

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Rostock
Direktor: Professor Dr. med. A. Wree

**„Qualitative und quantitative Analyse der Huntingtin-
Aggregatbildung
im transgenen Chorea-Huntington-Rattenmodell BACHD TG22“**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Franz Joseph Dieckmann, geb. 20.01.1990 in Schwerin
Rostock, 2018

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Wree

2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Tiedge

3. Gutachter: Prof. Dr. med. O. Rieß

Datum der Verteidigung: 19.03.2019

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Klinik	1
1.2. Vererbung und Genetik	2
1.3. Neuropathologie	4
1.3.1. Makroskopische und mikroskopische Pathologie	4
1.3.2. Gliose	5
1.3.3. Vonsattel-Klassifikation.....	5
1.3.4. Pathophysiologie choreatischer Symptome.....	7
1.4. Huntingtin Protein	10
1.4.1. Lokalisation von HTT	10
1.4.2. Physiologische Funktion von HTT.....	15
1.4.3. Autophagozytose und Abbau von HTT	16
1.5. HTT-Aggregate	18
1.5.1. Lokalisation im ZNS und subzelluläre Verteilung der Aggregate	18
1.5.2. Rolle der Aggregatsbildung für die Pathologie	19
1.5.3. Aggregatsbildung durch HTT-Fragmente	23
1.5.4. Struktur und Aggregationsmechanismus von HTT-Einschlüssen	23
1.6. Tiermodelle von HD	25
1.6.1. HD-Modelle in wirbellosen Tieren	26
1.6.2. HD-Mausmodelle	26
1.6.3. HD Modelle großer Säugetiere.....	31
1.6.4. HD-Rattenmodelle	32
1.6.5. Verhaltenstests von TG22-Ratten	41
1.7. Fragestellung dieser Arbeit	43
2. MATERIALIEN UND METHODEN	44
2.1. Materialien	44
2.1.1. Chemikalien	44
2.1.2. Lösungen	45
2.1.3. Antikörper	47
2.1.4. Geräte	48

2.2. Methoden	48
2.2.1. Erstellung transgener Ratten	48
2.2.2. Haltung der Tiere	49
2.2.3. Genotypisierung	49
2.2.4. Tötung der Ratten und Fixierung der Gehirne.....	50
2.2.5. SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot.....	51
2.2.6. Erstellung von Gefrierschnitten.....	51
2.2.7. Immunhistochemie	52
2.2.8. Erstellung lichtmikroskopischer Bilder	52
2.2.9. Automatische Auswertung der Immunhistologie	52
2.2.10. Statistische Auswertung	53
3. ERGEBNISSE	54
3.1. Körpergewicht	54
3.2. Hirngewicht	55
3.3. Genotypisierung	56
3.4. Western-Blot	57
3.5. Immunhistochemie	59
3.5.1. Qualitative Auswertung der Huntingtin-Aggregate	59
3.5.2. Quantitative Auswertung der Huntingtin-Aggregate.....	64
4. DISKUSSION	66
4.1. Körpergewicht	66
4.2. Hirngewicht	67
4.3. Expression von HTT	69
4.4. Bildung von HTT-Aggregaten	70
4.5. Zusammenfassung und Ausblick	76
5. ANHANG	78
5.1. Thesen	80
5.2. Selbstständigkeitserklärung	81

5.3. Lebenslauf..... Error! Bookmark not defined.

6. LITERATURVERZEICHNIS 82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neuronenuntergang und Astrogliose 6

Abbildung 2: Darstellung der makroskopischen Pathologie in HD Patienten..... 7

Abbildung 3: Schematische 8

Abbildung 4: IHC Färbung mit AK S830 des cingulären Cortex eines HD-Patienten 19

Abbildung 5: Aggregationsmechnismus von HTT 25

Abbildung 6: Expression vom mutiertem HTT als Vielfache des endogenen HTT in den existierenden BACHD-Linien..... 41

Abbildung 7: Testung der motorischen Funktion von TG22-Ratten verglichen mit Wildtyp-Tieren..... 42

Abbildung 8: Automatische Erkennung von Einschlusskörperchen im Gyrus dentatus einer 15 Monate alten Ratte..... 53

Abbildung 9: Entwicklung des Körpergewichts der BACHD-Ratten gegenüber den Wildtyp-Tieren..... 54

Abbildung 10: Hirngewichte der BACHD-Ratten verglichen mit Wildtyp-Tieren..... 56

Abbildung 11: PCR von zwei transgenen (links) und zwei Wildtyp (rechts) Ratten. 57

Abbildung 12: Western-Blot mit dem AK MAB2166 verschiedener Hirnregionen einer Wildtyp (links) und einer transgenen (rechts) Ratte 58

Abbildung 13: Western-Blot mit dem AK S830 verschiedener Hirnregionen einer Wildtyp (links) und einer transgenen (rechts) Ratte 59

Abbildung 14: IHC-Färbungen mit dem AK S830 des Gyrus dentatus von Wildtyp (links) und transgenen (rechts) Tieren verschiedenen Alters..... 60

Abbildung 15: IHC-Färbungen mit dem AK S830 verschiedener Hirnregionen einer 15 Monate alten transgenen Ratte. 61

Abbildung 16: IHC-Färbung des Cortex einer Ratte mit dem AK S830 62

Abbildung 17: IHC-Färbung mit dem AK S830 vom Ncl. accumbens eines transgenen Tieres	63
Abbildung 18: IHC-Färbungen mit dem AK S830 einer BACHD-Ratte der TG5-Linie	64
Abbildung 19: Durchschnittliche Anzahl von Einschlusskörperchen je Sichtfeld im Gyrus dentatus 15 Monate alter Ratten	65
Abbildung 20: Durchschnittliche Fläche von Einschlusskörperchen im Gyrus dentatus 15 Monate alter Ratten	65
Abbildung 21: IHC-Färbung mit dem AK S830 von Bulbus (links) und Cerebellum (rechts) einer Ratte	73
Abbildung 22: IHC-Färbungen von TG22-Hirnschnitten mit verschiedenen HTT-Antikörpern.....	74
Abbildung 23: Filter Trap Assay zum Nachweis von Aggregaten in verschiedenen BACHD Ratten-Linien und Wildtyp-Kontrollen	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Expression von Wildtyp-HTT mit mutiertem HTT in verschiedenen Hirnregionen unterschiedlicher Spezies.....	12
Tabelle 3: Verteilung von HTT-Einschlusskörperchen im Gehirn von gesunden Menschen und HD-Patienten	21
Tabelle 3: Vergleich der wichtigsten HD Tiermodelle.....	35
Tabelle 5: Körpergewichte	78
Tabelle 6: Hirngewichte.....	78

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper	kB	Kilobyte
AS	Aminosäure	KG	Körpergewicht
BAC	bacterial artificial chromosome	LDS	lithium dodecyl sulfate
BDNF	brain derived neurotrophic factor	LM	Lebensmonat
bp	Basenpaare	LW	Lebenswoche
CAG	Cytosin Adenin Guanin	MRT	Magnetresonanztomografie

CBR	CREB binding protein	MSN	medium spiny neurons
CMV	Zytomegalievirus	Ncl.	Nucleus
CT	Computertomografie	NRSF	neuron restrictive silencing factor
DARPP 32	dopamine and cAMP regulated neuronal phosphoprotein, 32 kDa	Pat.	Patient
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol	PCR	polymerase chain reaction
ENK	Enkephalin	PET	Positronenemissionstomografie
ER	Endoplasmatisches Retikulum	PolyQ	Polyglutamin
FDG	Fluorodesoxyglucose	PSD 95	postsynaptic density protein 95
GABA	γ -Aminobuttersäure	PVDF	polyvinylidene difluoride
GRB 2	growth factor receptor bound protein 2	REST	receptor element 1 silencing transcription factor
HAP 1	huntingtin associated protein 1	RNA	Ribonukleinsäure
HD	huntington disease/ Morbus Huntington	SDS	Sodium dodecyl sulfate
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sp 1	specificity protein 1
HG	Hirngewicht	sup.	superior
HIP 1	huntingtin interacting protein 1	TAFII 130	TATA box binding protein associated factor II, 130 kDa
HTT	Huntingtin	TPB	TATA-box binding protein 1
IGF-1	insulin like growth factor 1	UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
IHC	Immunhistochemie	UV	ultra violett
inf.	inferior	WT	Wild-Typ
insb.	insbesondere	YAC	yeast artificial chromosome
IT 15	interesting transcript 15		

1. Einleitung

Chorea Huntington ist eine autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, die durch Störungen des motorischen Systems gekennzeichnet ist und je nach Schweregrad innerhalb von 15-20 Jahren nach Erstmanifestation zum Tod führt. Erstmals 1841 durch C.O. Watters beschrieben, ist sie nach dem amerikanischen Arzt George S. Huntington benannt worden.

Ausgelöst durch die Expansion des Basentriplets *CAG* innerhalb des Huntingtin Gens tritt die Erkrankung mit einer Prävalenz von 5,7/100 000 Einwohner auf. In Asien ist sie mit 0,4/100 000 Einwohner seltener zu finden (Pringsheim et al. 2012). Die Krankheit tritt bei beiden Geschlechtern gleichermaßen auf und manifestiert sich meist zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr, mit einem mittleren Erkrankungsalter um das 40. Lebensjahr. Die seltenere juvenile Form kann jedoch auch schon vor dem 20. Lebensjahr ausbrechen (Djousse et al. 2003).

1.1. Klinik

Die Symptomatik von Chorea Huntington imponiert zunächst mit überschießenden Bewegungsstörungen. Es zeigen sich auch psychiatrische Symptome, die dem eigentlichen Erkrankungsbeginn meist sogar noch vorausgehen. Des Weiteren sind Gewichtsabnahme, Störungen des zirkadianen Rhythmus und des autonomen Nervensystems zu beobachten. Die Erkrankten werden im Laufe der Zeit zunehmend pflegebedürftig und versterben im Mittel 15-20 Jahre nach Manifestation der Erkrankung (Bates et al. 2014). Die häufigsten Todesursachen sind Pneumonie, gefolgt von kardiovaskulären Ereignissen. Jedoch sind auch Suizide verglichen mit der Normalbevölkerung gehäuft zu beobachten (Lanska 1988; Sørensen und Fenger 1992; Di Maio et al. 1993).

Die ersten Einschränkungen der motorischen Fähigkeiten beginnen mit einer Bewegungsunruhe der Finger- und Zehenmuskeln. Im Verlauf der Erkrankung sind dann zunehmend auch proximalere Körperabschnitte betroffen. Typische Symptome sind hier blitzartig einschließende, hyperkinetische Bewegungen der distalen Extremitäten und der Gesichtsmuskulatur. Es kommt zu ungewollten schleudernden Bewegungen von Armen und Beinen, Grimassieren und der charakteristischen Chamäleonzunge, welche das schnelle Herausstrecken und Zurückziehen der Zunge bei einem weit geöffneten Mund beschreibt. Die Symptome sind unwillkürlich und sistieren im Schlaf. Im Laufe der Erkrankung zeigen sich

zunehmend Hypokinesien. Die Bewegungen werden verlangsamt, der Muskeltonus erhöht sich, die Bewegungen werden dyston, sodass die Patienten minuten- bis stundenlang in abnormen und zum Teil schmerzhaften Positionen verharren. Die hyper- und hypokinetischen Bewegungsmuster treten parallel zueinander auf, wobei der Progress individuell variieren kann. Die Krankheit geht jedoch schlussendlich immer in den hypokinetischen Zustand über. Des Weiteren besteht eine zunehmende Dysarthrie und Dysphagie, wodurch die Erkrankten am Ende verstummen und auf eine künstliche Ernährung angewiesen sind. Kleinhirnsyptome wie Dys- oder Hypermetrie kommen zwar nur vereinzelt vor. Dennoch zeigen die Betroffenen regelhaft einen ataktisches Gangbild (Roos, Raymund A C 2010).

Neben den motorischen Störungen zeigen sich auch zahlreiche psychiatrische Symptome, die unter einer subcortikalen Demenz ähnlich wie beim Morbus Parkinson zusammengefasst werden können: Meist gehen der Erkrankung psychopathologische Veränderungen, wie eine Einschränkung der Kognition und Störungen des Affekts voraus. Die Patienten sind oft gereizt, streitsüchtig oder auch ängstlich. Das Denken ist verlangsamt und das Kurzzeitgedächtnis beeinträchtigt. Es kommt mehr und mehr zum Verlust exekutiver Funktionen, was bedeutet, dass die Patienten nicht mehr flexibel zwischen verschiedenen Aufgaben oder Tätigkeiten wechseln können und zunehmend nicht mehr in der Lage sind, planvoll zu handeln. In 30-40 % der Fälle besteht zusätzlich eine Depression, in bis zu 50 % psychotische Symptome und circa 20 % leiden unter manischen Episoden (TURNER 2002; Zakzanis 1998).

1.2. Vererbung und Genetik

Die Ursache der Erkrankung beruht in einer Mutation des Gens für Huntingtin (*HTT*). Es ist in Position 4p16.3, also auf dem kurzen Arm (p) des Chromosom 4 lokalisiert. Der Genabschnitt ist 180kB lang und besteht aus 67 Exons. Nahe dem N-terminalen Ende des ersten Exons befindet sich eine für Glutamin codierende repetitive Sequenz der Basen *CAG* (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993). Bei Gesunden wiederholt sich das Basen-Triplett *CAG* 9 bis 35 mal. Wiederholungen von 36 bis 39 können, mehr als 40 Wiederholungen führen sicher zum Erkranken der betroffenen Personen. Die Anzahl der Wiederholungen korreliert mit dem Schweregrad und einem entsprechend früheren Erkrankungsalter. So sind bei der juvenilen Huntington Form 60 oder mehr *CAG* Repeats zu finden, womit ein Erkranken vor dem 20. Lebensjahr als sicher gilt. Ebenso ist eine inverse Abhängigkeit von der Anzahl der Wiederholungen zum Progress der Erkrankung zu beobachten (Andresen et al. 2007; Langbehn et al. 2010).

Vom Transkript des *HTT*-Gens sind eine Vielzahl unterschiedlicher Splicing-Varianten zu finden, deren Bedeutung bis heute wenig erforscht sind. Abgesehen von der längsten Isoform, welche vor allem in Hirn und Testis zu finden ist, sind die anderen Varianten meist nur in sehr geringer Menge im Körper auszumachen (Labadorf und Myers 2015; Lin et al. 1993). Für erkrankte Personen scheint jedoch auch das Exon-1 als Splicingprodukt von Bedeutung zu sein, welches sich im Mausmodell als hoch pathogen erwiesen hat (Sathasivam et al. 2013).

Trotz des dominanten Erbgangs werden in heterozygoten Merkmalsträgern sowohl das mutierte als auch das gesunde (sogenannte Wildtyp-) *HTT* exprimiert. Hierbei scheint die Transkription abhängig von der *CAG*-Repeatlänge vermindert abzulaufen, was zumindest in juveniler HD zu einer geringeren Expression des mutierten *HTT* Protein führt (Ambrose et al. 1994; Gutekunst et al. 1995; Schilling et al. 1995; Evers et al. 2015). Homozygot erkrankte Personen sind sehr selten und zeigen gegenüber Heterozygoten zwar ein ähnliches Manifestationsalter, jedoch ist bei ihnen eine stärkere Symptomatik und ein beschleunigter Progress zu beobachten (Squitieri et al. 2003).

Wie auch in anderen Trinukleotid-Erkrankungen z. B. die Spinozerebellären Ataxien neigt die Poly-*CAG*-Sequenz in Chorea Huntington zur Kontraktion oder Expansion während des Replikationsvorganges, also dem Wegfall oder Einfügen mehrerer *CAG* Triplets. Besonders relevant ist hierbei die Expansion des *CAG*-Abschnitts, da dadurch das Phänomen der Antizipation auftritt. Dies bedeutet, dass es in der Tochtergeneration durch die zusätzlichen *CAG*-Wiederholungen zu einem früheren Erkrankungsalter und einer Agravierung der Erkrankung kommen kann. Während bei gesunden Personen (<40 *CAG* Repeats) in weniger als 1 % der Fälle eine Verlängerung der *CAG*-Wiederholungen zu beobachten ist, besteht bei HD Erkrankten eine ca. 70 %ige Mutationsrate des Genabschnittes. Die expandierten Gene werden jedoch fast ausschließlich über paternale Vererbung an die nächste Generation weitergegeben, wodurch sich erklärt, dass Fälle juveniler HD praktisch nur bei väterlicher Erkrankung auftreten (Kremer et al. 1995). Neben der meiotischen Instabilität kommt es auch während der Mitose zu *CAG*-Längen-Veränderungen, wodurch ein genetisches Mosaik entsteht. Interessanterweise fanden sich im Striatum von Patienten mit juveniler HD bis zu 13 *CAG*-Repeats mehr als in deren Cerebellum, welches kaum durch die Erkrankung beeinträchtigt wird (Telenius et al. 1994).

1.3. Neuropathologie

1.3.1. Makroskopische und mikroskopische Pathologie

Im makroskopischen Vergleich zwischen Gehirnen von HD-Patienten mit gesunden Kontrollen fällt zuerst eine globale Atrophie auf. Bei einer verminderten Gesamtmasse von 30 % sind dabei einzelne Bereiche besonders betroffen. Nach neueren Untersuchungen scheint die Atrophie noch vor Ausbruch der HD-Symptomatik in fast allen Hirnregionen zu beginnen (Rosas et al. 2003). Dabei schreitet der degenerative Prozess jedoch unterschiedlich schnell fort und trifft am stärksten Nucleus caudatus, Putamen und Globus pallidus, die eine um circa 50-60 % verringerte Masse aufweisen. Dies bildet das neuropathologische Korrelat der charakteristischen motorischen Störungen in HD (La Monte et al. 1988; Lange et al. 1976). Auch der Kortex, hier vor allem die Schichten V und VI, zeigt schon früh einen Volumenverlust, der bis zu 30 % des Ausgangsvolumens erreichen kann. Hierdurch lassen sich zumindest zum Teil die nicht-choreatischen Symptome wie Demenz, Persönlichkeitsveränderungen und Apathie erklären (Hedreen et al. 1991). Im Zusammenspiel mit den Verlusten im limbischen System (Amygdala, Hippocampus), die im finalen Stadium ebenfalls bis zu 30 % erreichen können, erklärt sich auch die häufige Assoziation mit Depressionen (La Monte et al. 1988). Auch weiße Hirnsubstanz, Thalamus, Substantia nigra und Cerebellum sind in unterschiedlichem Ausmaß ebenfalls von atrophischen Veränderungen betroffen (Rub et al. 2013; Oyanagi et al. 1989; La Monte et al. 1988). Betrachtet man die neuropathologischen Veränderungen in Abhängigkeit vom Erkrankungsalter und der Anzahl der *CAG*-Repeats fällt passend zur ausgeprägteren Symptomatik der Patienten mit juveniler HD und vielen *CAG* Wiederholungen auch eine stärkere Degeneration aller betroffenen Hirnregionen auf (Henley et al. 2009; Halliday et al. 1998).

Mikroskopische Untersuchungen striataler Regionen zeigen bereits im Stadium 0 einen bis zu 40 prozentigen Neuronenverlust im Kopf des Ncl. caudatus (Myers et al. 1991). Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass bereits in präsymptomatischen Patienten striatale Projektionen zum Globus pallidus externus und der Substantia nigra pars reticulata abnehmen (Albin et al. 1990; Albin et al. 1992). Im Krankheitsverlauf nimmt die Neuronenzahl dann immer weiter ab, bis sich im finalen Stadium gerade mal noch 5 % der ursprünglichen Nervenzellen im Striatum finden lassen. Der Zellverlust schreitet dabei vom Schwanz des Ncl. caudatus zu dessen Kopf und gleichzeitig von medial nach lateral fort. Ebenso findet sich im Putamen ein Progress von kaudal nach rostral (Vonsattel et al. 1985).

1.3.2. Gliose

Dass das Volumen der betroffenen Strukturen nicht in dem Umfang verloren geht, wie es aufgrund des Zellverlustes zu erwarten wäre, ist durch eine Vermehrung der Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia zu erklären. Die frühesten Veränderungen zeigen sich bereits präsymptomatisch durch die Zunahme der Oligodendrozytendichte. Im Schwanz des Ncl. caudatus ist fast die doppelte Menge der Gliazellen feststellbar (Gómez-Tortosa et al. 2001), wobei es im Krankheitsverlauf nur noch zu einer minimalen Zunahme vor allem in den lateralen Bereichen des Ncl. caudatus kommt (Myers et al. 1991).

Durch den Untergang der Neurone wird ab dem Stadium 1 eine reaktive Astrozytose in Gang gesetzt, die sich im Ncl. caudatus von medial Richtung Capsula interna ausbreitet und den Platz der apoptotisch gewordenen Nervenzellen einnimmt. Der Verlust der Neuronen beginnt in einem inhomogenen inselartigen Muster, das mit dem striatalen Striosomen-Matrix-System übereinstimmt. Besonders in den frühen Stadien sind die Astrozyten somit ebenfalls in den Striosomen lokalisiert. Erst später ist im gesamten Striatum eine diffuse eher homogene Astroglie zu beobachten (Hedreen und Folstein 1995). Auch die Mikrogliazellen sind schon vor dem Auftreten von Symptomen vermehrt und nehmen in späteren Verlauf immer weiter zu. Ob die inflammatorische Wirkung der aktivierten Gliazellen in Kortex, Striatum und Globus pallidus Einfluss auf die Pathologie der Erkrankung hat, ist jedoch unklar (Tai et al. 2007; Sapp et al. 2001; Myers et al. 1991). Auch wenn die Entzündungsreaktion vermutlich nicht Ursache der Erkrankung ist, scheint sie doch die degenerativen Prozesse zu beschleunigen (Möller 2010).

