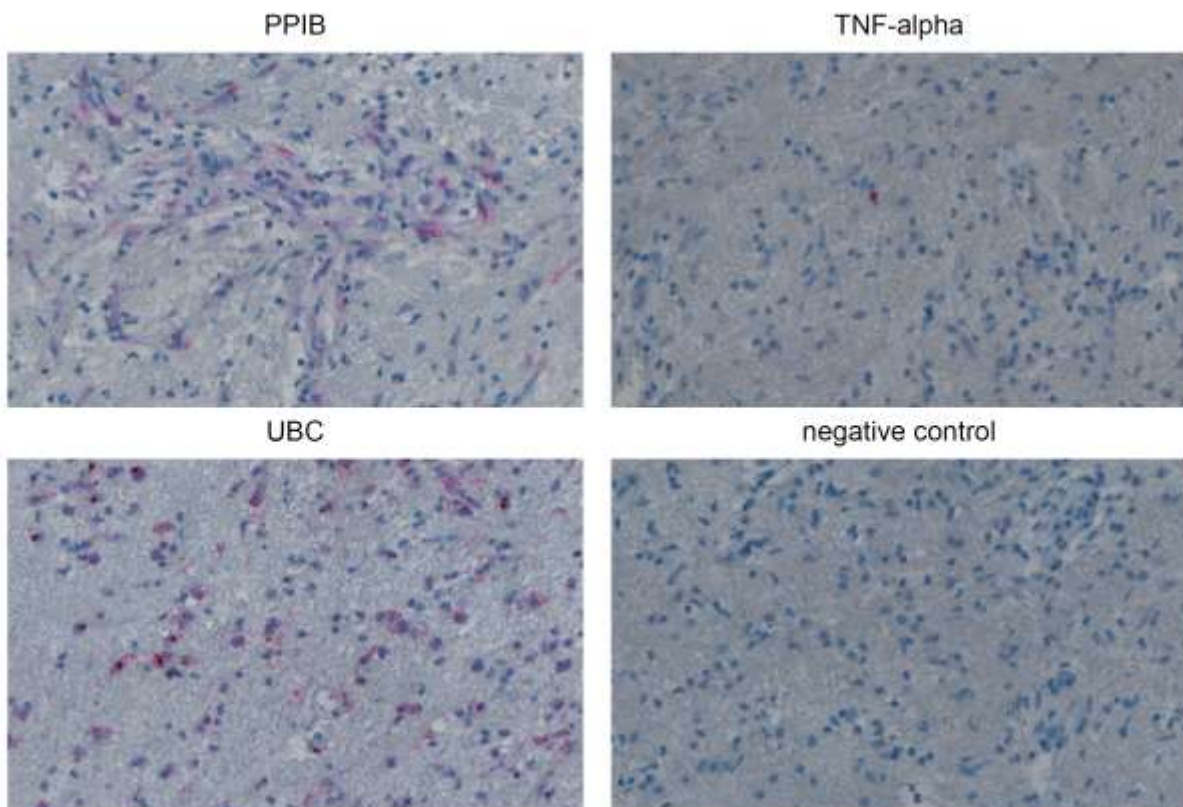
**Identifizierung molekularer Pathomechanismen und deren Validierung mit Hilfe von in vivo Biomarkern in der DeNoPa-Kohorte**

**Antragssteller:** Prof. Dr. Brit Mollenhauer, Dr. Michael Bartl und Dr. Jonas Franz

Universitätsmedizin Göttingen und Paracelsus-Elena-Klinik, Kassel

Wie in unserem Projektantrag vorgeschlagen haben wir den letzten Monaten genutzt um die in-situ Hybridisierung zum Nachweis von RNA mittels RNAscope® zunächst von TNF- $\alpha$  zu etablieren. Dieser Biomarker gehört zur Gruppe der Zytokine und dient in pathologischen Untersuchungen dem Nachweis entzündlicher Aktivität. Initial führten wir das Verfahren am Gewebe eines Abszesses, mit nachweislich hoher Entzündungsreaktion als Positiv-Kontrolle durch (Abbildung 1). Wir etablierten so die RNAscope® Technologie mittels Positivkontrolle (PPIB und UBC als Marker für RNA Integrität). Diese Proteine werden in fast allen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert. Die Signalintensität reicht aus, um die Verteilung der spezifischen RNA des Zielproteines nachzuweisen. Im nächsten Schritt werden gerade Hirnschnitte von Parkinsonpatienten aus der DeNoPa Kohorte untersucht. Zielregion ist primär der Gyrus cinguli.

**Abbildung 1:** In-situ Hybridisierung mit der RNA-Scope Technik, die Abbildungen zeigen angefärbte Hirnschnitte aus dem Gyrus cinguli eines Parkinsonpatienten. PPIB und UBC werden in den meisten Körperzellen exprimiert und dienen als Positivkontrollen. TNF- $\alpha$  ist ein klassischer Marker für Entzündungsaktivität.



Erfreulicherweise konnten 3 weitere Spenderhirne im Förderzeitraum gewonnen werden, so dass nunmehr 25 Gehirne für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Auch die Analysen der im Antrag erwähnten Biomarker Multiplexverfahren im Blut der Probanden der DeNopa Kohorte sind vorangetrieben worden und zeigen für die SOMAlogic® Analysen ein weitestgehend kongruentes Bild der hoch- und herunterregulierten Markerproteine ähnlich wie bereits mit dem proximity ligation assay (OLINK®, insbesondere ALCAM, Notch und Prothrombin, Abbildung siehe unten), so dass dies als robustes Signal und zur Validierung herangezogen werden kann. Dies bestätigt weiterhin Hinweise aus der aktuellen wissenschaftlichen Literatur, dass eine erhöhte Aktivität entzündlicher zellulärer und humoraler Bestandteile bei der Parkinsonerkrankung eine Rolle spielt und sich Auffälligkeiten hinsichtlich verschiedener Proteine zeigen, die zum einen ein erniedrigtes Risiko für Herz- Kreislaferkrankungen signalisieren, aber auch ein erhöhtes Risiko für Thrombosen und hiermit verwandte Erkrankungen. Dies wird auch die nächsten Schritte der Hirnanalysen bestimmen, wo wir planen, auf Grundlage der Voruntersuchungen mit weiteren Sonden u.a. folgende RNA zu untersuchen:

Interleukin-6 (Hs-IL6-C2): Inflammatorischer Marker, korrelierte in Kohortenstudien mit der Krankheitsaktivität bei Parkinsonpatienten

Hs-MMP3-C2: Protein der Extrazellulären Matrix, zeigte sich herunterreguliert bei Parkinsonpatienten, spielt eine Rolle bei der Ausbildung von Atherosklerose

TNFSF11-O1: Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie, erweiterte Marker der Aktivität von TNF- $\alpha$

Dies sind etablierte Marker, die als Sonden zur Hybridisierung mit RNA scope zur Verfügung stehen. Sie erweitern konsequent das bisher durchgeführte Untersuchungsschema.

Weiterhin werden die standardisierten Untersuchungsprotokolle der histopathologischen Klassifikation der Spenderhirne angewendet, um die Ergebnisse der Biomarkeruntersuchungen und der In-Situ Hybridisierung mit diesen zu korrelieren.