1.3.3. Vonsattel-Klassifikation

Zur Festlegung des Schweregrades von HD hat sich die Einteilung nach Vonsattel etabliert. Es handelt sich um eine Klassifikation nach pathologischen Kriterien für alle symptomatischen Patienten, ungeachtet ob ein genetischer Nachweis besteht. Beurteilt wurde der Umfang der makroskopischen und mikroskopischen Neuropathologie sowie das Ausmaß der Astroglie. Die Stadien sind wie folgt definiert (Vonsattel 2008); (Vonsattel et al. 1985) und in *Abbildung 2* grafisch dargestellt:

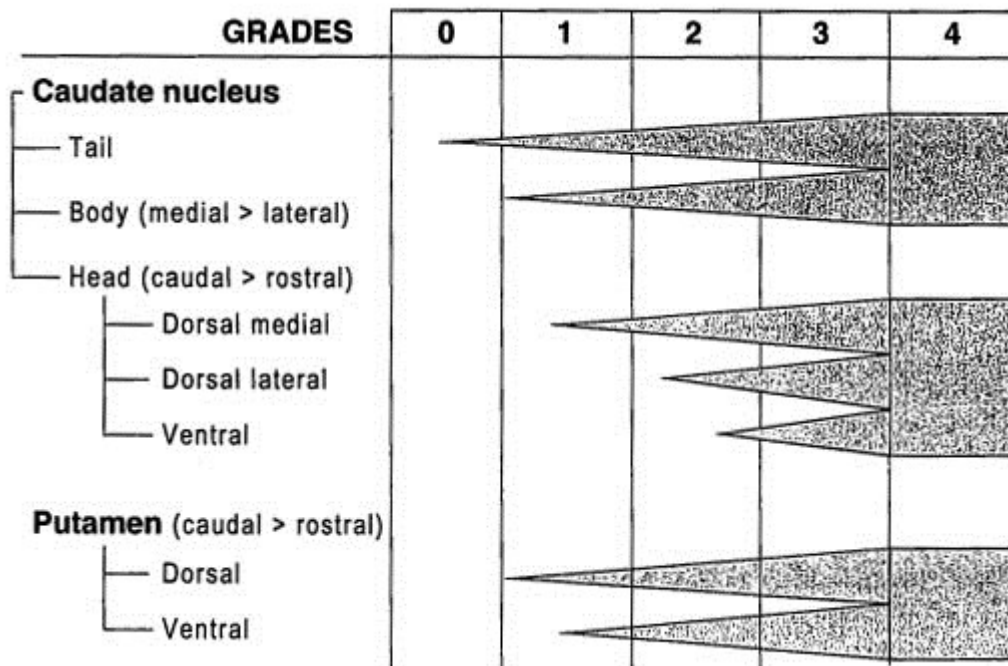


Abbildung 1: Neuronenuntergang und Astrogliose

Der Zellverlust beginnt im Schwanz des Ncl. caudatus und setzt sich Richtung Kopf fort. Neben dem caudo-rostralen Gradienten, der auch im Putamen wiederzufinden ist, ist auch ein medio-lateraler Gradient festzustellen (Vonsattel und DiFiglia 1998).

Grad 0: Bei starkem klinischem Verdacht auf HD sind in der makroskopischen Betrachtung keine pathologischen Veränderungen auffindbar. Während in älteren Beschreibungen auch mikroskopisch kein Unterschied feststellbar ist (Vonsattel et al. 1985), ist heute klar, dass der Kopf des Ncl. caudatus einen Neuronenverlust von bis zu 40 % aufweisen kann. Es lassen sich außerdem bereits vermehrt Oligodendrozyten finden (Gómez-Tortosa et al. 2001).

Grad 1: In der makroskopischen Betrachtung fällt eine leichte Atrophie von Schwanz und Körper des Ncl. caudatus auf. Diese findet ihr mikroskopisches Korrelat in einem neuronalen Verlust und einer moderaten Astrogliose besonders des Schwanzes, aber auch im Körper und dorsalem Kopf des Ncl. caudatus sowie dorsalem Putamen. Der Nervenzellverlust im Kopf des Ncl. caudatus beträgt mindestens 50 %.

Grad 2: Zeigt makroskopisch eine zunehmende Degeneration des gesamten Striatums. Kennzeichnend ist die leichte bis moderate Atrophie des Caput nucleii caudati, was zu einer Abnahme der Konvexität des Kerns und einer Zunahme der Ventrikelgröße führt. Der Globus pallidus erscheint unverändert. Astrogliose und Nervenzellverlust korrelieren mit dem makroskopischen Erscheinungsbild.

Grad 3: Der Kopf des Ncl. caudatus ist nicht mehr in den Ventrikel vorgewölbt oder leicht konkav eingezogen und stellt sich auf Höhe des Globus pallidus nur noch als eine dünne Linie

dar. Auch Putamen und Globus pallidus zeigen einen moderaten Volumenverlust. Es kommt im gesamten Striatum zu diffuser Astroglie und neuronalem Zellverlust. Der laterale Globus pallidus ist ebenfalls betroffen. Im medialen Teil findet sich keine oder nur eine geringe Affektion.

Grad 4: Das gesamte Striatum ist stark atrophisch, wobei der Kopf des Ncl. caudatus konkav eingewölbt ist. Der Globus pallidus weist nur noch 50 % des Ausgangsvolumens auf und der Ncl. accumbens ist verkleinert. Im Striatum findet sich massive diffuse Astroglie und ein Neuronenverlust von 95 % oder mehr. Eine makroskopische Darstellung der neuronalen Degeneration Grad 4 ist in *Abbildung 2* zu sehen.

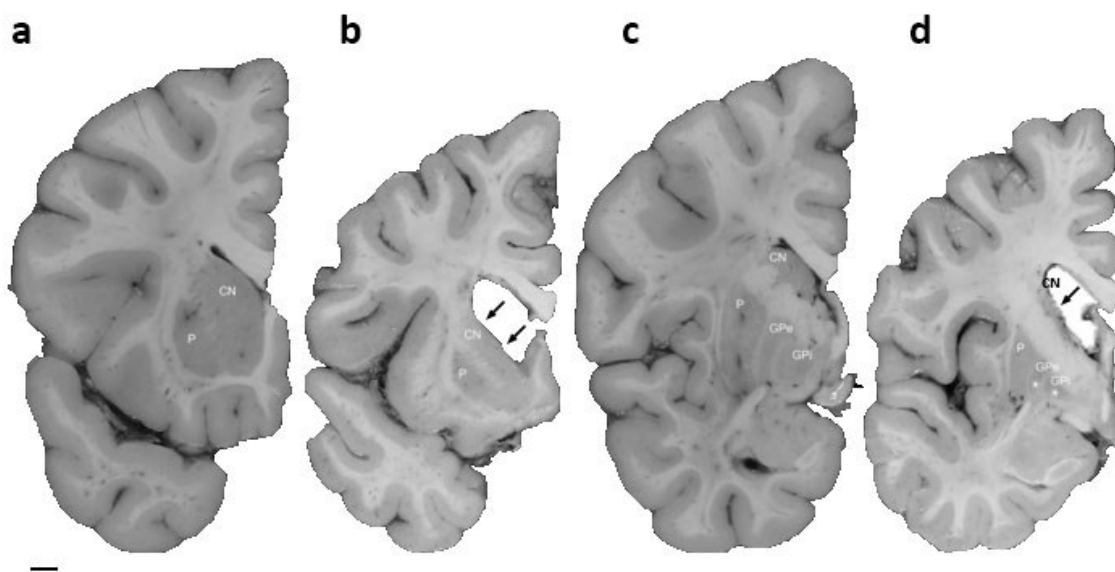


Abbildung 2: Darstellung der makroskopischen Pathologie in HD Patienten

Die Abbildung zeigt koronale Schnitte des Gehirns eines 35 Jahre alten männlichen HD-Patienten, Vonsattel –Grad 3/4 (b und d), die mit gesunden menschlichen Hirnschnitten verglichen werden (a und c).

a und b zeigen die linke Hemisphere auf Höhe des Ncl. accumbens, c und d auf Höhe des Globus pallidus.

Es besteht eine massive Atrophie des Ncl. caudatus (Pfeile) und Putamens sowie des Globus pallidus. Auch innerhalb des Cortex ist ein Volumenverlust sichtbar. CN= Ncl. caudatus, P= Putamen, GPe= Globus pallidus externus, GPi= Globus pallidus internus, Maßstabsbalken \cong 1cm

(Nguyen und Cenci 2015, S. 40)

1.3.4. Pathophysiologie choreatischer Symptome

Um die motorischen Störungen in Chorea Huntington verstehen zu können, sollte man zuerst die Physiologie der Basalganglienschleife betrachten:

Das Signal zur Muskelbewegung entsteht im motorischen Kortex und wird vor der Erregung des Erfolgsorgans durch die Basalganglien moduliert. Dies beginnt mit der Projektion auf das Striatum, welches aus Nucleus caudatus und Putamen besteht. Die hemmenden GABAergen Efferenzen zum Globus pallidus teilen sich von hier in zwei funktionell entgegengesetzte Systeme auf. Der direkte (exzitatorische) Weg, der durch die Hemmung der Pars interna des Globus pallidus eine verminderte Hemmung des ventrolateralen Thalamus nach sich zieht und den indirekten (inhibitorischen) Pfad, der durch die Hemmung des Globus pallidus pars externa zustande kommt. Dies führt zur Enthemmung des Nucleus subthalamicus, dessen Efferenzen glutamaterg erregend auf das Kerngebiet des Globus pallidus pars interna projizieren. Deren inhibitorische Signale senken somit die Aktivität des Thalamus, sodass eine Bewegungshemmung resultiert. Diese beiden Erregungsschleifen wirken sozusagen wie Zügel auf das Ausmaß der Bewegung und sind in *Abbildung 3* schematisch dargestellt (Trepel 2015, S. 209–210).

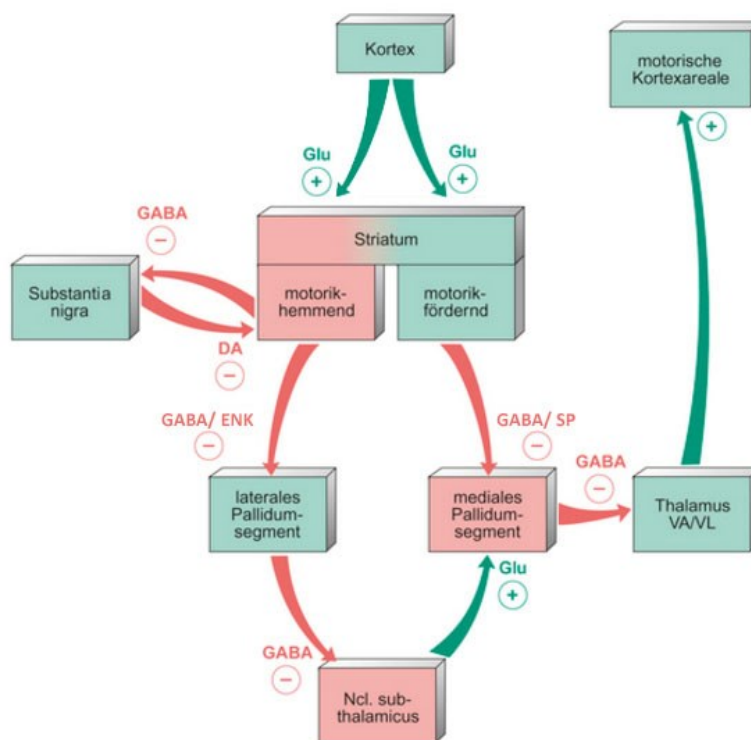


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Basalganglienschleife

Hemmende Projektionen sind in rot dargestellt, erregende Bahnen in grün. GABA= γ -Aminobuttersäure, Glu= Glutamat, DA= Dopamin, ENK= Enkephalin, SP= Substanz P
modifiziert aus (Trepel 2015, S. 209).

Betrachtet man die Morphologie der striatalen Neurone, so können 5 Subpopulationen nach ihrer Größe und der Menge an Dornfortsätzen am Dendriten unterschieden werden. Mit 80 % sind die „medium spiny neurons“ (MSN) die häufigsten Neurone im Striatum. Sie sind GABAerge Projektionsneurone mit einem Durchmesser des Zellkörpers von 15-20 μ m. Die Bezeichnung „spiny“ leitet sich von ihren großen Dendritenbäumen ab, welche zahlreiche

Dornfortsätze tragen. Über ihre langen Axone stellen sie die Verbindung des Striatums mit dem Globus Pallidus und Substantia nigra her (Vonsattel und DiFiglia 1998; Graveland et al. 1985). MSN lassen sich zudem nach den exprimierten Co-Transmittern unterscheiden, welche das Korrelat zum Beginn des direkten und indirekten Weges der Basalganglienschleife bilden. Während die einen auf den Globus pallidus internus (und Substantia nigra pars reticulata) projizieren und vorrangig Substanz P nachweisbar ist, haben die anderen Verbindungen zum Globus pallidus externus und werden vom Co-Transmitter Enkephalin dominiert.

In HD scheint eine erhöhte Vulnerabilität der ENK-haltigen Zellen zu bestehen, sodass es anfangs zum stärkeren Untergang der Neurone des indirekten, also des Motorik hemmenden Weges kommt. Folge sind die Chorea spezifischen überschießenden Bewegungen, die erst mit dem Verlust der SP-haltigen Zellen und damit dem Wegfall des direkten Pfades in Bradykinie und Rigidus übergehen (Reiner et al. 1988; Albin et al. 1992; Richfield et al. 1995; Deng et al. 2004). Injektionen des GABA-Antagonisten Bicucullin in den Globus pallidus externus von Affen führen ebenfalls zu choreaformen Bewegungsmustern und stützen damit diese Hypothese (Crossman et al. 1988).

Striosomen-Matrix-System

Das Striosomen-Matrix-System ist weiteres funktionelles System innerhalb des menschlichen Striatums (bzw. aller Säugetierstiata). Sein anatomisches Korrelat wurde erstmals durch die Färbung gegen Acetylcholinesterase sichtbar, welche im gesamten Striatum verteilte, fleckige Aussparungen hinterließ. Diese inselartigen Kompartimente sind die sogenannten Striosomen, die von der Matrix umschlossen werden (Graybiel und Ragsdale, JR 1978). Striosomen können auch durch eine Anzahl anderer neuronaler Marker sichtbar gemacht werden. Dazu gehören Enkephalin und Substanz P. Der Matrixbereich ist dagegen neben Acetylcholinesterase auch gegen Tyrosinhydroxylase, Somatostatin und Calbindin anfärbbar (Manley et al. 1994; Waldvogel und Faull 1993; Graybiel 1990). Interessanterweise scheint auch HTT hauptsächlich in den Matrixbereichen exprimiert zu werden (Ferrante et al. 1997). Betrachtet man die neuronalen Verknüpfungen beider Kompartimente, zeigt sich, dass die Zellen der Matrix topographisch geordnete Verbindungen zum sensomotorischem und assoziativem Kortex besitzen, während die Striosomen Bahnen vom limbischen System erhalten, die dann auf die dopaminergen Zellen der Substantia nigra pars compacta projizieren (Crittenden und Graybiel 2011).

In HD sind verschiedene Befallsmuster beschrieben, nach denen es vorrangig entweder zur Schädigung der Striosomen (Hedreen und Folstein 1995; Morton et al. 1993) oder der Matrixbereiche (Ferrante et al. 1987; Seto-Ohshima et al. 1988) kommt. Wahrscheinlich existieren für jeden Betroffenen sehr individuelle Verläufe, bei denen es entweder sehr früh zum Untergang der Striosomen kommt oder diese bis in hohe Stadien verschont bleiben, während es trotzdem zur Degeneration der Matrixbereiche kommt. Entsprechend lässt sich auch bei Patienten mit einem prioritären Untergang der Striosomen-Neurone klinisch eine Assoziation zu Veränderungen der Stimmung und Gefühlslage herstellen. Eine klare Korrelation zwischen dem vorrangigen Befall der Matrixbereiche und Bewegungsstörungen ist hingegen nicht nachweisbar. Vermutlich weil diese erst im späteren Verlauf betroffen und dann auch bereits andere Hirnbereiche geschädigt sind (Tippett et al. 2007).

1.4. Huntingtin Protein

1.4.1. Lokalisation von HTT

Seit bekannt ist, dass eine Veränderung im IT15 (Interesting Transcript 15) Gen für HD verantwortlich ist, steht das dafür kodierende Huntingtin-Protein im Fokus der Forschung. Huntingtin ist ein 3144 Aminosäuren langes, wasserlösliches Protein, welches ubiquitär im Körper exprimiert wird (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993). In den höchsten Konzentrationen ist es im neuronalen Gewebe zu finden, jedoch weisen besonders Testis, Ovar und ebenso zahlreiche andere Organe wie Herz, Lunge, Milz, Thymus, Leber, Pankreas und Darm unterschiedliche Mengen von HTT auf (Li et al. 1993; Hoogeveen et al. 1993; Trottier et al. 1995).

Betrachtet man die Verteilung im Gehirn, so ist HTT in allen Regionen zu finden. Besonders hohe Mengen sind im Kortex, den Pyramidenzellen und Gyrus dentatus des Hippocampus und in der Körnerzellschicht und Purkinjezellen des Cerebellum zu sehen. Interessanter Weise weisen die striatalen Strukturen, dem Ort der stärksten Pathologie, nur mittlere bis geringe Mengen an HTT auf. Auch der Globus pallidus und die Substantia nigra weisen ähnlich niedrige HTT-Konzentrationen auf. Besonders geringe HTT-Level sind in Hirnstamm, Rückenmark, weißer Hirnsubstanz und Gliazellen zu finden (Strong et al. 1993; Li et al. 1993; Landwehrmeyer et al. 1995; Sharp et al. 1995)

Vergleicht man diese Ergebnisse mit erkrankten Gehirnen fällt kein großer Unterschied in der Verteilung auf. Abweichungen sind vor allem im Striatum, dem Globus pallidus und Ncl. accumbens zu finden, verschwinden jedoch zumeist, wenn man die geringeren HTT-Mengen

um den Zellverlust korrigiert (Sapp et al. 1997; Landwehrmeyer et al. 1995; Li et al. 1993; Strong et al. 1993). Eine detaillierte Zusammenschau der unterschiedlichen Untersuchungen ist in *Error! Reference source not found.* dargestellt. Die naheliegende Vermutung, dass es abhängig von der HTT-Dosis zur Schädigung entsprechender Hirnareale kommt, lässt sich somit nicht bestätigen. Im Gegenteil bleiben gerade Hippocampus und Cerebellum bis in hohe Krankheitsstadien von der allgemeinen Hirnatrophie verschont.

Betrachtet man die Verteilung von HTT auf zellulärer Ebene, so ist es im gesunden Hirn im gesamten Zytosol zu finden. Innerhalb der Nuclei ist Wildtyp-HTT normalerweise nicht nachweisbar, konnte jedoch von (Hoogeveen et al. 1993) und in sehr seltenen Fällen auch von (Sapp et al. 1997) im Zellkern lokalisiert werden. Ebenso lässt es sich in den Zellkernen verschiedener Zellkulturen nachweisen, die Nucleoli bleiben dabei allerdings ausgespart (Rooij et al. 1996). Im Allgemeinen ist HTT innerhalb der Nervenzellen diffus verteilt, in einigen Veröffentlichungen konnte das Protein jedoch zusätzlich auch in einem punktförmigen Muster angefärbt werden (Sharp et al. 1995; Trottier et al. 1995), das sich eher perinukleär konzentrierte (Sapp et al. 1997). Neben der perinukleären Region lässt sich HTT außerdem in Dendriten und Axonen darstellen. Es findet sich in Assoziation zu Mikrotubuli und ist gehäuft an Varikositäten und Nervenenden auszumachen. In den Perikarya ist es vorrangig im Zytosol inmitten Bereiche freier Ribosomen zu finden, weniger am Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischem Retikulum. Weiterhin scheint es häufig um und an Vesikelmembranen lokalisiert zu sein (Trottier et al. 1995; Gutekunst et al. 1995; DiFiglia et al. 1995; Sharp et al. 1995).

Tabelle 1: Expression von Wildtyp-HTT und mutiertem HTT in verschiedenen Hirnregionen unterschiedlicher Spezies

Veränderungen im Expressionsmuster erkrankter gegenüber gesunder Individuen sind mit </> (geringere Expression/stärkere Expression) angegeben. Keine Angabe bei gleichem Verteilungsmuster.

Spezies	Nachweis	Expression von HTT							Bemerkung	Quelle	
		Striatum	Globus pallidus	Substantia nigra	Kortex	Cerebellum	Hippocampus	Thalamus			weitere
Mensch	Northern Blot	++ < bis << ⁽¹⁾			++	++ ⁽²⁾	+++ ⁽³⁾			(¹) HTT-Verlust korreliert wahrscheinlich mit Zellverlust (²) insb. Purkinjezellen, Körnerzellen (³) insb. Gyrus dentatus, hippocampale Pyramidenzellen	(Strong et al. 1993)
		+			+++	+++	+++ ⁽¹⁾	+		(¹) Gyrus dentatus +++, Cornu ammonis und Subiculum ++ - in HD-Pat. annähernd gleiches Expressionsmuster	(Li et al. 1993)

RNA In-situ-Hybridisierung	++ ⁽¹⁾ <<	+ >	++ ⁽²⁾	++ bis +++	+++ ⁽³⁾	+++ ⁽⁴⁾	+	+ bis ++ ⁽⁵⁾ —— ++ < ⁽⁶⁾ —— + ⁽⁷⁾ —— +/- ⁽⁸⁾	(1) striosomenähnliches Muster - geringere Intensität als Kortex oder Substantia nigra pars compacta - Unterschied in der HTT-Expression nur in HD Grad 2 bis 4 Pat., nicht in Grad 0 und 1, HTT Verlust korreliert mit dem Zellverlust (2) Substantia nigra p. comp. ++, S.n.p. reticul. + (3) Körnerzellen +++++, Kleinhirnerne ++ (4) insb. Körnerzellen d. Gyrus dentatus, etwas weniger Pyramidenzellen d. Cornu ammonis (5) Amygdala (6) Ncl. accumbens (7) Rückenmark (8) weiße Hirnsubstanz	(Landwehrmeyer et al. 1995)
Western Blot (AK AP81)	++ << ⁽¹⁾			++					(1) HTT-Verlust korreliert mit dem Zellverlust - in heterozygoten HD-Pat. mit langen CAG-Repeats ist das mutierte HTT in Striatum und Kortex geringer exprimiert als gesundes, in Hippocampus und Cerebellum in etwa gleich	(Schilling et al. 1995)
IHC (mAK 4C8, 2E8)	+	+	++ (1)	++ ⁽²⁾	++ ⁽³⁾				(1) Substantia nigra pars compacta +, Substantia nigra pars reticularis ++ (2) besonders Zellschicht IV und VI (3) Purkinjenzellschicht	(Trottier et al. 1995)
IHC (Ab585 AK)	++ ⁽¹⁾ < ⁽¹⁾⁽²⁾	++ < ⁽³⁾	++	++	++	++		+ ⁽⁴⁾	(1) striosomenähnliches Verteilungsmuster (2) reduziert im dorsomedialen Ncl. caudatus - HTT-Verlust korreliert mit dem Zellverlust (3) reduziert besonders im Globus pall. ext. (4) HTT in allen Hirnregionen nachweisbar - HTT vor allem zytoplasmisch, in Kortex und Glob. pall. eher perinukleär, normalerweise nicht intranukleär	(Sapp et al. 1997)

Mensch und Affe	IHC (AK gegen 549-679 AS)	+(¹)	++(²)		++(²)	++(²)				(¹) striosomenähnliches Verteilungsmuster (²) insb. große Neurone wie Pyramidenzellen - ähnliche Verteilung in Affe und Mensch - HTT in Perikarya, Dendriten, selten Axone, nicht im Nucleus	(Gute- kunst et al. 1995)
	IHC (C- termin. AK)	+	+	+	+				+(¹)	(¹) Ncl. subthalamicus - ähnliche Verteilung in Affe und Mensch - zytosolischer und intranukleärer Nachweis - auch in Gliazellen, Nachweis nur zytosolisch - in HD-Pat. annähernd gleiches Expressionsmuster	(Hoo- geveen et al. 1993)
	Western Blot(AP8 1 AK)	+			+++	+++	++	++	+(¹)	(¹) Hirnstamm	(Sharp et al. 1995)
	IHC (AP81 AK)	++			++	++				- HTT in gesamten Hirn nachweisbar - vor allem in Perikarya, auch Dendriten und Axone	
Ratte	Northern Blot	++			+++	+++	+++		+++(¹) ++(²) +(³)	(¹) Bulbus olfactorius (²) Hirnstamm (³) Rückenmark	(Li et al. 1993)
		+		+	+	+++ ⁽¹⁾	+++ ⁽²⁾	+	+ ⁽³⁾ + ⁽⁴⁾	(¹) insb. Körnerzellen (²) insb. Gyrus dentatus, hippocampale Pyramidenzellen (³) Colliculus sup./ inf. (⁴) Hirnstamm	(Strong et al. 1993)

1.4.2. Physiologische Funktion von HTT

Das HTT-Protein scheint bereits für die embryonale Entwicklung unerlässlich zu sein. Versuche mit Knock-out-Mäusen die nullizygot für das Wildtyp-Protein sind, führten noch während des 8,5. bis 10,5.-Gestationstages zum intrauterinen Versterben der Tiere (Nasir et al. 1995; Zeitlin et al. 1995). Besitzen diese Mäuse zusätzlich das Gen für mutiertes HTT, wird offensichtlich zumindest ein Teil der physiologischen HTT-Funktionen übernommen, sodass lebende Nachkommen geboren werden (van Raamsdonk et al. 2005).

Doch auch nach der Geburt ist HTT an zahlreichen Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt. Wie bereits oben beschrieben, lässt die Assoziation von HTT zu Mikrotubuli, Vesikeln und Nervenendigungen auf eine Rolle im zellulären Transport und der Endozytosefunktion schließen (Sharp et al. 1995; DiFiglia et al. 1995). In den Untersuchungen von (Velier et al. 1998) zeigte sich HTT übereinstimmend mit der Lokalisation von Clathrin im trans-Golgi-Apparat, zahlreichen Vesikeln im Zytosol und entlang der Plasmamembran. Zusammen mit HIP1 (huntingtin interacting protein 1) bildet es über das Verbindungsprotein AP2 einen Komplex mit Clathrin, welcher für die Endozytose in der Zelle nötig zu sein scheint (Waelter 2001; Metzler et al. 2001; Mishra et al. 2001). Durch die Interaktion mit dem Protein PACSIN 1 wird anschließend über die Aktivierung der Aktinpolymerisation das Abkapseln von Vesikeln ermöglicht (Modregger 2002).

Das Protein HAP1 (huntingtin associated protein 1), welches interessanter Weise ausschließlich von Neuronen exprimiert wird (Li et al. 1995), scheint in der Zelle den axonalen Transport entlang der Mikrotubuli zu vermitteln. Es interagiert direkt oder indirekt mit Motorproteinen des anterograden (McGuire et al. 2006) und retrograden (Engelender et al. 1997) Transportes. Bindet sich mutiertes HTT an HAP1 sinkt die Affinität zu Dynactin p150Glued, welches für die Vermittlung an die Motorproteine notwendig ist. Hierdurch kommt es z. B. zum gestörten Transport von BDNF (brain-derived neurotrophic factor), der für die Entwicklung und Funktion striataler Neurone nötig ist (Baquet et al. 2004; Gauthier et al. 2004). Ebenso fallen auch andere Zellbestandteile, wie Rezeptoren, der gestörten Transportfunktion zum Opfer (Rong et al. 2006). HAP1 scheint außerdem eine Rolle in der Endosomenbildung zu spielen und in Vesikel internalisierte Rezeptoren vor lysosomalen Abbau zu schützen (Li et al. 2002; Kittler et al. 2004).

HTT ist noch an einer ganzen Reihe weiterer Zellprozesse beteiligt, die ohne Anspruch auf Vollständigkeit hier nur kurz genannt werden sollen:

- Es beeinflusst die Moleküle PSD95 und Grb2, die am Beginn einer Signalkaskade stehen, die von Glutamatrezeptoren initiiert wird. Besitzt HTT eine verlängerte Polyglutaminkette bewirkt dies eine vermehrte Empfindlichkeit gegenüber glutamaterger Erregung und führt zur Apoptose (Liu et al. 1997; Sun et al. 2001).
- Durch die Interaktion mit Kalinin und einem HAP1-abhängigen Molekül nimmt HTT Einfluss auf das Remodelling des Aktinzytoskeletts (Colomer 1997; Penzes et al. 2001).
- Es hat eine indirekte Wirkung auf Moleküle der Membrantransportfunktion (Hattula und Peranen 2000; Holbert et al. 2003).
- Es moduliert zahlreiche Transkriptionsfaktoren bzw. deren Cofaktoren. Mutiertes HTT sorgt dabei durch die Faktoren Sp1 (specificity protein 1) (Qiu et al. 2006), TAFII130 (TATA-box-binding protein-associated factor II, 130 kDa) (Dunah et al. 2002), CBP (CREB-binding protein) (Sugars et al. 2004; Shimohata et al. 2000) sowie p53 (Steffan et al. 2000) für eine Hemmung der Promotorfunktion und damit für eine Downregulation von Genen wie dem D2-dopamine receptor oder nerve growth factor receptor (Dunah et al. 2002; Qiu et al. 2006). Durch Bindung an den Silencer REST (repressor element 1 silencing transcription factor), auch NRSF (neuron-restrictive silencing factor) genannt, wird zB. die Transkription von BDNF unterdrückt (Zuccato et al. 2003).

1.4.3. Autophagozytose und Abbau von HTT

Der Abbau von Proteinen und auch größeren Zellbestandteilen wie Organellen kann über zwei verschiedene Wege stattfinden. Die Abbauwege unterteilen sich in das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) und die Autophagozytose durch Lysosomen. Diese Prozesse sind insofern von Interesse, da mutiertes HTT hierdurch nicht nur eliminiert werden kann, sondern auch selbst an der Regulation seines eigenen Abbaus beteiligt ist.

HTT wird aufgrund seiner Molekülgröße maßgeblich durch Makroautophagie, einer Unterform der Autophagozytose, abgebaut. Gleichzeitig wird dieser Weg am stärksten von HTT beeinflusst, weshalb hierauf im Folgenden genauer eingegangen werden soll:

Beim Prozess der Makroautophagie bildet sich am ER oder Golgi-Apparat eine Membran, welche im Zytosol befindliche Proteine und Zellorganellen einschließt. Das entstandene Vesikel, ein Autophagosom, wird daraufhin zum Lysosom transportiert, mit dem es verschmilzt um den Inhalt in seine molekularen Bestandteile zu zersetzen (Kaushik et al. 2010).

Aktuell sind sowohl für die Bildung, Beladung, als auch Transport der Autophagosomen Veränderungen beschrieben, die sowohl direkt in einer verminderten Elimination von mutiertem HTT, als auch indirekt durch z. B. unzureichenden Abbau dysfunktionaler Mitochondrien (Quintanilla und Johnson 2009), in einer erhöhten Zelltoxizität resultieren.

Posttranslational kommt es zu einer Spaltung des HTT-Proteins durch Caspase 3. Anschließend kann an der AS 553 des entstandenen HTT-Fragments Myristinsäure, eine Fettsäure, angeknüpft werden, welches im ER an der Bildung von Autophagosomen beteiligt ist (Martin et al. 2014). Es scheint mit der BATS-Domäne des Barkor/Atg14-Komplexes zu interagieren, welcher Initiation und Krümmung der Vesikelmembran kontrolliert (Fan et al. 2011). Im Falle von mutiertem HTT findet jedoch nur eine verminderte Myristoylierung statt, was eine Verminderung der Autophagosomenbildung nach sich zieht (Martin et al. 2014).

Weiterhin konnte sowohl im Zell- und Mausmodell, als auch in Lymphoblasten von HD-Patienten eine verminderte Beladung der Autophagosomen beobachtet werden. Die Membran der Vakuolen war intakt. Sie stellten sich jedoch in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen z. T. komplett leer dar. Offensichtlich verursacht mHTT eine Dysfunktion in der Erkennung der zu phagozytierenden Zellbestandteile. Die genauen Pathomechanismen sind allerdings bisher ungeklärt (Martinez-Vicente et al. 2010).

Auch im Transport der Autophagosomen kommt es zu Störungen durch eine Verlängerung des *CAG*-Repeats. Einerseits ist die Affinität von mutiertem HTT zu Optineurin und Rab8, Proteine welche an der „Verschickung“ von Vesikeln im Golgi-Apparat beteiligt sind herabgesetzt (Sahlender et al. 2005, 2005; del Toro et al. 2009). Andererseits ist auch die Autophagozytose von der in Abschnitt 1.4.2 beschrieben Fehlfunktion des axonalen Transportes betroffen (Wong und Holzbaur, Erika L F 2014).

Ein erscheint offensichtlich, dass noch ein tieferes Verständnis für die Eliminationsprozesse von HTT nötig ist, es aber einen wichtigen potentiellen Ansatz medikamentöser Therapien bietet. So konnten bereits durch Stimulierung der Autophagozytose erste Erfolge im Zell- und Tiermodell erzielt werden (Sarkar et al. 2009). Eventuell könnten auch alternative Abbauwege wie Chaperon-vermittelte-Autophagozytose (Koga et al. 2011) oder UPS (Ortega und Lucas 2014) einen Teil der Symptomatik kompensieren.

1.5. HTT-Aggregate

1.5.1. Lokalisation im ZNS und subzelluläre Verteilung der Aggregate

Ein wichtiges Kennzeichen von HD ist die Bildung unlöslicher Aggregate in Neuronen und sogar nicht-neuronalem Gewebe (Moffitt et al. 2009). Das HTT-Protein, das in gesunden Personen als einzelnes Molekül gelöst im Zytosol vorliegt, neigt durch die Verlängerung der Polyglutaminkette zur Aggregation und der Bildung von Einschlusskörperchen. Anfangs wurden diese Ablagerungen nur im Zellkern lokalisiert (DiFiglia et al. 1997), konnten dann allerdings sogar in größeren Mengen im Zytosol des gesamten Neurons, sowohl perinukleär als auch in den Zellfortsätzen nachgewiesen werden (Gutekunst et al. 1999). Intranukleär finden sich meist ein, seltener zwei, runde bis ovale Einschlüsse, die etwas größer als der Nukleolus sind. Im Zytoplasma sind diese meist ebenfalls rund bis oval mit einem Durchmesser von 1,5-5 µm. Einzelne Aggregate können sogar Größen bis zu 12 µm erreichen (Herndon et al. 2009; van Roon-Mom et al. 2006; DiFiglia et al. 1997).

Je nach verwendetem Antikörper sind Einschlüsse in zahlreichen Teilen des menschlichen Gehirns zu finden. Vor allem in Pyramidenzellen der Kortexschichten III, V, VI und dem Striatum aber auch im Hippocampus, Amygdala, Substantia nigra, Globus pallidus, Ncl. ruber, Ncl. dentatus des Kleinhirns und Kernen des Hirnstamms sind Einschlusskörperchen zu beobachten (DiFiglia et al. 1997; Becher et al. 1998; Gutekunst et al. 1999; Maat-Schieman et al. 1999; Sieradzan et al. 1999). Die unterschiedlichen Untersuchungen fasst *Tabelle 2* zusammen. In *Abbildung 4* ist beispielhaft die immunhistochemische Anfärbung von HTT-Aggregaten dargestellt. Sehr ähnliche Verteilungsmuster von Einschlusskörperchen ließen sich auch im Tiermodell nachweisen (siehe Abschnitt 1.6).

Es zeigten sich jedoch auch zahlreiche Einschlüsse im Cerebellum und Rückenmark (Davies et al. 1997). Auch in den Hirnen gesunder Personen lassen sich kleine Einschlusskörperchen nachweisen. Sie unterscheiden sich jedoch in Qualität und Quantität merklich von den in HD-Patienten sichtbaren Aggregaten. Sie sind meist nur vereinzelt auszumachen, befinden sich nie im Zellkern und erreichen maximal einen Durchmesser von 1 µm. In der Färbung der Neurone gegen HTT sind diese meist als gepunktete Strukturen auf einem diffusen Hintergrund zu erkennen. Es könnte auch sein, dass es sich gar nicht um Aggregate im eigentlichen Sinne handelt, sondern lediglich um Ansammlungen von gelöstem HTT in Varikositäten, Nervenendigungen und späten Endosomen (multivesicular bodies) (Maat-Schieman et al. 1999; Gourfinkel-An et al. 1997; Sapp et al. 1997; Sharp et al. 1995; Trottier et al. 1995).

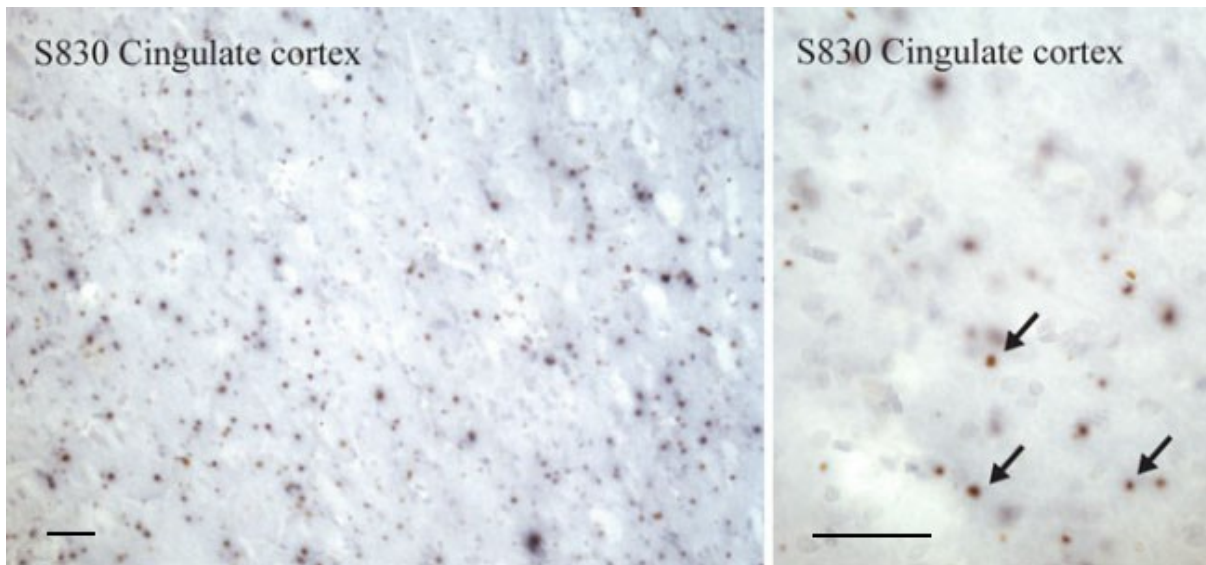


Abbildung 4: IHC Färbung mit AK S830 des cingulären Cortex eines HD-Patienten

Die Verschiedenen mikroskopischen Vergrößerungen zeigen im gesamten Sichtfeld zahlreiche HTT-Einschlusskörperchen (mit Pfeilen markiert). Maßstabsbalken links entspricht 50 µm. Maßstabsbalken rechts entspricht 40µm. (Nguyen und Cenci 2015, S. 62)

1.5.2. Rolle der Aggregatsbildung für die Pathologie

Die Aggregatsbildung bleibt damit ein Merkmal mutierten HTT, was die Vermutung nahelegt, dass sie auch für die pathologische Wirkung auf Nervenzellen verantwortlich ist. Vor allem für die toxische Wirkung von intranukleären Aggregaten (die ausschließlich bei HD-Erkrankten auftreten) lassen sich einige Hinweise finden:

So geht die Entstehung der Aggregate der phänotypischen Manifestation der Erkrankung voraus und die Einschlüsse nehmen im Laufe der Erkrankung an Größe und Häufigkeit zu (Davies et al. 1997). Außerdem korrelieren die *CAG*-Wiederholungen, also somit auch die Schwere der Erkrankung, mit der Menge an Einschlusskörperchen im Zellkern. Manifestationsalter und Todeszeitpunkt zeigen einen entgegengesetzten Zusammenhang (Becher et al. 1998; Sieradzan et al. 1999; Hoffner et al. 2005). Werden PolyQ-Aggregate in den Zellkern von Säugetierzellen eingebracht, sterben diese (Yang et al. 2002) und verhindert man die Aggregatbildung, verringert sich auch die Toxizität in Zellkulturen (Nagai et al. 2000; Colby et al. 2004).

Einerseits könnten durch die Bindung von HTT in unlöslichen Aggregaten weiter oben erläuterte physiologische Prozesse blockiert oder andere Proteine wie Transkriptionsfaktoren (Nucifora, JR et al. 2001; Steffan et al. 2000; Olzscha et al. 2011) oder Proteasom-Bestandteile (Suhr et al. 2001) in den Einschlüssen gebunden werden. Auch die Mitochondrienfunktion wird

durch die Aggregate beeinträchtigt und könnte über die Störung des Energiehaushalts der Zelle toxisch wirken (Chang et al. 2006).

Die Sequestrierung von Proteinen scheint allerdings nicht in einer biologisch relevanten Menge zu passieren (Yu et al. 2002) bzw. die Schädigung des Proteasomensystems geht der Aggregationsbildung noch voraus (Bennett et al. 2005). Des Weiteren erscheint es widersprüchlich, dass die Verteilung von Einschlusskörperchen kaum mit der Neuropathologie in HD-Gehirnen übereinstimmt. Während sich die Aggregate in den Neuronen des Kortex am deutlichsten zeigen, sind sie in den am meisten von HD betroffenen Zellen, den MSN des Striatums, kaum zu finden (Kuemmerle et al. 1999). Außerdem zeigte sich im striatalen Zellmodell keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Einschlusskörperchen und Zelluntergang. Darüber hinaus wurden die Zellen sogar schneller apoptotisch, wenn die Bildung von Aggregaten verhindert wurde (Saudou et al. 1998). Im Zellmodell von (Arrasate et al. 2004) und (Miller et al. 2010) konnte gezeigt werden, dass nicht alle untergegangenen Zellen auch Einschlusskörperchen aufwiesen. Der Zelluntergang war zwar von der Menge an mutant-HTT und der Länge der PolyQ-Kette abhängig; von Bedeutung war aber nur das nicht aggregierte, diffus vorliegende HTT. Zellen, die Aggregate bildeten, reduzierten die Menge an freiem HTT und verbesserten damit das Risiko apoptotisch zu werden. Vieles deutet somit darauf hin, dass die HTT-Aggregatsbildung keine zellschädigende Wirkung besitzt bzw. es eine Strategie darstellt, um die Neuronen vor den toxischen Einflüssen des ungebunden vorliegenden HTT zu schützen. Diese Hypothese wird auch durch das von (Slow et al. 2005) erstellte transgene Mausmodell unterstützt. Die Mäuse exprimierten zwar ein N-terminales-HTT-Fragment mit ca. 120 Glutaminwiederholungen, was zu zahlreichen Einschlusskörperchen im Gehirn der Mäuse führte, aber zeigten dennoch im Verhalten und körperlicher Entwicklung keinerlei Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen. Verglichen mit dem symptomatischen YAC128-Mausmodell (Slow 2003) wiesen die sogenannten „shortstop“-Mäuse schon früher und in einer weitaus höheren Dichte Einschlusskörperchen auf (3fach im Striatum und 18fach im Kortex mit 18 Monaten). Der Grund für das Nicht-Erkranken der „shortstop“-Mäuse könnte darin liegen, dass sich in den Neuronen keine toxischen HTT-Oligomere finden lassen, wie sie in anderen Mausmodellen zu beobachten sind (Nucifora et al. 2012).

Tabelle 2: Verteilung von HTT-Einschlusskörperchen im Gehirn von gesunden Menschen und HD-Patienten

Nachweis Antikörper	Aggregate	Quelle
AP81	oft punktförmige Strukturen $\leq 1 \mu\text{m}$ im Zytosol gesunder Hirne	(Sharp et al. 1995)
Ab585	-punktförmige Ablagerungen im Zytoplasma 2 von 8 Kontroll-Hirnen, selten diffuse Färbung des Nukleus -viele punktförmige Ablagerungen perinukleär und nukleär in HD-Pat., häufiger und größer als Aggregate in Kontroll-Hirnen	(Sapp et al. 1997)
Ab1 (N-term. AK)	-keine intranukleären oder zytoplasmatischen Einschlüsse in Kontroll-Hirnen -keine intranukleären aber zytoplasmatische Einschlüsse in präsymptomatischen HD-Pat. -intranukleäre und zytoplasmatische Einschlüsse: Kortex(++) insb. Schicht V, VI; Striatum(+), Globus pall.(-), Cerebellum(-) -mehr intranukleäre Einschlusskörperchen im Kortex von juvenilen als adulten HD-Pat. -mehr zytoplasmatische Einschlusskörperchen im Kortex von adulten als juvenilen HD-Pat. -intranukleäre Einschlüsse etwas größer als Nukleolus (7,9 μm); meist ein, selten zwei oder mehr Einschlüsse pro Zelle; zytoplasmatische Einschlüsse 5 μm im Mittel, zT. bis 12 μm	(DiFiglia et al. 1997)
AP78 und AP194, AP81	keine Einschlusskörperchen in Kontroll-Hirnen -keine zytoplasmatischen Einschlüsse nachweisbar, intranukleäre Einschlüsse: Kortex(+++) insb. Schicht III, V, VI, Striatum(++), Amygdala(+), Hippocampus(+), Ncl. ruber(+), Ncl. dentatus cerebelli(+) -kein Nachweis mit AP81 (AK gegen AS 650–663) → Aggregate enthalten nur N-term. HTT-Fragmente -Größe der Einschlüsse \cong Nukleolus; meist ein, selten zwei oder mehr Einschlüsse pro Zelle -Häufigkeit der Einschlusskörperchen im Kortex korreliert mit CAG-Repeat-Länge und Erkrankungsgrad (hier jedoch starke Schwankungen)	(Becher et al. 1998)
EM48	-keine Einschlusskörperchen in Kontroll-Hirnen -Kortex(+++) besonders cingulärer und Inselkortex, Schicht V/VI, Striatum(++), Substantia nigra (Pars comp.)(++), Hypothalamuskern(e)(++), Thalamus(++), Hirnstammkerne(++), Globus pall.(+), Hippocampus(+), Cerebellum(+)	(Gutekunst et al. 1999)

	-am häufigsten 1.35-21.38 µm Aggregate im Neuropil, z. T. tubuläre Strukturen die Dendriten ähneln, 3-5 µm Aggregate in Nukleus (HD-Grad 1 < Grad 4), zusätzlich 0.3-1.5µm Aggregate in Perikarya	
AS7	-keine intranukleären aber vereinzelt zytoplasmatische Einschlüsse in Kontroll-Hirnen in Hirnen von HD-Pat.: -intranukleäre und zytosolische Einschlüsse in Kortex(++), Hippocampus(++) v. a. Subicullum und Cornu ammonis, Rhinencephalon(++), Striatum(+), Globus pall.(-), Cerebellum(-), Substantia nigra(-)	(Maat-Schieman et al. 1999)
HP1, 1C2, HD1	-keine Einschlusskörperchen in Kontroll-Hirnen -intranukleäre Einschlüsse (mit HP1 AK) in Kortex(+++) insb. Schicht V, VI; Striatum(++), Globus pallidus(++), Thalamus(+), Ncl. subthalamicus(+), Substantia nigra(+), Mittelhirn(-), Cerebellum(-), Hirnstamm(-) -zytoplasmatische Einschlüsse (mit 1C2 und HD1 AK) vor allem im Kortex	(Sieradzan et al. 1999)
1C2, 2B4	-Aggregate auch in gesunden Kontrollhirnen, jedoch kleiner und weniger, sehr selten intranukleär -Kortex(++), Striatum(++), Hippocampus: Subicullum(+), Gyrus dentatus(+/-), Thalamus(+), Substantia nigra(+), Hirnstamm(+), Rückenmark(+/-) Cerebellum: cerebellärer Kortex(-), Ncl. dentatus(+),	(Herndon et al. 2009)
Ubiquitin-AK	-intranukleäre Einschlüsse in Kortex(+++), Striatum(++), Globus pall.(+), Thalamus(+), Ncl. subthalamicus(+), Cerebellum(-)	(Gourfinkel-An et al. 1998)

1.5.3. Aggregatsbildung durch HTT-Fragmente

Untersucht man Einschlusskörperchen auf ihre Bestandteile, lassen sich eine Vielzahl verschiedener Proteine nachweisen. Neben unterschiedlich langen HTT-Fragmenten finden sich vor allem Ubiquitinreste aber auch Transkriptionsfaktoren und Zell-Zyklus regulierende Enzyme (Hoffner et al. 2005; Suhr et al. 2001; DiFiglia et al. 1997). Dabei ergeben sich Unterschiede zwischen zytosolischen und intrazellulären Aggregaten. Nur in den im Zytosol befindlichen Einschlüssen lässt sich das C-terminale Ende und somit das gesamte HTT-Molekül (full-length-HTT) nachweisen (DiFiglia et al. 1997). Da nur Moleküle kleiner <60 kDa frei durch die Kernmembran diffundieren können (Allen et al. 2000), kann das ca. 350 kDa große Molekül nicht in den Zellkern gelangen, sodass die intranukleären Einschlüsse aus sehr kleinen N-terminalen Fragmenten gebildet werden (Hackam et al. 1998). Sowohl Wildtyp als auch mutiertes HTT werden durch Proteasen in mindestens 14 verschiedene Fragmente gespalten. Es kann jedoch nur das kleinste Fragment, welches dem Exon-1 entspricht, im Zellkern registriert werden (Landles et al. 2010). Verantwortlich für die Proteolyse des HTT-Proteins sind eine Reihe von Caspasen, Calpain und Aspartatendoproteasen. Je nach Protease spalten sie das Molekül an einer anderen Position, wodurch die unterschiedlichen Fragmentlängen zustande kommen (Wong et al. 2015; Gafni und Ellerby 2002; Lunkes et al. 2002). Auch wenn die Fragmentierung des HTT-Proteins ein physiologischer Prozess ist, scheint es doch eine wichtige Voraussetzung dafür zu sein, dass mutiertes HTT seine schädigende Wirkung entfalten kann. Denn blockiert man die Schnittstellen der Proteasen bzw. unterdrückt die Expression der spaltenden Enzyme verringert sich nicht nur die Aggregatsbildung sondern auch die Toxizität von HTT (Ona et al. 1999; Wellington et al. 2000; Gafni et al. 2004; Graham et al. 2006a; Wong et al. 2015). Eine besondere Bedeutung, eventuell auch von pharmakologischem Interesse, scheint hier der Caspase 6 mit seiner Schnittstelle an der Aminosäure 586 zuzukommen. Mäuse die Caspase-6-resistentes-HTT exprimierten, zeigten keinerlei Symptome oder striatale Degeneration (Pouladi et al. 2009; Graham et al. 2006a). Leider waren die Ergebnisse nicht in anderen Mausmodellen reproduzierbar, was allerdings daran liegen könnte, dass es neben Caspase 6 noch weitere Proteasen gibt, die HTT an der gleichen Stelle spalten können (Landles et al. 2012; Gafni et al. 2012).

1.5.4. Struktur und Aggregationsmechanismus von HTT-Einschlüssen

Die Aggregate, die sich in Neuronen von HD-Patienten bilden, ähneln stark den Ablagerungen anderer neurodegenerativer Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson. Es bilden sich wasserunlösliche fibrilläre oder bandartige Strukturen, die sehr an β -Amyloid

oder α -Synuclein erinnern (Scherzinger et al. 1997). Möchte man diese Aggregate in ihre Bestandteile zerlegen, reicht es nicht aus, sie in SDS elektrophoretisch aufzutrennen, sondern muss mit Ameisensäure vorbehandeln. Trotzdem erhält man neben den Banden für die unterschiedlichen HTT-Fragmente auch eine Polymer- und Oligomerbande. Es ist daher anzunehmen, dass sowohl nicht-kovalente als auch kovalente Bindungen im Aggregationsprozess eine Rolle spielen (Hoffner et al. 2005). (Perutz 1996) konnte zeigen, dass sich die Glutaminketten über Wasserstoffbrückenbindung der Aminseitenketten gegenseitig stabilisieren und so antiparallele β -Faltblattstrukturen bilden (Scherzinger et al. 1997). Durch die Wirkung von Transglutaminasen wird das Aggregat vermutlich zusätzlich über kovalente Bindungen stabilisiert (Iuchi et al. 2003).

In vitro bilden sich Aggregate erst ab einer Polyglutaminlänge von 41 Aminosäuren, was ungefähr mit der Schwelle übereinstimmt, ab der es auch zum Ausbruch der Krankheit kommt (Huang et al. 1998). Ermöglicht wird die Polymerisation durch die Konformationsänderung des HTT-Proteins von einem Knäuel zu einer linearen Haarnadelstruktur, die in dem Bereich zwischen 37 und 41 Glutaminmolekülen zu beobachten ist (Perutz 1996).

Ähnlich der Theorie zur Bildung von Amyloid-Plaques in der Alzheimer Erkrankung geht man auch in HD davon aus, dass vom monomeren Protein zwei verschiedene Konformationen existieren, wobei das Gleichgewicht zum größten Teil auf Seite der energetisch günstigen gelösten Form liegt. Nur durch das Zusammentreffen misgefalteter Moleküle kommt es zur Aggregation. Um ein stabiles Aggregat zu bilden, muss sich erst ein Polymerisationskern bestimmter Größe formieren, damit eine weitere Anlagerung von Monomeren energetisch günstig und die Verbindung stabil ist (Scherzinger et al. 1997; Jarrett und Lansbury 1993). Im Falle von mutiertem HTT scheint hier schon ein einzelnes Monomer im fehlgefalteten Zustand auszureichen (Kar et al. 2011). Vermutlich ist die Bildung des Polymerisationskernes allerdings etwas komplexer, da sich die HTT-Moleküle mit den ersten 17 Aminosäuren des N-terminalen Endes zu löslichen Oligomeren micellenartig aneinander lagern, wobei die PolyQ-Ketten vom Zentrum wegzeigen. Verdichten sich diese Strukturen wird eine Konformationsänderung in die β -Faltblattstruktur begünstigt, wodurch die Aggregationskerne entstehen können (Thakur et al. 2009; Lakhani et al. 2010). Im Prozess der Polymerisation zu großen unlöslichen Aggregaten spielen jedoch auch Zwischenstufen von kugeligen und fibrillären Oligomeren eine Rolle (Poirier et al. 2002; Wacker et al. 2004). Ähnlich wie beim Morbus Alzheimer (Stefani 2012) gibt es auch in HD Hinweise darauf, dass gerade von diesen Oligomeren eine besondere Toxizität ausgeht und Aggregate einen Mechanismus der Zelle darstellen, um die Oligomere in einen unschädlichen Zustand zu überführen (Nucifora et al. 2012; Legleiter et al. 2010;

Takahashi et al. 2008; Wong et al. 2008). Auch bestimmte Konformationen monomeren mutierten HTT stehen im Verdacht toxische Eigenschaften zu besitzen, welche so reduziert werden können (Schaffar et al. 2004; Nagai et al. 2007; Miller et al. 2011).

1.6. Tiermodelle von HD

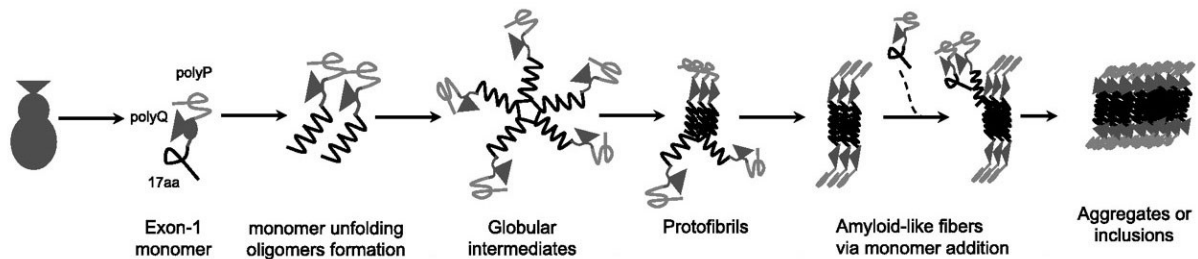


Abbildung 5: Aggregationsmechanismus von HTT

HTT-Fragmente lagern sich micellenartig zu löslichen Oligomeren zusammen. Während die ersten 17 AS des N-terminalen Endes den Kern bilden, befinden sich die Polyglutaminketten an der Oberfläche. Mit steigender Zahl der HTT-Fragmente kommt es zur Konformationsänderung und damit zur Bildung fibrillärer Oligomere, welche durch Anlagerung weiterer HTT-Monomere große unlösliche Polymere bilden. (Zuccato et al. 2010).

Da abgesehen von klinischen Studien HD-Forschung am Menschen nur postmortal erfolgen kann, werden zur Erforschung der Erkrankung *in vivo* und zum Testen neuer Therapieansätze Modelle benötigt, die die Pathologie der humanen Erkrankung möglichst widerspiegeln. Idealerweise sollte die Untersuchung in großen Kohorten erfolgen, welche geringe Ansprüche an ihre Aufzucht stellen. Gleichzeitig ist ein einfacher Zugang zum neuronalen Gewebe nötig, um neue Therapiestrategien testen zu können.

Das *HTT*-Gen ist ein gut konserviertes Gen, das in zahlreichen Tierarten vorkommt. So auch in den Tierarten die schon lange für die medizinische Forschung verwendet werden. Der Mensch ist jedoch die einzige bekannte Spezies, bei der es durch eine pathologische Verlängerung der *CAG*-Repeat-Sequenz zur Entstehung von HD kommt. Es sind daher gentechnische Hilfsmittel notwendig, um auch in Tieren eine HD ähnliche Erkrankung auszulösen.

Das Tiermodell muss jedoch verschiedenen Validitätsansprüchen standhalten:

1. *Konstruktvalidität* bedeutet für ein Tiermodell, dass die gentechnische Veränderung möglichst gut die Bedingungen der humanen Pathologie widerspiegelt. Die höchste Validität hätte demnach ein Konstrukt aus der gesamten mutierten humanen DNA unter der Kontrolle des endogenen Promotors. Demnach sind Modelle die lediglich cDNA des *HTT*-Gens (also keine Introns) besitzen, nur HTT-Fragmente exprimieren oder unter Kontrolle von nicht-HTT Promotoren stehen, Vereinfachungen des Modells, die nicht alle Aspekte vollständig darstellen.

2. *Augenscheinvalidität* oder „face validity“ gibt an, inwiefern das Tier den Phänotyp bzw. die Symptome der humanen Erkrankung wiedergibt. HD-Modelle sollten in ihrem Verhalten möglichst progressive motorische Bewegungsstörungen, eine schlechter werdende Kognition sowie psychiatrische Symptome wie Depressionen zeigen. Neuropathologisch sollte ein selektiver altersabhängiger Befall des Striatums, eine globale Atrophie des Cerebrums als auch der Nachweis von Einschlusskörperchen möglich sein. Auch sollten sich der Stoffwechsel und die Zellfunktion des Tieres nur wenig vom Menschen unterscheiden.
3. *Vorhersagevalidität* gibt in einem Tiermodell an, inwieweit sich Therapieansätze vom Tier auf den Menschen übertragen lassen. Da abgesehen von einer unzureichenden symptomatischen Therapie in HD bisher keine Therapie zur Verfügung steht, lässt sich diese nur schwer bewerten (Pouladi et al. 2013).

1.6.1. HD-Modelle in wirbellosen Tieren

Einfache Tiermodelle bieten die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* oder der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Schon die wirbellose Fruchtfliege exprimiert von Natur aus das *HTT*-Gen, sodass keine neu auftretenden Interaktionen durch ein künstliches Protein zu erwarten sind. Verlängerung der PolyQ Kette bzw. Einfügen humaner *HTT*-Genanteile verursachte in *Drosophila* Fliegen glutaminlängenabhängig Neurodegeneration der Photorezeptoren der Facettenaugen. Außerdem ließen sich je nach Modell Einschlusskörperchen und Bewegungsstörungen nachweisen. Die Fliege ist gut erforscht und genetische Veränderungen sind einfach zu realisieren. Mit einem Lebenszyklus von wenigen Wochen und anspruchsloser Aufzucht lassen sich gut Stoffwechselfvorgänge *in vivo* untersuchen (Lewis und Smith 2016). Wie auch bei *C. elegans* lassen sich in Maden der *Drosophila* die Interaktionen und Lokalisationen flouressenzmarkierter Stoffe im lebenden Tier beobachten (Brignull et al. 2006; Krench und Littleton 2013).

1.6.2. HD-Mausmodelle

Möchte man vergleichbare Bedingungen zur menschlichen Anatomie und Physiologie schaffen, eignet sich die Arbeit mit Säugetieren. Sie tragen ein *HTT*-Gen mit normalerweise sieben *CAG*-Wiederholungen und erkranken natürlicher Weise nicht an HD. Erst durch genetische Veränderungen zeigen sie in unterschiedlichem Ausmaß HD ähnliche Phänotypen. Zur Erforschung von HD haben bisher vor allem Mausmodelle beigetragen. Diese können je nach angewandeter gentechnischer Methode in knock-out oder knock-in-Modell unterschieden

werden. Letztere unterteilen sich nach der eingefügten Länge des *HTT*-Gens in Fragment- oder full-length-Modelle, wobei es einen Unterschied macht, ob die cDNA oder die gesamte humane *HTT*-Sequenz mitsamt Introns integriert wurde. Eine Übersicht der wichtigsten HD-Mausmodelle ist in *Tabelle 3* dargestellt.

Knock-out-Mäuse

Durch Inaktivierung einer oder beider *HTT*-Gene konnten knock-out-Modelle wichtige Informationen zur Funktion von Wildtyp-HTT liefern. Mäuse ohne *HTT*-Gen bleiben in ihrer embryonalen Entwicklung zurück und versterben noch in der ersten Hälfte der Schwangerschaft (Zeitlin et al. 1995). Heterozygote knock-out-Mäuse zeigen Lernschwierigkeiten, verstärkte motorische Aktivität sowie einen Neuronenverlust im Ncl. subthalamicus (Nasir et al. 1995). Gleichzeitig wird HTT auch für die Transkription von BDNF, einem wichtigen neurotrophen Faktor, benötigt (Zuccato et al. 2003).

Knock-in-Mäuse

Im einfachsten knock-in-Modell wurden dem endogenen *HTT*-Gen der Maus zusätzliche *CAG*-Tripletts eingefügt, sodass sie heterozygot mutiertes HTT mit Glutaminwiederholungen zwischen 50 und 150 exprimierten. Während die Q50-Mäuse keine Veränderungen gegenüber Wildtyp-Mäusen zeigten, ließen sich bei höheren Wiederholungen Einschlusskörperchen und leichte Neurodegeneration nachweisen (White et al. 1997; Shelbourne et al. 1999; Wheeler et al. 2000). Ein massiver Zellverlust einzelner Hirnregionen war jedoch nicht feststellbar. Abgesehen von Veränderungen im Aggressionsverhalten (Shelbourne et al. 1999) entwickelten lediglich die Mäuse mit sehr hohen Glutaminwiederholungen und erst im hohen Alter Verhaltensauffälligkeiten und Bewegungsstörungen. Zwar entwickelten homozygote Mäuse schon früher Symptome, die Störungen fielen jedoch auch hier eher mild aus (Wheeler et al. 2000; Lin et al. 2001). In den Modellen von (Menalled et al. 2003; Menalled et al. 2002) zeigten sich ebenfalls nur bei sehr vielen *CAG*-Repeats eine entsprechende Symptomatik. Diese gingen den neurodegenerativen Veränderungen allerdings noch voraus, womit sich derartige Modelle höchstens für die Erforschung präsymptomatischer HD-Stadien eignen (Menalled et al. 2009). Die langen Aufzuchtzeiten bis zum Symptomatischerwerden der Mäuse und der eher milde Phänotyp nehmen für Studien viel Zeit und hohe Testzahlen in Anspruch bis sie verlässliche Daten liefern können.

HTT-Fragment-Mausmodelle

Geeigneter erscheinen daher Mausmodelle, die komplette menschlichen *HTT*-Gen oder Fragmente davon in das Mausgenom eingebracht haben. Eines der ersten war das Mausmodell

von (Mangiarini et al. 1996), welches das humane *HTT*-Exon-1 mit 115-150 *CAG*-Wiederholungen exprimierte. Von den erstellten Linien zeigte vor allem die Linie R6/2 mit 150 *CAG*-Repeats eine starke progressive Symptomatik ab der 5. Lebenswoche (LW) mit einem vorzeitigen Versterben zwischen der 10. und 13. LW. Bei den Mäusen waren choreiforme und ungewollte stereotype Bewegungen, Tremor und epileptische Anfälle zu beobachten. Ein weiteres charakteristisches Verhalten war das Verharren mit angezogenen Gliedmaßen, sobald die Mäuse am Schwanz angehoben wurden. Dieses „claspings“ hielt zwischen einigen Sekunden und einer Minute bis die Mäuse wieder in der Lage waren, sich normal zu bewegen. Im Spätstadium wurden die Tiere zunehmend hypoaktiv, wogen nur noch 60 % der Vergleichsgruppe und zeigten eine globale Hirnatrophie von 20 % mit besonders starker Degeneration in den Basalganglien (Mangiarini et al. 1996; Lüsse 2001). Intranukleäre und zytosolische Einschlusskörperchen waren im gesamten Hirn zu finden und zeigten starke Parallelen zur Verteilung in Hirnen von HD-Patienten (Davies et al. 1997).

Ein ähnliches Modell entwickelten (Schilling et al. 1999), die ein längeres N-terminales Fragment von 171 AS verwendeten und entweder 18, 44 oder 82 *CAG*-Wiederholungen einfügten. Während die NT171-Q18 und NT171-Q44 Linien keine Symptome zeigten, entwickelten die NT171-Q82-Mäuse eine Symptomatik sehr ähnlich der R6/2-Linie, jedoch mit späterem Einsetzen der Symptomatik und einer Lebensspanne von 6-11 Monaten.

Ein drittes Modell dieser Art schufen (Laforet et al. 2001). Sie nutzten eine noch größere N-terminale Fragmentlänge von 3kB und integrierten entweder 18, 46 oder 100 *CAG*-Repeats. Die Symptomatik zeigte sich glutaminlängenabhängig mit der stärksten Ausprägung in den Q100-Mäusen. Motorische Defizite äußerten sich in einer schlechteren Performance auf dem Rotarod (einer beschleunigenden rotierenden Walze, auf der die Tiere laufen müssen) ab dem 3. Lebensmonat (LM), Gangunregelmäßigkeiten und „claspings“. Außerdem wiesen sie eine HD-typische Neurodegeneration auf. Nichtsdestotrotz fiel die Symptomatik verglichen mit anderen Modellen dieser Art eher mild aus.

Full length HTT-Mausmodelle

Die Entwicklung von full-length *HTT*-Mausmodellen, also Mäusen die das gesamte humane *HTT*-Gen exprimieren, stellt gentechnisch einige Herausforderungen dar. Zum einen ist bei der Herstellung einer cDNA mit einer Fehlerrate der reversen Transkriptase von bis zu 1 Fehler je kB zu rechnen, was bei einem Gen von ca. 170 kB (67 Exons plus Introns) eine nicht zu vernachlässigende Veränderung der cDNA bedeutet. Zum anderen musste ein größerer Vektor als ein Plasmid gefunden werden, da dieses nur bis zu 15 kB DNA aufnehmen kann. Infrage

kamen hier yeast artificial chromosome (YAC) und das bacterial artificial chromosome (BAC). Sie können zwar auch große DNA Abschnitte aufnehmen, sind jedoch oft instabil und lassen sich schwieriger ins Genom einfügen. Es resultiert eine niedrigere transgene Kopienzahl, sodass die Tiere meist nur geringe Mengen des Gens exprimieren (Pouladi et al. 2013).

Das erste Modell dieser Art von (Reddy et al. 1998) enthielt die gesamte cDNA des humanen *HTT* mit entweder 16, 48 oder 89 *CAG*-Wiederholungen. Während sich die HD16-Linie nicht von den Wildtyp-Tieren unterschied, zeigten die HD48 und HD89-Linien ab der 8. Woche sogenanntes „claspings“ sowie ab der 20. LW weitere stereotype Verhaltensweisen und Hyperaktivität. In den Striata war ein 20 %iger Zellverlust der kleinen und mittleren Neurone zu verzeichnen und in der Immunhistochemie waren Einschlusskörperchen im Kortex, Hippocampus, Thalamus und Cerebellum, jedoch weniger im Striatum zu finden.

YAC-Mäuse

Mit dem YAC-Mausmodell wurde das erste Mal das gesamte *HTT*-Gen mitsamt der Promotorsequenz mit Hilfe eines yeast artificial chromosome in das Mausgenom eingebracht. Humanes *HTT* ist offensichtlich in der Lage, in knock-out-Mäusen das endogene *HTT* zu ersetzen (Hodgson 1996), wogegen die reine cDNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors zu keinen lebend geborenen Tieren führte (Hodgson et al. 1999). Es ist also davon auszugehen, dass in diesem Modell das humane *HTT* nicht mit dem endogenen interagiert oder die normale Zellfunktion verändert. Von den YAC-Modellen mit 18, 46 oder 76 *CAG*-Wiederholungen zeigte nur die YAC76-Linie ab dem 9. LM Verhaltensauffälligkeiten, Hyperaktivität, stereotype und choreaähnliche Bewegungen, Koordinationsschwierigkeiten sowie auch das schon in anderen Mausmodellen zu findende „claspings“. Neuropathologisch waren im 12. LM eine Abnahme des Hirngewichtes und eine neuronale Degeneration vor allem im lateralen Striatum der YAC76-Linie zu verzeichnen. Mutiertes *HTT* ließ sich in vielen Bereichen des Gehirns nachweisen. Einschlusskörperchen waren vor allem im Striatum und Ncl. accumbens zu beobachten (Hodgson et al. 1999). Das gleiche Mausmodell mit 128 *CAG*-Repeats führte zu einem noch eindrucksvolleren Phänotyp. Die Mäuse zeigen ähnliche Symptome wie die YAC76-Linie, nur waren sie ausgeprägter und durch eine hypoaktive Spätphase gekennzeichnet. Im Verlauf war eine starke globale Hirnatrophie zu beobachten, deren neuronaler Verlust im Striatum gut mit den Symptomatik korrelierte (Slow et al. 2003). Interessanterweise entstand bei der Erstellung der YAC128-Mäuse auch eine sogenannte „shortstop“-Linie, die nur Exon 1 und 2 exprimierte. Diese Tiere zeigten weder motorische

noch Verhaltensauffälligkeiten, noch waren Zeichen von Neurodegeneration erkennbar, obwohl sich sehr viele Einschlusskörperchen nachweisen ließen (Slow et al. 2005).

BACHD-Mäuse

Ein ähnliches Modell war die Entwicklung der BACHD-Mäuse. Mit Hilfe des bacterial artificial chromosome (BAC) wurde ähnlich dem YAC-Modell das humane full-length *HTT*-Gen eingebracht. Der Polyglutaminabschnitt wies 97 Glutamin-Wiederholungen auf und wurde wechselnd mit *CAG/CAA* codiert (Gray et al. 2008), um somatische und goniale Instabilität zu verhindern, wie sie in anderen Mausmodellen zu sehen war (Mangiarini et al. 1997; Kennedy et al. 2003). Hierdurch konnte der Einfluss somatischer Instabilität auf Erkrankungsalter und Pathogenese abgeschätzt werden. Durch die Verhinderung der *CAG*-Längen-Drift wurde außerdem sichergestellt, dass auch spätere Generationen der Mauslinie immer noch die gleiche Menge an *CAG*-Wiederholungen aufwiesen. Ab dem 2. LM entwickeln die Mäuse fortschreitende motorische Defizite im Rotarod-Versuch, Gangauffälligkeiten und ängstliches Verhalten (Abada et al. 2013c). Ebenso lag ihr Körpergewicht 20 % über dem der Vergleichstiere. Verglichen mit YAC128-Mäusen zeigte das BACHD-Modell in den Verhaltensexperimenten von (Menalled et al. 2009) einen stärkeren Phänotyp. In den Tests von (Pouladi et al. 2012) konnte dieses Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden. Neuropathologisch war eine globale Atrophie des Gehirns mit einer reduzierten Großhirnmasse um 20 % nachweisbar. Es fanden sich eine ausgeprägte Degeneration des Striatums sowie Einschlusskörperchen, welche ab dem 12. LM vorrangig in Kortex und Striatum zu sehen waren (Gray et al. 2008). Versuche, die Aggregate mit dem Antikörper S830 statt EM48 nachzuweisen, blieben erfolglos, obwohl die in gleicher Weise gefärbten Hirne von YAC-Mäusen zahlreiche Aggregate aufwiesen (Pouladi et al. 2012).

Ein weiteres BACHD-Modell mit 225 Glutaminwiederholungen zeigte erwartungsgemäß vor allem neuropathologisch eine stärkere und frühere Manifestation (Wegrzynowicz et al. 2015). Entgegen den anderen Modellen wogen diese Tiere jedoch weniger als WT-Mäuse.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich knock-in-Modelle nur sehr eingeschränkt für die HD-Forschung eignen, da sie kein humanes *HTT* exprimieren und nur einen milden Phänotyp aufweisen. Das Fragmentmodell R6/2 und die full-length *HTT*-Modelle BACHD und YAC128 bilden dagegen phänotypisch und neuropathologisch stabile Modelle, wobei die beiden full-length *HTT*-Modelle eine höhere Validität besitzen, die R6/2 Mäuse aber aufgrund der früher einsetzenden Symptomatik aus wirtschaftlichen Gründen attraktiver sind.

1.6.3. HD Modelle großer Säugetiere

Die kurze Lebenszeit von Nagetieren, die z. B. für das Screening neuer Wirkstoffe von Vorteil ist, wird zum Nachteil, wenn es um die Sicherheit und Anwendbarkeit auf den Menschen geht. HD entwickelt sich beim Menschen im Schnitt über 30-40 Jahre und der Krankheitsverlauf erstreckt sich über ein bis zwei Dekaden. Des Weiteren unterscheidet sich das menschliche Gehirn stark in Größe, Anatomie und Komplexität.

Um die Anwendbarkeit und Dosierungen von potenziellen Medikamenten zu testen, sind größere Tiere nötig, die anatomisch und funktionell mehr Ähnlichkeit zum Menschen besitzen. Auch neuere *in vivo* Forschungsmethoden wie MRT und PET/CT erfordern größere Modelle, da die Auflösungsgrenzen solcher Geräte in der Größenordnung eines kompletten Mausstriatums liegen.

Es gibt bisher erst wenige Modelle des Morbus Huntington großer Säugetiere. Die Haltung großer Kohorten ist aufwendig und es dauert lange bis Ergebnisse vorliegen. Bisherige Versuche sind an Schaf, Schwein und Affen durchgeführt worden und in *Tabelle 3* zusammengefasst. Im ersten Modell dieser Art wurde mit Hilfe eines Lentivirus ein pathologisches N-terminales Fragment humaner *HTT*-DNA einseitig in das Putamen von Rhesusaffen eingebracht. Unter Apomorphin-Gabe, einem Dopaminantagonisten, entwickelten die Affen choreaähnliche Bewegungen, Dystonien und ipsilaterale Drehbewegungen. In einem späteren Versuch mit bilateralen Injektionen zeigten sie auch spontan Dyskinesien der Extremitäten und des Rumpfes. In den befallenen Hirnregionen konnten *HTT*-Aggregate, reaktive Gliose und Neuronenverlust nachgewiesen werden (Palfi et al. 2007). Das Modell spart zwar die langen Aufzuchtzeiten, stellt aber nur unzureichend das gesamte Spektrum und den Verlauf der Erkrankung dar.

(Yang et al. 2008) injizierten das Lentivirus mit dem humanen *HTT* Exon-1-Gen in Oozyten von Rhesusaffen. Die geborenen Affen zeigten sowohl eine Varianz in den *CAG*-Wiederholungen als auch in der Häufigkeit der integrierten DNA-Kopien. Beides war in den zwei perinatal verstorbenen Makaken besonders hoch und wirkte sich auch bei den überlebenden Tieren auf die Schwere der Erkrankung aus. Ihre Symptome variierten von leichter Bewegungsstörung bis schwerer Chorea und Dystonie. Immunhistologisch waren zahlreiche *HTT*-Aggregate in Kortex und Striatum nachweisbar, jedoch fehlte die charakteristische Neurodegeneration. Dies könnte jedoch mit dem frühen Tod der meisten Affen zusammenhängen, denn das Tier rHD1 mit 29 *CAG*-Wiederholungen entwickelte über 4 Jahre nicht nur kognitive Schwächen und motorische Probleme, sondern wies im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren einen fast 50 %igen Verlust an striatalem Volumen auf. Zwei andere Affen,

die das Exon 1-10 mit ca. 70 *CAG*-Repeats exprimierten, zeigten dagegen mildere Symptome (Chan et al. 2015).

Da die Haltung von Affen kompliziert und teuer ist, wurde auch in anderen Tierarten nach potentiellen Modellen gesucht. Ein vielversprechender Kandidat ist das Schafsmodell von (Jacobsen et al. 2010). Durch Mikroinjektion von cDNA des gesamten humanen *HTT*-Gens in Oozyten konnten Schafe mit einer Polyglutaminkette von 73 Wiederholungen gezüchtet werden. *HTT* war im gesamten Gehirn der Tiere nachweisbar und vereinzelt ließen sich auch Aggregate finden. Mit Ausnahme von verringerten DARPP-32-Leveln, einem Marker für die Menge an MSN, wurde bisher noch nicht über das Auftreten von Symptomen oder anderen pathologischen Veränderungen in diesem Modell berichtet (Reid et al. 2013).

Neben Schafen wurden auch Schweine als HD-Modell gezüchtet. Sie exprimierten ein Fragment *HTT*-Gen mit 105 bzw. 160 Glutaminwiederholungen. Während keines der Q160-Tiere lebend geboren wurde, konnten fünf Q105-Ferkel generiert werden, die *HTT* exprimierten. Ein Ferkel zeigte Hyperkinesien, einige hatten Schwierigkeiten beim Säugen und nur eines der Jungen überlebte den 4. LM. Bei der Untersuchung der Hirne konnten neben Einschlusskörperchen auch eine erhöhte Caspase-3-Aktivität und vermehrte Apoptosevorgänge beobachtet werden (Yang et al. 2010). Ein weiteres Modell von (Baxa et al. 2013) exprimiert ein 548 Aminosäuren langes *HTT*-Protein mit 145 Glutaminen. *HTT* konnte hier im gesamten Gehirn nachgewiesen werden. Es bildeten sich jedoch keine Aggregate und auch nach 40 Monaten wurde noch kein HD-Phänotyp beobachtet. Bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 15 Jahren ist allerdings nicht auszuschließen, dass sich die Erkrankung erst noch entwickelt.

Trotz einiger vielversprechender Erfolge in der Entwicklung großer transgener Säugetiere ist noch viel Arbeit nötig bis verlässliche HD-Modelle mit einem stabilen HD ähnlichen Phänotyp und der entsprechenden Neuropathologie zur Verfügung stehen. Bisher zeigten die Tiere zu oft eine geringe oder interindividuell sehr stark schwankende Symptomatik. Es muss auch gelingen, fortpflanzungsfähige Nachkommen zu züchten, um die Forschung in größeren Kohorten zu ermöglichen. Zwar konnten im Schwein- und Schafsmodell bereits Nachkommen generiert werden, es war aber bisher nicht möglich eine Zuchtlinie transgener Rhesusaffen zu etablieren.

1.6.4. HD-Rattenmodelle

Der Vorteil von Ratten als Modell für HD liegt gegenüber den Mausmodellen vor allem im größeren Gehirn. Einerseits sind komplexere Verhaltens- und Bewegungsexperimente möglich,

andererseits erlaubt der größere Schädel auch chirurgische Interventionen und *in vivo* Untersuchungen wie PET/CT. Ratten werden ebenso wie Mäuse schon lange in der Forschung verwendet, ihre Physiologie und ihr Verhalten sind gut erforscht und sie sind in mancherlei Hinsicht dem Menschen näher als der Maus (Iannaccone und Jacob 2009).

Bisher wurden zwei verschiedene Rattenmodelle für HD entwickelt und kurz in *Tabelle 3* zusammengefasst. Das Erste ist das Modell von (Horsten et al. 2003). Hier wurde die 1962 bp langes Fragment cDNA des humanen *HTT*-Gens mit 51 *CAG*-Repeats in das Rattengenom eingebracht. Als Promotor diente der endogene Ratten-*HTT*-Promotor. Die Ratten zeigten ophistotone Kopfbewegungen, entwickelten jedoch insgesamt nur wenig offensichtliche motorische Auffälligkeiten. Ab dem 10. LM verschlechterte sich die Koordination, was in der geringeren Performance der transgenen Tiere im Rotarod-Versuch zu sehen war. Noch vor dem Einsetzen motorischer Symptome konnte in zahlreichen Arbeiten Veränderungen der Emotion, Kognition und des Entscheidungsverhalten (Nguyen et al. 2006; Fink et al. 2012; Kirch et al. 2013; Zeef et al. 2012; Cao et al. 2006; El Massioui et al. 2016) nachgewiesen werden. Zum Todeszeitpunkt, welcher meist um den 24. LM lag, waren die transgenen Tiere 20 % leichter als die WT-Gruppe.

In *in-vivo* Untersuchungen mittels FDG-PET waren zwar keine Unterschiede der Stoffwechselaktivität der verschiedenen Hirnareale gegenüber den Wildtyp-Ratten feststellbar (Reilmann et al. 2015). In der pathologischen Untersuchung fanden sich dennoch vergrößerte Ventrikel, die mit einer Atrophie des Septums sowie des Striatums einhergingen. Auch die Dicke des Kortex zeigte sich leicht reduziert. Ab dem 12. LM waren Einschlusskörperchen nachweisbar, deren Dichte mit der Zeit zunahm und am häufigsten in Striatum, Pallidum und Amygdala zu finden war (Kantor et al. 2006; Petrasch-Parwez et al. 2007). Andere fanden schon ab dem 6. LM Einschlüsse und machten diese auch in der Substantia nigra, Thalamus und Kortex aus (Nguyen et al. 2006).

Im zweiten Rattenmodell von (Yu-Taeger et al. 2012) wurde ein BAC, welches das komplette humane full-length-*HTT* mit 97 *CAG*-Wiederholungen und allen regulierenden Einheiten enthielt, in das Rattengenom eingebracht. Von den 21 Ursprungsratten wurden die Linien LY.005 (TG5) und LY.009 (TG9) für alle weiteren Experimente verwendet, da im Screening mit PCR und Western-Blot hier die größte Menge an mRNA bzw. Protein gefunden wurde. In allen Bewegungsexperimenten zeigten die TG5-Ratten die deutlichsten Einschränkungen. Im Rotarod-Test war ab dem 1. LM und noch deutlicher ab dem 4. LM eine Verschlechterung zu sehen. Ausschließlich in der Gruppe der transgenen Ratten drehten sich einige Tiere entgegen der Laufrichtung und fingen an rückwärts zu hüpfen. Des Weiteren traten schon ab der 3.

Woche das auch schon in Mausmodellen beobachtete, „claspig“ auf und ab dem 14. LM konnten zudem Gangauffälligkeiten registriert werden. Andere bemerkten außerdem ein erst hyperaktives Verhalten, dass ab dem 4. LM in Hypoaktivität überging (Abada et al. 2013b). Auch in den Verhaltenstests waren BACHD-Ratten schon ab dem 1. LM auffällig. Sie zeigten reduziertes Angstverhalten (Yu-Taeger et al. 2012), verringertes Lernvermögen (Abada et al. 2013a) und Langzeitgedächtnis sowie geringere Impulskontrolle (Manfre et al. 2016; Clemensson et al. 2017b) und ein ineffizientes Entscheidungsverhalten (Adjeroud et al. 2015). Obwohl BACHD-Ratten das gleiche Körpergewicht wie die Wildtyp-Ratten besaßen, zeigten sie dennoch ein verringertes Hungergefühl sowie motorische Probleme bei der Nahrungsaufnahme. Ein wichtiger Störfaktor, der bei der Planung bzw. Bewertung von Verhaltenstests beachtet werden muss (Jansson et al. 2014; Clemensson et al. 2017a).

Die immunhistochemische Färbung gegen HTT mit dem AK S830 lässt ab dem 3. LM intranukleäre und zytosolische Einschlusskörperchen im gesamten Hirn sichtbar werden. Besonders deutlich zeigen sich die Ablagerungen im Neokortex und limbischem System (Ncl. accumbens, Hippocampus, Stria terminalis, Amygdala), weniger im Thalamus und Hypothalamus und nur in geringen Mengen im Striatum und Cerebellum. Bei Untersuchungen des Striatums mit Färbungen gegen Calbindin fiel außerdem eine Abnahme der striosomalen Anteile um 29 % auf (Yu-Taeger et al. 2012).

Tabelle 3: Vergleich der wichtigsten HD Tiermodelle

„----“ nicht erwähnt, (-/+) heterozygot, (+/+) homozygot, ↓ Abnahme, ↑ Zunahme, „=“ keine Veränderung

Tiermodell	genetische Veränderung	Verhaltensauffälligkeiten	motorische Beeinträchtigung	Körpergewicht	Einschlusskörperchen	Quelle		
Knock-in-Maus	in endogenes <i>HTT</i> -Gen der Maus zusätzliche <i>CAG</i> -Triplets eingefügt, <i>CAG</i> -Länge je nach Modell 50-150	Q50 (-/+)	keine	keine	---	---	(White et al. 1997)	
		Q92 (+/+)	---	---	---	im Striatum ab 2,5. M	(Wheeler et al. 2000)	
		Q111 (+/+)	---	---	---	im Striatum ab 1,5. M		
		Q111 (-/+)	---	---	---	im Striatum ab 5. M		
		Q72-80 (-/+)	Aggressivität↑ ab 3. M	keine	=	keine	(Shelbourne et al. 1999)	
		Q150 (-/+)	Aktivität↓ ab 10. M	-vereinzelt epileptische Anfälle -„clasping“ ab 4.M -Rotarod Performance↓ ab 4M. -Gangauffälligkeiten ab 10.M (homozygote zeigten in allen motorischen Tests eine stärkere Symptomatik)	10 %↓ ab 6.M	---	dorsales Striatum, Ncl. accumbens, weniger Kortex und Hippocampus ab 10.M	(Lin et al. 2001)
		Q150 (+/+)	Aktivität↓ vor 10. M					
		Q97 (-/+)	Aktivität↑ bis 2. M Aktivität↓ ab 6. M	-keine abnormen Bewegungen -keine Gangauffälligkeiten	---	---	Striatum ab 4. M, wenig im Kortex,	(Menalled et al. 2002)
Q140 (-/+)	Aktivität↑ bis 1.M Aktivität↓ ab 4.M	-keine abnormen Bewegungen -keine Gangauffälligkeiten	=	---	Striatum, Tuberkulum olfact. ab 2.M, später auch Kortex und Hippocampus	(Menalled et al. 2003)		

Tiermodell	genetische Veränderung		Verhaltensauffälligkeiten	motorische Beeinträchtigung	Körpergewicht	Einschlusskörperchen	Quelle
R6/2-Maus	humanes <i>HTT</i> Exon 1 inkl. Promotor in Mausgenom, 150 <i>CAG</i> Repeats		-Aktivität↑ um 3. W -Aktivität↓ ab 2,5. M -Lernfähigkeit↓ ab 1,5. M	choreiforme, ungewollte stereotype Bewegungen, „clasping“, Gangauffälligkeiten, Tremor ab 1.-2. M, epileptische Anfälle, Rotarod-Performance↓ ab 1. M, stark progressiv	↓ab 2,5 M 40 %↓ präfinal	Kortex, Striatum, Cerebellum, Rückenmark, weniger Hippocampus, Thalamus, Globus pall., Subst. nigra ab 1,5 M	(Mangiarini et al. 1996); (Davies et al. 1997); (Lüesse 2001)
NT171-Maus	humane <i>HTT</i> cDNA kodierend für die ersten 171 AS in mouse prion protein promotor, <i>CAG</i> -Repeats 18, 44, 82	Q18	keine	keine	=	keine	(Schilling et al. 1999)
		Q44	keine	keine	---	---	
		Q82	Aktivität↓	-Koordination↓, Gangauffälligkeiten, „clasping“, Tremor -Rotarod-Performance↓ ab 3. M	↓ab 2.M 40-50%↓ präfinal	Kortex, Hippocampus, Amygdala, Körnerzellschicht des Cerebellum, weniger Striatum ab 6,5.M (vielleicht früher)	
HD46/100-Maus	3kB humane <i>HTT</i> cDNA kodierend für ca. 1/3 des <i>HTT</i> -Gens in Mausgenom integriert, <i>CAG</i> -Repeats 18, 46, 100	Q18	keine	keine	---	keine	(Laforet et al. 2001)
		Q46/ Q100	Aktivitätsveränderungen	vermehrtes Auftreten von „clasping“, Gangveränderungen oder Rotarod-Performance↓ ab 3. M (Q100>Q46, insgesamt schwache Symptomatik)	---	Kortex (v.a. frontal, Gyrus cinguli), Striatum ab 4,5 M (Q100>Q46, insgesamt schwache Symptomatik)	

Tiermodell	genetische Veränderung		Verhaltensauffälligkeiten	motorische Beeinträchtigung	Körpergewicht	Einschlusskörperchen	Quelle
full-length HTT- Maus	gesamte cDNA des humanen <i>HTT</i> in Mausgenom, <i>CAG</i> -Repeats 16, 48, 89	Q16	keine	keine	=	keine	(Reddy et al. 1998)
		Q48	-Aktivität↑ -Aktivität↓ ab 6. M z. T. bis Akinesie ab 7,5 M (Q48=Q89)	„clasping“ ab 6. M stereotype Bewegungen nur in Zuchtlinie mit hoher Kopienzahl	↓	Kortex, Hippocampus, Thalamus, Cerebellum, weniger Striatum	
		Q89		„clasping“ ab 2. M stereotype Bewegungen (Kreis laufen, Saltos, übermäßige Pflege) ab 5. M			
YAC- Maus	humane full- length- <i>HTT</i> samt Introns und regulierender Einheiten mit yeast artificail chromosome in das Mausgenom integriert, <i>CAG</i> - Repeats 18, 46, 76, 128	Q18/ Q46	keine	keine	=	keine	(Hodgson et al. 1999)
		Q76	Aktivität↑	„clasping“, stereotype und choreaähnliche Bewegungen des Kopfes, Koordinationsschwierigkeiten, Gangstörung ab 9. M	50 %↓ nach 12 M (nur 1 Tier)	Striatum, Tuberculum olfact. Ncl accumbens mind. ab 12 M	
		Q128	-Aktivität↑ ab 3. M -Aktivität↓ ab 6. M -depressives Verhalten ab 3. M	Rotarod-Performance↓ ab 6. M	↑ ab 3. M	Kortex, Hippocampus, Cerebellum ab 6. M, später auch Striatum und Thalamus	(Slow 2003); (Pouladi et al. 2009); (Bayram-Weston et al. 2012)
	YAC128-Stamm „shortstop“, nur <i>HTT Exon 1+2</i>	Q128	keine	keine	=	Striatum, Kortex, Hippocampus ab 9. M (keine Neurodegeneration)	(Slow et al. 2005); (van Raamsdonk et al. 2006)

Tiermodell	genetische Veränderung	Verhaltensauffälligkeiten	motorische Beeinträchtigung	Körpergewicht	Einschlusskörperchen	Quelle
BACHD-Maus	humane full-length- <i>HTT</i> samt Introns und regulierender Einheiten mit BAC integriert, 97 <i>CAG</i> -Repeats	-Ängstlichkeit↓ -depressives Verhalten -kein Unterschied in kognitiven Tests	Rotarod-Performance↓ ab 2. M Gangauffälligkeiten ab 9. M	20 %↑	mit Antikörper EM48: Kortex, Striatum ab 12. M, keine intranukleären Einschlüsse mit AK-S830: keine Einschlusskörper	(Gray et al. 2008); Pouladi et al. 2012; (Abada et al. 2013c)
tgHD-Ratte	1962bp-Fragment cDNA humanes- <i>HTT</i> in Rattengenom integriert, endogener Ratten Promotor, 51 <i>CAG</i> -Repeats	-Ängstlichkeit↓ ab 1. M -Lernen und Kognition↓ ab 9. M, homozygote ab 6. M -Impulsivität↑, sinnvolles Entscheidungsverhalten↓	-z. T. ophistotone Kopfbewegungen -Koordination↓, Rotarod-Performance↓ ab 10. M, homozygote ab 6. M	20 %↓ im 24 M	Striatum, Pallidum, Amygdala, ab 12. M auch in Subst. nigra, Thalamus, Kortex	(Horsten et al. 2003); (Kantor et al. 2006; Petrasch-Parwez et al. 2007); (Kirch et al. 2013); (El Massioui et al. 2016)
BACHD-Ratte TG5	humane full-length- <i>HTT</i> samt Introns und regulierender Einheiten mit BAC integriert, 97 <i>CAG</i> -Repeats	-Ängstlichkeit↓ ab 1. M -Lernen und Kognition↓ ab 6. M -Impulsivität↑ ab 3. M -sinnvolles Entscheidungsverhalten↓ ab 18. M	-„claspig“ ab 3. Woche -Hypoaktivität ab 4. M -Rotarod-Performance↓ ab 1. M, signifikant ab 4. M -Gangveränderungen ab 14. M	=	Neokortex, limbisches System (Ncl. accumbens, Hippocampus, Stria terminalis, Amygdala), weniger Thalamus und Hypothalamus	(Yu-Taeger et al. 2012);(Abada et al. 2013b); Adjeroud et al. 2015; Manfre et al. 2016; (Clemensson et al. 2017b)

Tiermodell	genetische Veränderung	Verhaltensauffälligkeiten	motorische Beeinträchtigung	Körpergewicht	Einschlusskörperchen	Quelle
HD-Affen	N-terminales-Fragment (171AS) humaner- <i>HTT</i> DNA mit Lentivirus ins Putamen von Rhesusaffen, <i>CAG</i> -Repeats 82	---	-choreaähnliche Bewegungen, Dystonien nach Apomorphin-Gabe -spontane Dyskinesien der Extremitäten und des Rumpfes ab 4. M	---	Putamen	(Palfi et al. 2007)
	humanes <i>HTT</i> Exon-1-Gen, mit Lentiviren in Genom von Rhesusaffen, <i>CAG</i> -Repeats 84→varierende Kopienzahl und <i>CAG</i> Länge (Instabilität zwischen 27-88 <i>CAG</i>)	mit 29 <i>CAG</i> Repeats: Lernen und Kognition↓ ab 4. M	je nach Expression und PolyQ-Länge: -intrauteriner Tod -Bewegungs- und Koordinations-schwierigkeiten, Schluckschwierigkeiten, Chorea und Dystonien → Tod nach 1 M -sporadisch, ungewollte Bewegungen und Dystonien	je nach Schwere der Erkrankung ↓ bis ↓↓	viele Aggregate in Striatum und Kortex	(Yang et al. 2008) (Chan et al. 2014)
	humanes <i>HTT</i> -Gen, 508AS (Exon1-10) inkl. humanem Promotor in Genom von Rhesusaffen, 67-72 <i>CAG</i> -Repeats	Lernen und Kognition↓ ab 16. M	-Dystonien ab 24. M -Koordination↓ ab 16. M	---	wenig/ kleine Aggregate in Striatum und Kortex	(Chan et al. 2015)
HD-Schaf	cDNA des gesamten humanen <i>HTT</i> - Gens in Schafgenom, 73 <i>CAG</i> -Repeats	keine	keine	---	ab 18. M zytosolische, ab 36. M nukleäre Einschlusskörperchen im Kortex	(Jacobsen et al. 2010); (Reid et al. 2013)

Tiermodell	genetische Veränderung	Verhaltensauffälligkeiten	motorische Beeinträchtigung	Körpergewicht	Einschlusskörperchen	Quelle
HD-Schwein	N-term. Fragment des <i>HTT</i> - Gens (208AS) in Genom von Minischweinen, 105 CAG- Repeats	---	-z. T. Schwierigkeiten zu säugen→ postnataler Tod nach Stunden bis Tagen -ein Tier ungewollte hyperkinetische Bewegungen vor Tod -ein Tier überlebt, bisher keine Symptome	↓bis↓↓	keine	(Yang et al. 2010)
	N-term. Fragment des <i>HTT</i> -Gens (548AS) in Genom von Minischweinen, 145 CAG- Repeats	keine nach 40. M	keine nach 40. M	---	keine nach 40. M	(Baxa et al. 2013)

1.6.5. Verhaltenstests von TG22-Ratten

Neben den TG5- und TG9-BACHD-Ratten zeigte auch die Zuchtlinie TG22 eine Genexpression, die eine weitere Charakterisierung als lohnend erscheinen ließ (*Abbildung 6*). Die transgene Kopienanzahl und Expression des HTT-Proteins waren mit der von TG9-Ratten vergleichbar, weshalb durch Dr. Holzmann vom Institut für Medizinische Genetik, Rostock und Prof. Wree vom Institut für Anatomie, Rostock mit Verhaltenstests begonnen wurde. Bereits ab dem ersten LM waren Defizite in der Motorik der männlichen TG22-Ratten festzustellen. Ab dem dritten LM zeigten auch die Weibchen eine signifikant schlechtere Performance auf dem Accelerod als die Wildtyp-Tiere. Die Entwicklung ist progredient, sodass z. B. 12 Monate alte transgene Männchen fast nicht mehr in der Lage sind, zu lernen auf dem Accelerod zu laufen. Außerdem waren die transgenen Ratten im gesamten Untersuchungszeitraum weniger ängstlich als die Wildtyp-Ratten und begannen ab dem 12. LM hypoaktiv zu werden. In den kognitiven Tests waren dagegen keine Auffälligkeiten festzustellen (Dr. Carsten Holzmann 2015). Die Ergebnisse der motorischen Tests sind in *Abbildung 7* dargestellt.

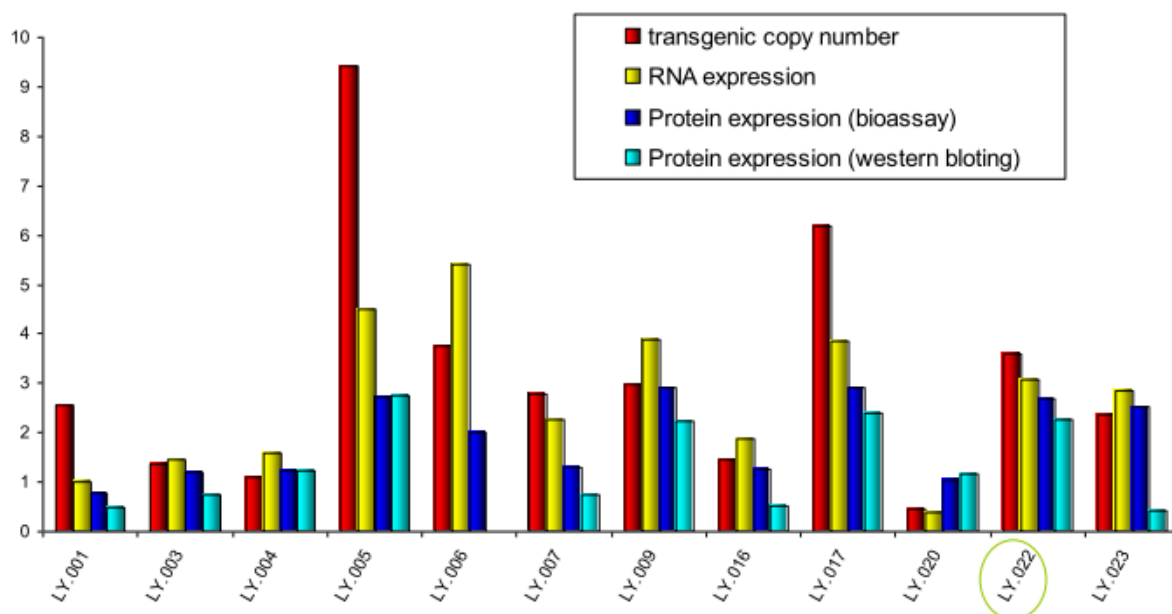


Abbildung 6: Expression vom mutiertem HTT als Vielfache des endogenen HTT in den existierenden BACHD-Linien

Linie 22 weist eine ähnlich hohe Genexpression wie die Linien 5 und 9 auf. (Yu-Täger 2013)

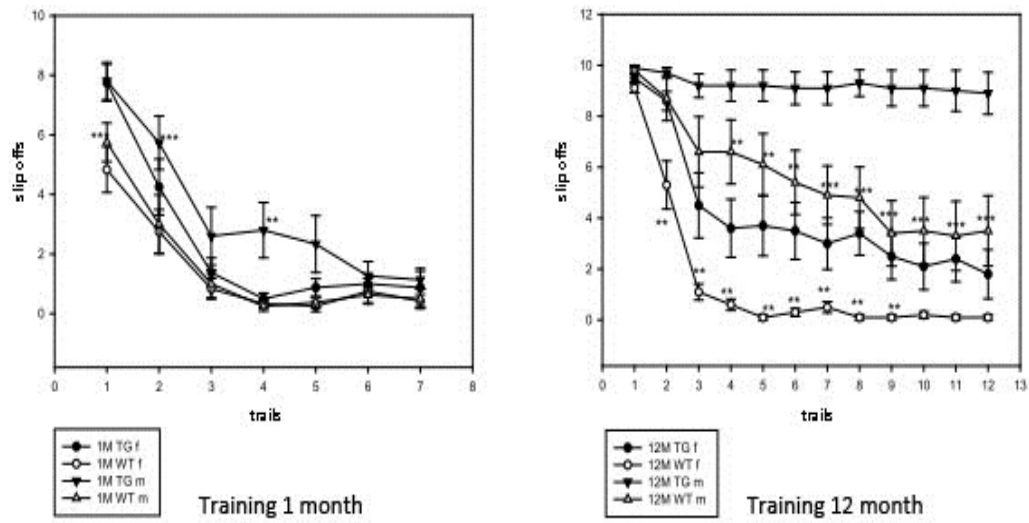
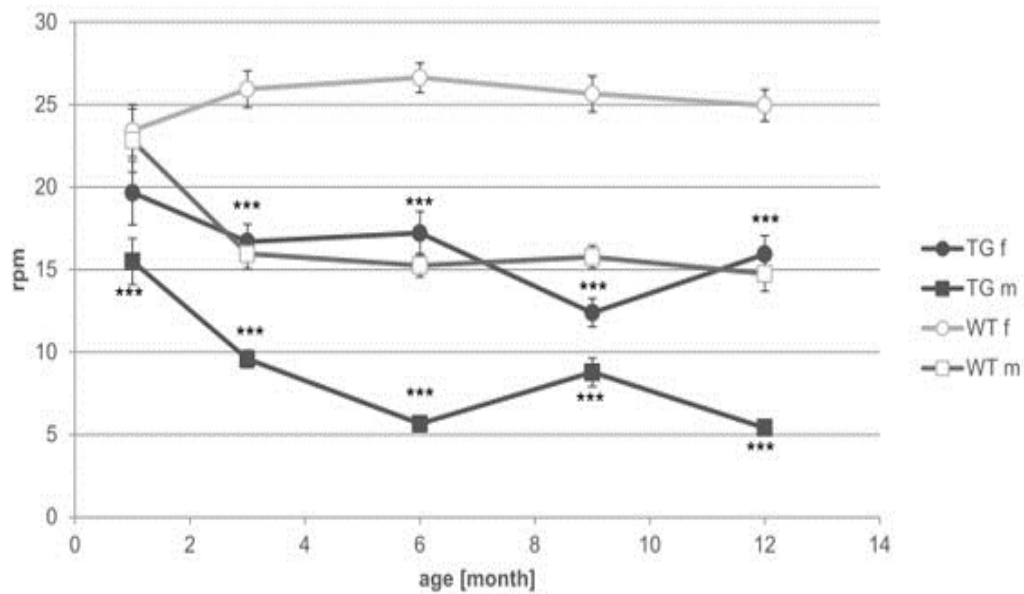
a**b**

Abbildung 7: Testung der motorischen Funktion von TG22-Ratten verglichen mit Wildtyp-Tieren

Getestet wurde mit Hilfe des Accelerod, wobei die Ratten an den Trainingstagen lernen, auf einer sich mit gleichbleibender Geschwindigkeit drehenden Walze zu laufen. In der anschließenden Testphase wird die Walze beschleunigt und maximale Drehgeschwindigkeit sowie Latenzzeit bis zum Herunterfallen protokolliert.

a) In den Trainingsläufen weisen transgene Männchen bereits ab dem 1 LM ein schlechteres Lernverhalten auf. 12 Monate alte TG22-Männchen stellen sich als fast unfähig heraus, die Aufgabe zu erlernen. Auch die transgenen Weibchen zeigen eine signifikant schlechtere Performance.

b) In der Testphase erweisen sich die transgenen Tiere jeweils signifikant schlechter als die entsprechende Wildtyp-Gruppe. (Dr. Carsten Holzmann 2015)

1.7. Fragestellung dieser Arbeit

Chorea Huntington ist eine erbliche, tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankung. Trotz der Identifizierung des mutierten Gens vor mehr als 20 Jahren steht bis heute weder eine kausale noch eine adäquate symptomatische Therapie zur Behandlung dieser verheerenden Krankheit zur Verfügung.

Auch wenn der zum Untergang der Neurone führende Pathomechanismus bisher nicht gefunden werden konnte, sind dennoch große Fortschritte in der Erforschung des Zellstoffwechsels von HTT und die Wirkung der Polyglutaminkettenverlängerung gemacht worden. An der Gewinnung dieser Erkenntnisse war die Arbeit an transgenen Tieren von besonders herausragender Bedeutung. Auch in Zukunft wird es nötig sein, eine Vielzahl verlässlicher Tiermodelle für die Erforschung von HD zur Verfügung zu haben. Jedes der Modelle bildet allerdings nur einen Teilaspekt der menschlichen Erkrankung ab und ist für einen bestimmten Forschungszweck entworfen worden. So eignen sich die verschiedenen Mausmodelle gut zur Erforschung der Neuropathologie der motorischen Störungen und zum Screening möglicher Therapieansätze in größeren Kohorten. Sie sind jedoch, limitiert durch ihr kleines Gehirn, nur sehr begrenzt für Verhaltensstudien und die Detektion kognitiver Veränderungen einsetzbar. Da große Säugetiere wie Affen oder Schweine geringe Reproduktionsraten und lange Reproduktionszeiten besitzen und ein hoher Aufwand in der Tierhaltung nötig ist, erscheint das Rattenmodell als ein guter Kompromiss, diese Lücke zu schließen.

Bisher existieren lediglich zwei unterschiedliche transgene Rattenmodelle für die Forschung an HD, wobei nur das Modell aus (Yu-Taeger et al. 2012) das gesamte humane *HTT*-Gen exprimiert. Von den ursprünglich 21 verschiedenen Zuchtlinien des Modells zeigten neben der TG5- und TG9-Linie auch die TG22-Tiere vielversprechende Ergebnisse. Neben einer hohen Zahl an mRNA-Transkripten, exprimierte die Linie eine ähnlich hohe Menge an mutiertem Protein wie die TG9-Linie. Auch die Verhaltenstestung lieferte Ergebnisse, welche eine weitere Charakterisierung sinnvoll erschienen ließen (siehe Kapitel 1.6.5.).

Im Folgenden soll daher näher darauf eingegangen werden, inwieweit sich die Neuropathologie von anderen Tier-, insbesondere Rattenmodellen, unterscheidet und welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede zum Menschen bestehen. Ein besonderer Schwerpunkt wurde hier auf die Expression von mutiertem HTT im Rattenhirn und dessen Bildung von intranukleären und zytosolischen Einschlusskörperchen gelegt. Hierfür wurden verschiedene Teile des Rattenhirns mit Hilfe von Western Blots analysiert und immunhistologische Färbungen gegen mutiertes HTT durchgeführt.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Chemikalie/ Kit	Hersteller
Agarose	Invitrogen
Ammoniumchlorid	Carl Roth
Ammoniumnickelsulfat	Carl Roth
BioTherm Taq DNA Polymerase	Genecraft
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bradford Reagenz	Bio-Rad
Criterion TGX Stain-Free Precast Gel	Bio-Rad
DePeX	Serva
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
dNTPs	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglycol	Carl Roth
Glycerol	Carl Roth
H ₂ O ₂	Merck
HEPES	Fisher Scientific
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
Immobilon-FL PVDF-Membran	Millipore (Merck)
Isopentan	Carl Roth
KCL	Carl Roth
Ketamin	Bela pharm
KH ₂ PO ₄	Carl Roth
LDS Probenpuffer	Invitrogen
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth
NaBH ₄	Carl Roth

NaCl	Carl Roth
Na-Deoxycholat	Sigma-Aldrich
NaH ₂ PO ₄	VWR
NP40	Sigma-Aldrich
Odyssey Blocking Puffer (PBS)	Li-Cor
Paraformaldehyd	VWR
Pierce Protease Inhibitor Tablets, EDTA-free	Fisher Scientific
Propanol	Sigma-Aldrich
Protein G Sepharose	Amersham
pUC19MspI Marker	Fisher Scientific
Q-Solution	QIAGEN
Saccharose	Haushaltszucker
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Serva
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura
Tris/Glycine (Towbin)	Bio-Rad
Tris/Glycine/SDS (Towbin)	Bio-Rad
Tris-Acetate-EDTA (TAE)	Fisher Scientific
TritonX100	Sigma-Aldrich
Tween20	Sigma-Aldrich
VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit	Vector Laboratories
Xylazin (Ropun)	Bayer
Xylol	J.T.Baker

2.1.2. Lösungen

„Mausmix“	
Ketamin	7,5 ml
Xylazin	2,5 ml
0,9 % NaCl	90 ml

3,7 % Paraformaldehyd-Lösung	
NaH ₂ PO ₄	4 g/l

Na ₂ HPO ₄	8,15 g/l
Paraformaldehyd	37 g/l
auf 80 °C erhitzen bis Lösung klar wird; auf pH 7,0 einstellen	

20 %ige Saccharose-Lösung	
PBS	80 ml
Saccharose	20 g

PBS (phosphate buffered saline)	
KCL	0,2 g/l
NaCl	8 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,15 g/l
auf pH 7,4 einstellen	

Waschlösung Western Blot	
0,1 % Tween20 in PBS	

Waschlösung Immunhistochemie	
0,4 % Triton x100 in PBS	

ABC- Lösung	
0,4 % Triton-X100 PBS Lösung	10 ml
Reagenz A	200 µl
Reagenz B	200 µl

DAB Lösung	
PBS	100 ml
Diaminobenzidin	10 mg

Ammoniumnickelsulfat	40 mg
Ammoniumchlorid	4 mg
H ₂ O ₂ (35 %) (erst unmittelbar vor der Färbung)	1 µl

Kryoprotektionslösung	
PBS	250 ml
Glycerol (85 %)	126 ml
Ethylenglykol	150 ml

HEPES-IP Puffer	
HEPES	50 nM
NaCl	150 mM
EDTA	10 mM
NP40	1 %
Na-Deoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %
BSA	1 mg/ml

2.1.3. Antikörper

Die Verdünnung der Antikörper im Western Blot erfolgte mit einer Lösung aus Odyssey-Blocking-Buffer und 0,1 % Tween20 in PBS im Verhältnis 3:1.

Die Verdünnung der Antikörper in IHC erfolgte mit 0,4 % Tritonx100 in PBS.

Primärantikörper:

Antikörper	Verdünnung	Verwendung	Epitop	Quelle/Hersteller
S830 AK	1:750	Western-Blot	Exon-1 mHTT	G. Bates
MAB2166	1:1 000	Western-Blot	AS 181-810	Millipore
S830 AK	1:10 000	IHC	Exon-1 mHTT	G. Bates

Sekundärantikörper:

Antikörper	Verdünnung	Verwendung	Epitop	Quelle/Hersteller
IRDye 800CW Donkey Anti- Mouse	1:15 000	Western-Blot	Maus IgG	LI-COR
IRDye800CW Rabbit Anti- Sheep	1:15 000	Western-Blot	Schaf IgG	Rockland
Rabbit Anti- Sheep IgG	1:200	IHC	Schaf IgG	Vector Lab.

2.1.4. Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Digitalkamera	CX9000	mbf Bioscience
Elektrophoresekammer PCR	MUPID-Kammer	Nippon Genetics
Elektrophoresekammer Western Blot	Criterion Cell	Bio-Rad
Geldoku-Transluminator	Criterion Stain Free Imager	Bio-Rad
Homogenisator	Precellys 24	bertin instruments
Kryostat	CM300	Leica
Mikroskop	BX51	Olympus
Objektträger	Menzel-Gläser Superfrost Plus	Thermo Scientific
Spektralphotometer	SmartSpec Plus	Bio-Rad
Thermocycler	Senoquest Labcycler	SenoQuest
Western Blot Scanner	Odyssey CLx Imaging System	Li-Cor

2.2. Methoden

2.2.1. Erstellung transgener Ratten

Die transgenen BACHD-Ratten wurden von der Arbeitsgruppe Yu-Taeger erstellt und die Zuchtlinie TG22 vom Institut für Medizinische Genetik der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

Hierfür wurde das gesamte humane *HTT*-Gen samt seiner regulatorischen Einheiten mit Hilfe des Vektors BAC (bacterial artificial chromosome) in den Pronucleus der Oozyten von Sprague Dawley-Ratten durch Mikroinjektion integriert, wobei das Exon-1 der *Huntingtin*-DNA 97 Wiederholungen der *CAG/CAA*-Sequenz enthielt (Yu-Taeger et al. 2012).

2.2.2. Haltung der Tiere

Heterozygot transgene BACHD-Ratten vom Institut für Medizinische Genetik der Universität Tübingen wurden jeweils mit Wildtyp Sprague Dawley-Ratten verpaart bis eine Population von 51 männlichen und weiblichen heterozygoten HD-Ratten entstand. Gleichzeitig wurde eine etwa gleich große Kontrollgruppe gesunder Wildtyp-Ratten gehalten. Alle Tiere erhielten freien Zugang zu Standardnahrung und Wasser und waren einem künstlichen 24-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus und einer Raumtemperatur 22°C +/-2 °C ausgesetzt. Die eindeutige Zuordnung des Tieres wurde durch einen implantierten Chip ermöglicht. Die Haltung der Ratten entsprach den Vorgaben des geltenden Tierschutzrechtes.

2.2.3. Genotypisierung

Während des Absetzens wurden zur Überprüfung des Genotyps von allen Ratten Schwanzbiopsien entnommen. Zur Extraktion der DNA wurde das High Pure PCR Template Präparation Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet und anschließend das Exon-1 des *HTT*-Gens mittels PCR amplifiziert. Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

Thermocycler Programm:

Probe	Ratten DNA
Primer 1	<i>HTT Exon1 F (Hu4)</i> <i>ATGGCGACCCTGGAAAAGCTG</i>
Primer 2	<i>HTT Exon1 R</i> <i>TGGTCGGTGCAGCGGCTCCTC</i>

Zyklen	1x		35x		1x	
	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit
Denat.	95	02:00	94	00:30		
Anneal.			60	00:30		
Extens.			72	01:00	72	06:00
Gesamtdauer	01:18:00					

Reaktionsansatz:

DNA	2,00 µl
10x Puffer	2,50 µl
dNTPs	4,00 µl
Primer 1	1,00 µl
Primer 2	1,00 µl
Q-Solution	5,00 µl
Biotherm Taq	0,13 µl
Wasser	9,38 µl

Stammlösungen	
dNTP	2 mM
Primer	10 µM
Q-Solution	5x conc.

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %-igen Agarosegel elektrophoretisch in TAE aufgetrennt. Als Größenmarker wurden 500 ng pUC19 *MspI* aufgetragen. Im Falle des endogenen *Huntingtins* der Ratte wurde ein Produkt von 270 bp erwartet, für das mutierte humane *Huntingtin* ein Produkt von 492 bp.

2.2.4. Tötung der Ratten und Fixierung der Gehirne

Die Ratten wurden mit Isofluran anästhesiert, gewogen und durch eine intraperitoneale Injektion einer Überdosis Ketamin und Xylazin getötet. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und das rechte Herzohr sowie der linke Ventrikel aufgeschnitten. Über den so präparierten Zugang zur Aorta konnte der Körperkreislauf mit Hilfe einer stumpfen Glaskanüle zuerst mit ca. 250 ml kalter 0,9 %-iger Kochsalzlösung gespült und daraufhin mit ca. 500 ml kalter 3,7 %-iger Paraformaldehyd-Lösung perfundiert werden. Nach Entnahme und Wiegen der Gehirne wurden diese bei ca. 4 °C in 3,7 %-iger Paraformaldehydlösung über Nacht nachfixiert. In 20 %-iger Saccharose-Lösung wurden die Gehirne 48 h bei 4 °C kryoprotectiert. Schließlich wurden die Gehirne durch 5-minütiges Eintauchen in -50 °C kaltem Isopentan schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.5. SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot

Proteinextrakte

Gehirne wurden von heterozygot transgenen und Wildtyp-Ratten entnommen, in Bulbus, Cerebellum, Hirnstamm, Hypothalamus, Hippocampus, Kortex und Striatum unterteilt und Proteinextrakte präpariert. Das Gewebe wurde in Precellys-Homogenisator-Tubes überführt und mit Proteaseinhibitoren versetzt. Nach 20-minütiger Homogenisation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der entstandene Gewebepulver mit HEPES IP-Puffer versetzt. Immunglobuline wurden mit Protein G-Sepharose gebunden, alles für 15 min bei 4 °C mit 16200 x g zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford.

SDS-Gelelektrophorese

20 µg Proteinextrakt wurden mit 4 x LDS-Probenpuffer mit DTT für 10 min bei 70 °C denaturiert und auf TGX Stain-Free Gelen 90 Minuten lang bei einer Spannung von 200 V in Tris Glycine SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Nach Elektrophorese wurden die Gele für 5 min mit UV-Licht ($\lambda=602$ nm) gefärbt und anschließend fotografiert.

Western-Blot

Der Transfer auf PVDF-Membran erfolgte für 5 h bei einer Spannung von 78 V und 4 °C in Towbin Transferpuffer 20 % Methanol. Zur Kontrolle des Transfers wurden Gel und Membran erneut unter UV-Licht detektiert. Anschließend wurde die Membran 1 h bei 4 °C mit Odyssey Blocking Buffer geblockt und über Nacht mit Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal für 5 min in PBS-T bei 4 °C gewaschen und 1 h mit Sekundärantikörper inkubiert, erneut für 3-mal 5 min in PBS-T bei 4 °C gewaschen und in einem LI-COR Odyssey Scanner detektiert.

2.2.6. Erstellung von Gefrierschnitten

Für die histologische Untersuchung wurden von den Gehirnen mit Hilfe eines Kryostaten 30 µm dicke frontale Parallelschnitte angefertigt. Die Aufarbeitung erfolgte jeweils vom Beginn des Corpus callosum bis zum Beginn des Mesencephalon. Hierfür wurden die Gehirne mit dem Hirnstamm auf einem Aluminiumstempel ausgerichtet und mittels TissueTek fixiert. Der Stempel wurde in den Objekthalter des Kryostaten eingesetzt und nachjustiert. Die ersten

beiden Hirnschnitte einer Serie wurden dabei noch im Kryostaten direkt auf Objektträger aufgenommen und anschließend Nissl und HE gefärbt. Die restlichen fünf Schnitte der Serie wurden mit einem Pinsel in 48-Well Multiwell-Platten überführt, die mit Kryoprotektionslösung befüllt waren, wobei jedes Well am Ende 2 Schnitte enthielt. Diese Gehirnschnitte wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.2.7. Immunhistochemie

Die Färbung fand frei flottierend in 24 bzw. 48 Well-Platten mit je 2 Hirnschnitten pro Well statt. Die bei -20 °C in Kryoprotektionslösung gelagerten Schnitte wurden bei Raumtemperatur erwärmt und für 20 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min mit 0,5 % Natriumborhydrid/PBS Lösung vorbehandelt und zweimal mit 0,4 % Triton-X100 PBS Lösung für 15 min gespült. Danach wurden die Hirnschnitte über Nacht bei 8 °C mit dem Primärantikörper S830 inkubiert, um nach erneutem zweimaligen Waschen für je 15 min mit 0,4 % Triton-X100 PBS Lösung bei Raumtemperatur für 2 h mit dem Sekundärantikörper AntiSheep zu reagieren. Es folgte die Überführung in die ABC Lösung für 75 min sowie zwei weitere Waschvorgänge in PBS à 15 min. Zuletzt wurden die Schnitte mit DAB für 12 min unter Sicht gefärbt, mit PBS gewaschen und auf Objektträger aufgezogen. Auf einer Heizplatte wurden sie dann bei ca. 40 °C getrocknet, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit DePeX eingedeckelt.

2.2.8. Erstellung lichtmikroskopischer Bilder

Zur Auswertung der immunhistologischen Schnitte wurden mit dem Mikroskop (Olympus BX51) und der daran justierten Kamera (CX9000 mbf Biosience) Fotos in 400-facher Vergrößerung angefertigt.

2.2.9. Automatische Auswertung der Immunhistologie

Zur quantitativen Erfassung der Einschlusskörperchen wurden von 15 Monaten alten, transgenen und Wildtyp-Ratten Fotos des Gyrus dentatus in 400-facher Vergrößerung generiert. Es wurden pro Gruppe je sechs Tiere untersucht, wobei in jedem Tier vier 300 x 225 µm große Sichtfelder betrachtet wurden.

Die Quantifizierung der Einschlusskörperchen wurde in digitalen Graustufenbildern mit 256 Graustufen durchgeführt. Die Bilder wurden mittels eines Matlab-Skriptes (Mathworks) geladen. Zur Erkennung der Einschlüsse wurde der angenommene Grauwert eines Aggregates

gegenüber dem Hintergrund definiert und in sechs unterschiedlichen Empfindlichkeitsstufen variiert. Für jeden Segmentierungsbereich wurden Menge und Fläche der markierten Einschlusskörperchen erfasst. Anschließend wurde für jedes digitale Bild manuell das Segmentierungsniveau mit der größten Übereinstimmung zwischen den roten Markierungen und den Einschlusskörperchen festgelegt (*Abbildung 8*). Mit diesem Vorgehen konnten fehlerhafte Erfassungen von Strukturen aufgrund von Artefakten und Färbemhomogenitäten vermieden werden. Nur die Daten dieses Niveaus wurden berücksichtigt und mit Hilfe von Tabellenkalkulation (Excel) und Statistikprogramm (SPSS) ausgewertet.

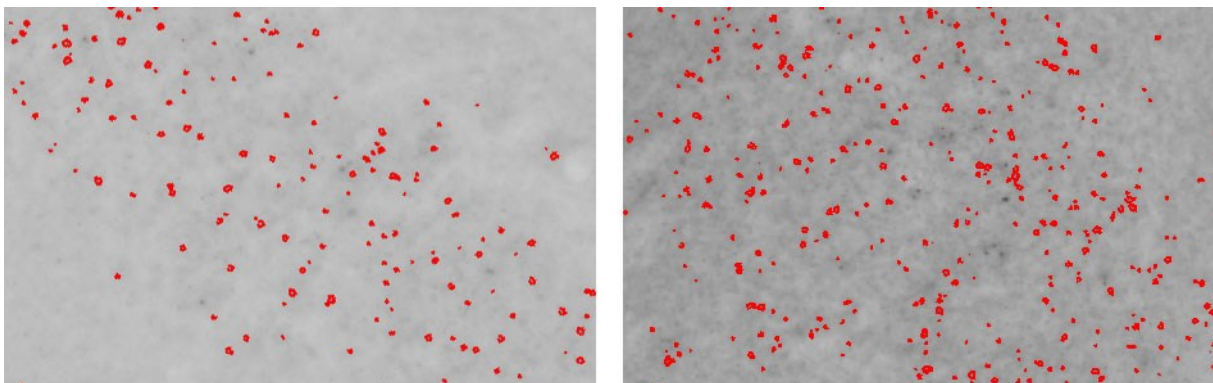


Abbildung 8: Automatische Erkennung von Einschlusskörperchen im Gyrus dentatus einer 15 Monate alten Ratte.

Einschlüsse wurden in verschiedenen Segmentierungsniveaus mit unterschiedlicher Sensitivität erkannt und markiert. Links: niedriges Segmentierungsniveau, das annähernd den vorhandenen Aggregaten entspricht. Rechts: hohes Segmentierungsniveau, das viele falsch positive Ergebnisse liefert.

2.2.10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS. Neben dem arithmetischen Mittel wurde jeweils der Standardfehler des Mittelwertes ermittelt und angegeben. Anschließend wurden die ermittelten Unterschiede auf Signifikanz getestet. Da zumeist der Stichprobenumfang <30 war und/oder keine Normalverteilung der Stichproben im Kolmogorow-Smirnow-Test herrschte, wurde mit Hilfe des nichtparametrischen U-Test (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) auf Signifikanz untersucht (Janssen und Laatz 2017, S. 314–315). Lediglich die Auswertung der HTT-Einschlusskörperchengröße in 3.5.2 konnte mit dem T-Test durchgeführt werden. Die Ergebnisse wurden ab einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ als signifikant und ab $\alpha=0,001$ als hoch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Körpergewicht

Die Ratten wurden nach dem Geschlecht aufgeteilt und die Gewichte innerhalb einer Altersgruppe zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren verglichen. Bei der Prüfung anhand dieser Gegenüberstellung ließ sich bei den männlichen Tieren bezüglich des Gewichtes kein signifikanter Unterschied (U-Test, $p > 0,05$) zwischen kranken und gesunden Tieren feststellen. Bei den Weibchen war in den Altersspannen von 3-4 Monaten, 7-8 Monaten und 11-12 Monaten ein signifikanter Unterschied im Körpergewicht messbar (U-Test, $p_{(3-4)} < 0,05$; $p_{(7-8)} < 0,01$; $p_{(11-12)} < 0,05$). Während die transgenen Weibchen mit 3-4 Monaten im Mittel noch minimal leichter waren ($\Delta m = 10,7$ g), sind sie mit 7-8 Monaten und 11-12 Monaten schwerer als die Wildtyp-Tiere ($\Delta m = 75$ g bzw. $\Delta m = 72,3$ g). Da allerdings die Körpergewichte 9 Monate, 14-15 Monate und 20 Monate alter weiblicher Tiere keinen signifikanten Unterschied aufwiesen und die Stichprobengröße transgener Weibchen sehr gering ist (für 7-8 Monate alt: $n=4$; für 11-12 Monate alt: $n=2$), liegt hier vermutlich ein Fehler 1. Art vor. Die Ergebnisse der Körpergewichtsmessung sind in *Abbildung 9* graphisch dargestellt.

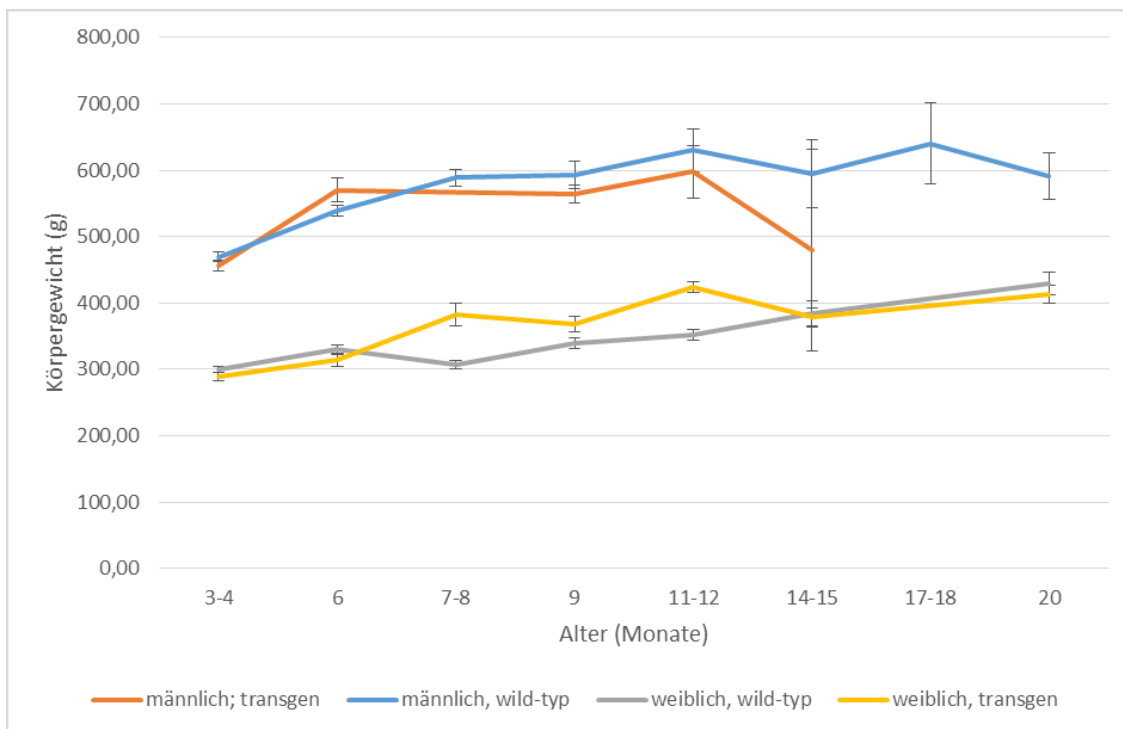


Abbildung 9: Entwicklung des Körpergewichts der BACHD-Ratten gegenüber den Wildtyp-Tieren

Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Es sind jedoch über die gesamte Zeit keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren festzustellen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

3.2. Hirngewicht

Die Ratten wurden nach Geschlechtern aufgeteilt und die Hirngewichte der transgenen Ratten mit den Wildtyp-Tieren verglichen. Die transgenen Männchen zeigen über die gesamte beobachtete Zeit geringere Hirngewichte als die Männchen der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede sind dabei allerdings nur für das Alter 3-4 Monate (U-Test, $p < 0,05$) feststellbar. Die gemessenen Hirngewichte der weiblichen Ratten unterliegen sehr starken Schwankungen. Während die Hirne der transgenen Weibchen im Alter von 3-4 Monaten noch signifikant leichter waren (U-Test, $p < 0,05$), waren sie mit 7-8 Monaten im Durchschnitt signifikant schwerer als die der Wildtyp-Gruppe (U-Test, $p < 0,05$), wohingegen sie sich mit 11-12 Monaten wieder signifikant leichter zeigten (U-Test, $p < 0,01$). Mit 9 Monaten erreichten die transgenen Weibchen bereits ein Hirngewicht von $2,232 \text{ g} \pm 0,031 \text{ g}$ und auch mit 20 Monaten wiesen die Ratten noch ungefähr das gleiche Hirngewicht auf ($2,234 \text{ g} \pm 0,064 \text{ g}$). Allerdings sanken im Zeitraum vom 9. bis zum 15. Monat die gemessenen Hirngewichte auf bis zu $2,11 \text{ g} \pm 0,055 \text{ g}$ ab.

Ähnlich starke Schwankungen sind in der Hirngewichtsentwicklung der Wildtyp-Weibchen zu beobachten. Im 6. Monat wiegen die Hirne im Schnitt $2,19 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$, fallen dann bezüglich des Gewichtes im 7.-8. Monat gegenüber dem Vormonat nicht signifikant auf $2,13 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ (U-Test, $p > 0,05$), steigen wiederum im 11.-12. Monat (gegenüber dem 9. Monat signifikant (U-Test, $p < 0,05$)) auf $2,31 \text{ g} \pm 0,03 \text{ g}$ an und weisen schließlich im 14.-15. Monat und 20. Monat wieder Gewichte ($2,20 \text{ g} \pm 0,06 \text{ g}$ bzw. $2,20 \text{ g} \pm 0,04 \text{ g}$) ähnlich denen auf, die im 9. Monats gemessen wurden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in *Abbildung 10* dargestellt.

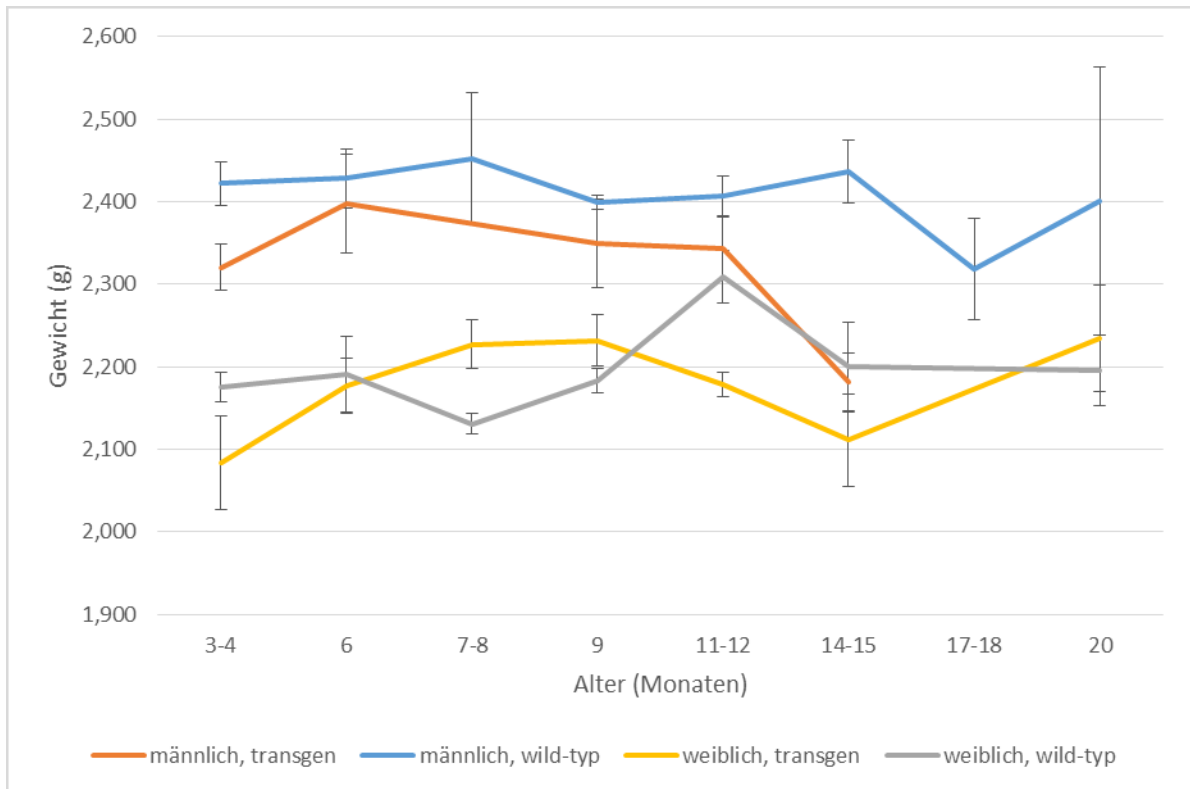


Abbildung 10: Hirngewichte der BACHD-Ratten verglichen mit Wildtyp-Tieren

Es bestehen Unterschiede im Gewicht der Rattenhirne zwischen den Geschlechtern. Zwischen transgenen und Wildtyp-Ratten sind keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen, die auf eine Hirnatrophie schließen lassen könnten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

3.3. Genotypisierung

Alle Ratten wurden nach dem Absetzen mittels PCR auf ihren Genotyp überprüft. *Abbildung 11* zeigt das Amplifikat des *HTT* Exon-1 transgener Ratten neben dem der Wildtyp-Tiere. Bis auf ein Tier, das daraufhin von der weiteren Betrachtung ausgeschlossen wurde, zeigten alle als transgen erwarteten Ratten das Amplifikat des mutierten *HTT* Exon-1 bei 492 kB. Auf der anderen Seite wurde bestätigt, dass alle Wildtyp-Tiere lediglich das Exon-1 des endogenen Ratten-*HTT* tragen.

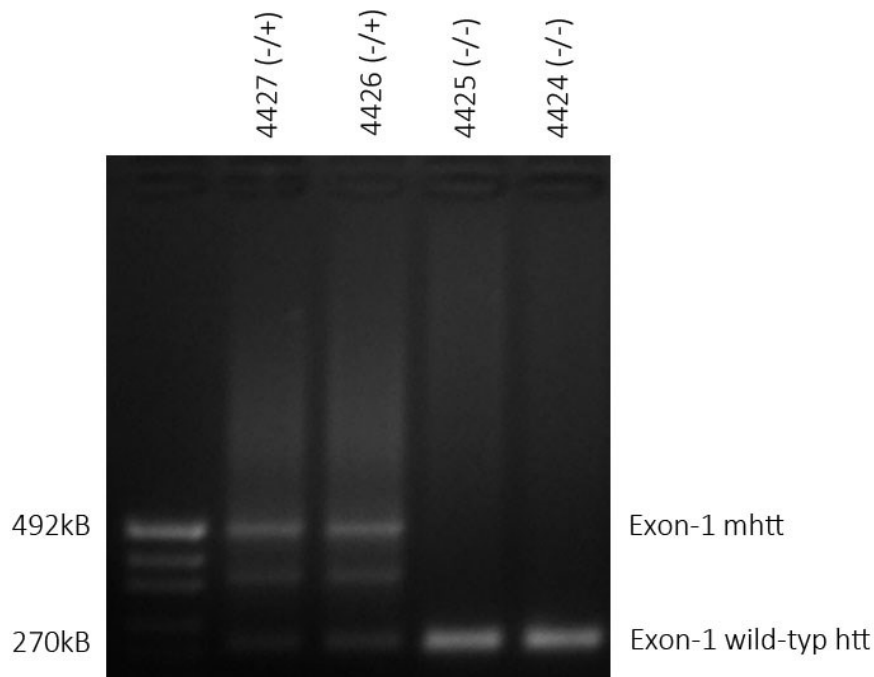


Abbildung 11: PCR von zwei transgenen (links) und zwei Wildtyp (rechts) Ratten.

Die transgenen Tiere weisen sowohl eine Bande bei 492 kB für das Exon-1 von mutiertem htt, als auch bei 270 kB für das Exon-1 des endogenen htt auf. Die zusätzlichen Banden sind Artefakte, sogenannte Shadow bands, die bei der Amplifikation von langen Trinukleotid-Repeat-Sequenzen entstehen. Die Wildtyp-Tiere zeigen lediglich endogenes htt.

3.4. Western-Blot

Um die Verteilung von HTT im Gehirn zu erfassen, wurden Western-Blots aus Lysaten von sieben Hirnregionen (Bulbus, Cerebellum, Hirnstamm, Hypothalamus, Hippocampus, Kortex, Striatum) angefertigt. Angefärbt wurde mit dem Primärantikörper MAB2166, der sich gegen die AS 181-810 des HTT richtet. Er erkennt sowohl endogenes als auch mutiertes HTT. Entsprechend war auf Grund des unterschiedlichen Migrationsverhaltens der verschiedenen HTT-Proteine in den heterozygoten Tieren eine charakteristische Doppelbande zu beobachten. Sie lässt darauf schließen, dass sowohl endogenes als auch mutiertes HTT in etwa gleicher Menge exprimiert werden. Außerdem zeigt der Western-Blot in *Abbildung 12*, dass mutiertes HTT im gesamten Hirn zu finden ist. Besonders hohe Expressionslevel treten dabei im Hippocampus und Kortex auf. Während die anderen Regionen mittlere Mengen aufwiesen, war im Hirnstamm weder endogenes noch mutiertes HTT sichtbar.

Die untersuchten Tiere wurden in einem weiteren Western-Blot mit dem Antikörper S830 auf mutiertes HTT untersucht. *Abbildung 13* zeigt klar die Spezifität des Antikörpers für HTT mit verlängerter Polyglutaminkette. Während beim Wildtyp-Tier keine Banden sichtbar sind, weist das transgene Tier eine deutliche Bande für full-length mutant-HTT auf sowie zusätzlich mehrere schwächere Banden für posttranslational entstandene HTT-Fragmente, die das mutierte Exon-1 besitzen.

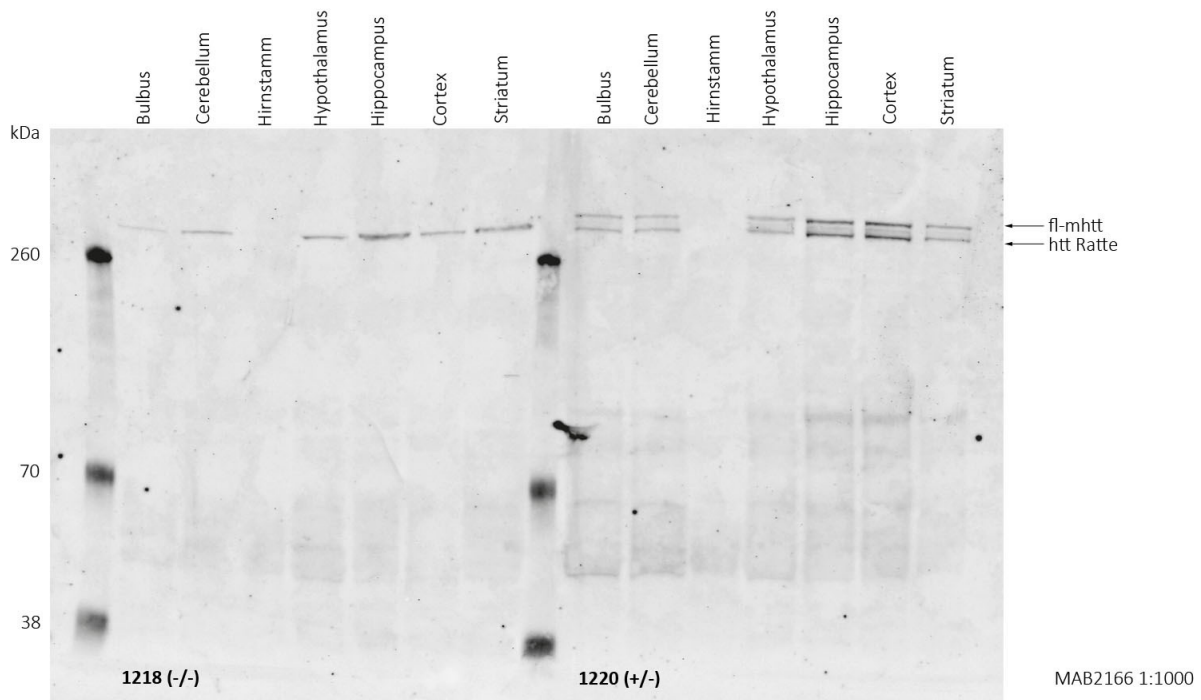


Abbildung 12: Western-Blot mit dem AK MAB2166 verschiedener Hirnregionen einer Wildtyp (links) und einer transgenen (rechts) Ratte

Der Primäranantikörper MAB2166 weist sowohl endogenes HTT der Ratte als auch mutiertes Huntingtin nach. Während im Wildtyp-Tier in fast allen Hirnregionen nur eine Bande für das endogene HTT zu sehen ist, zeigt das transgene Tier eine zusätzliche Bande für mutiertes HTT. Besonders hohe Mengen lassen sich im Hippocampus und Cortex finden, wohingegen im Hirnstamm weder endogenes noch mutiertes HTT exprimiert wird.

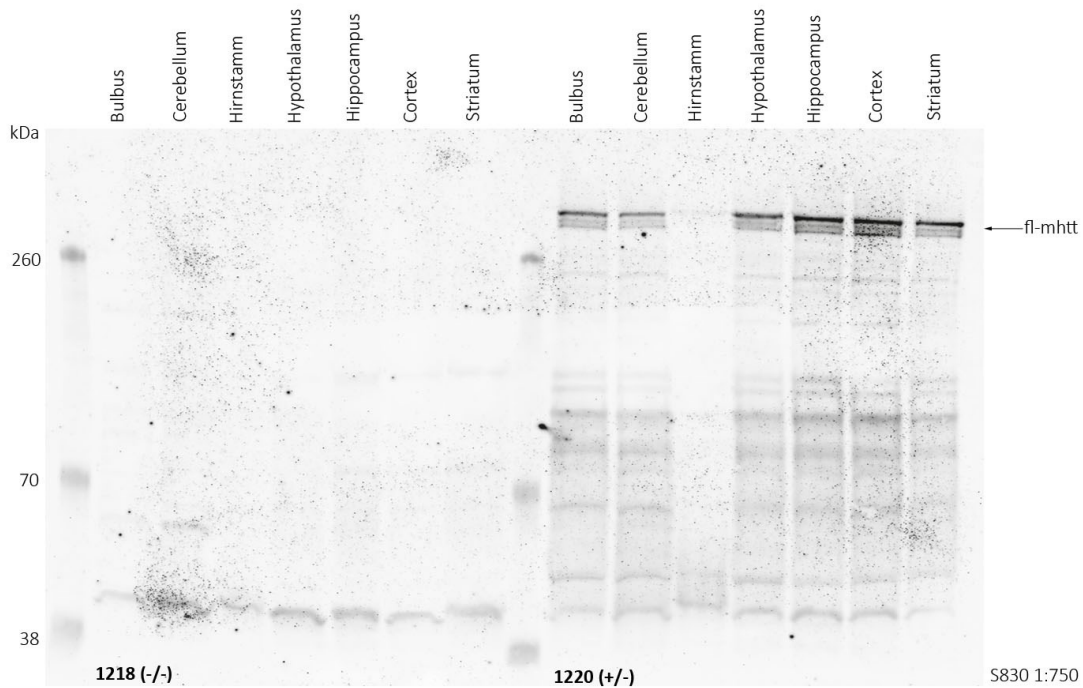


Abbildung 13: Western-Blot mit dem AK S830 verschiedener Hirnregionen einer Wildtyp (links) und einer transgenen (rechts) Ratte

Der Primärantikörper S830 weist spezifisch mutiertes Huntingtin nach. Wildtyp-Tiere zeigen kein mutiertes htt, wohingegen es in transgenen Tieren in fast allen Regionen des Hirns nachweisbar ist. Besonders hohe Mengen lassen sich im Hippocampus und Cortex finden. Lediglich der Hirnstamm weist kein htt auf. Neben der Bande für fl-mhtt sind weitere schwächere Banden sichtbar, die durch die htt-Fragmente nach der Spaltung durch Caspasen hervorgerufen werden.

3.5. Immunhistochemie

3.5.1. Qualitative Auswertung der Huntingtin-Aggregate

Ein Charakteristikum von HD sind intranukleäre und zytosolische Einschlusskörperchen, die sich ausschließlich in erkrankten Gehirnen nachweisen lassen. Um zu untersuchen, ob diese auch in TG22-Ratten zu finden sind, wurden Hirnschnitte von transgenen und Wildtyp-Tieren verschiedenen Alters mit dem Antikörper S830 gefärbt.

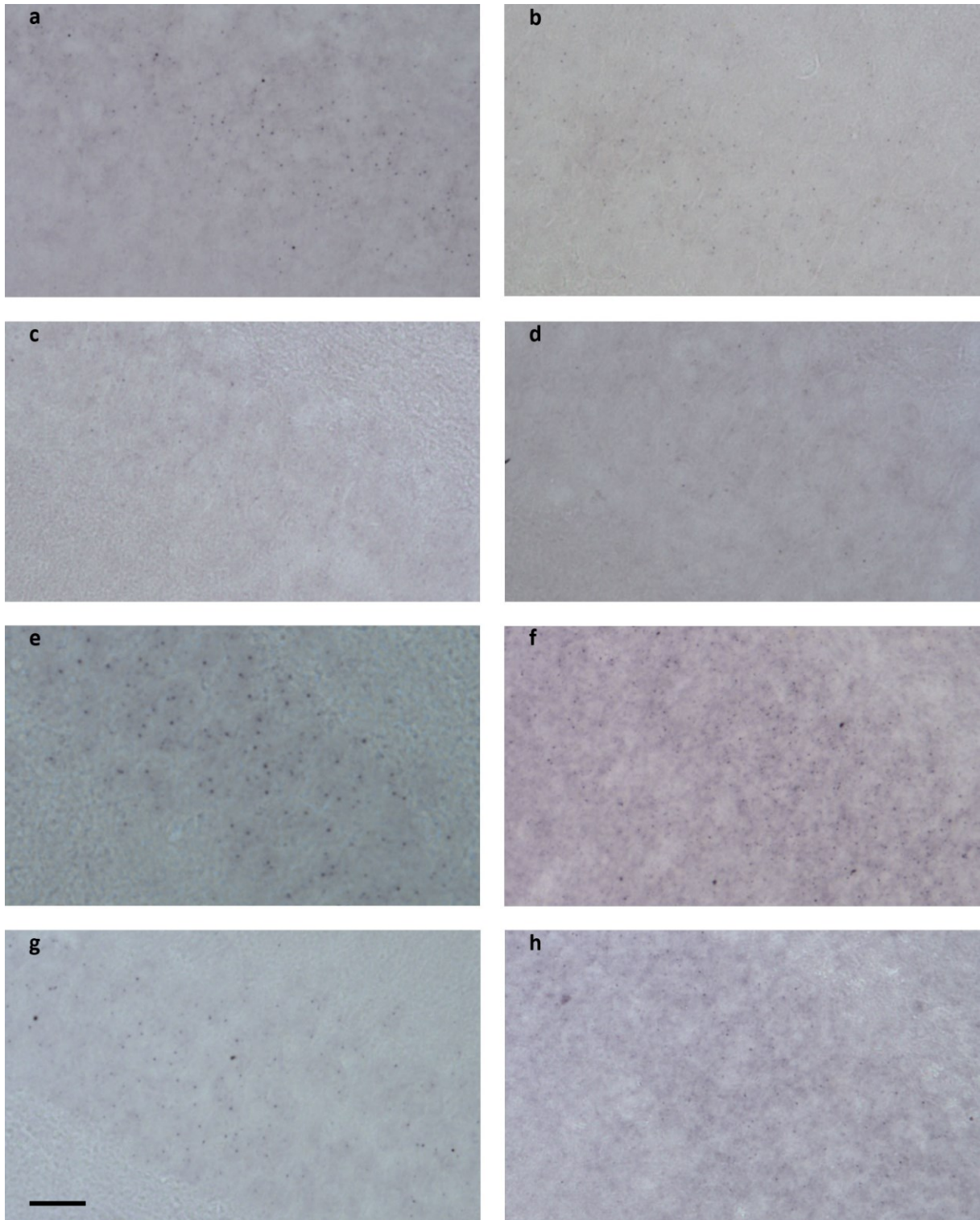


Abbildung 14: IHC-Färbungen mit dem AK S830 des Gyrus dentatus von Wildtyp (links) und transgenen (rechts) Tieren verschiedenen Alters.

a)+b) 3 Monate, b)+c) 9 Monate, e)+f) 15 Monate, g)+h) 20 Monate

Der Maßstabsbalken entspricht 20µm

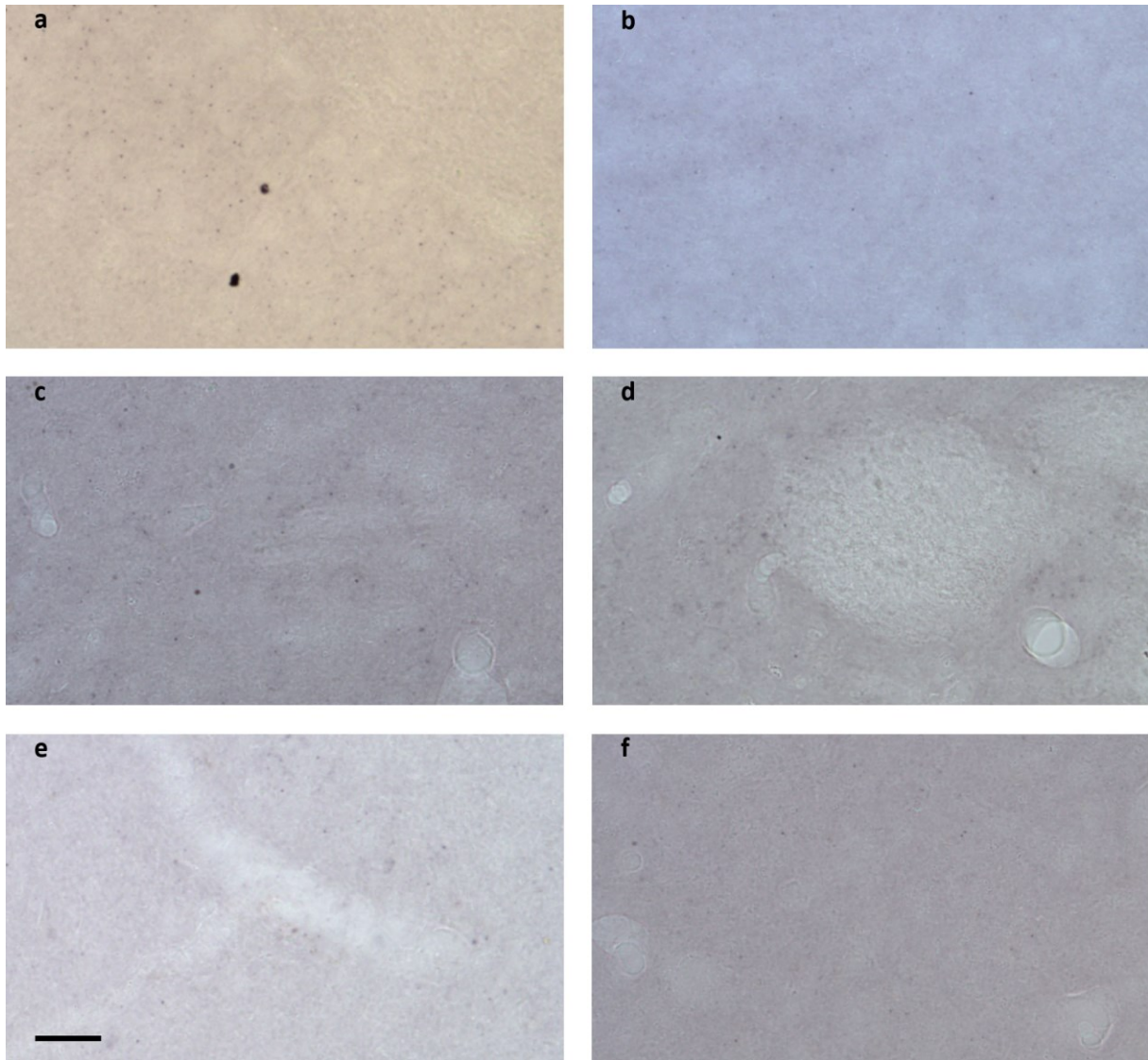


Abbildung 15: IHC-Färbungen mit dem AK S830 verschiedener Hirnregionen einer 15 Monate alten transgenen Ratte.

a) Gyrus dentatus b) Cortex c) Ncl. accumbens d) Striatum e) Ncl. stria terminalis f) Amygdala,
Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.

Wie *Abbildung 14* zeigt, waren bereits ab dem 3. LM nicht nur in den transgenen sondern auch in den Wildtyp-Tieren punktförmige Ablagerungen nachweisbar. Es ist nicht erkennbar, dass diese mit dem Alter an Größe oder Häufigkeit zunehmen. Auch innerhalb einer Altersklasse herrschten große individuelle Unterschiede: Während bei einigen Tieren in bestimmten Hirnarealen zahlreiche Einschlüsse zu sehen waren, fanden sich andere Individuen mit sehr geringem bzw. ohne jeden Nachweis von Aggregaten. Darüber hinaus war kein Unterschied zwischen den Geschlechtern feststellbar.

Am häufigsten und ausgeprägtesten waren die Aggregate im Hippocampus, dort vor allem im Stratum granulosum des Gyrus dentatus, nachweisbar. Häufig zeigte auch der Kortex

Einschlüsse, wobei diese vorrangig im cingulären Kortex auftraten. Während im Striatum und Ncl. accumbens weniger aber trotzdem regelmäßig Aggregate zu beobachten waren, konnten im Nucleus striae terminalis und den Amygdalakernen nur selten Einschlüsse entdeckt werden. Die Einschlüsse sind zumeist rundlich geformt und besitzen einen Durchmesser zwischen 0,8 μm und 1,6 μm . Die Verteilung der Aggregate scheint auf die Perikarya konzentriert. Eine Abgrenzung von intranukleären Einschlüssen ist mit dieser Darstellungsmethode jedoch nicht möglich (*Abbildung 16*).

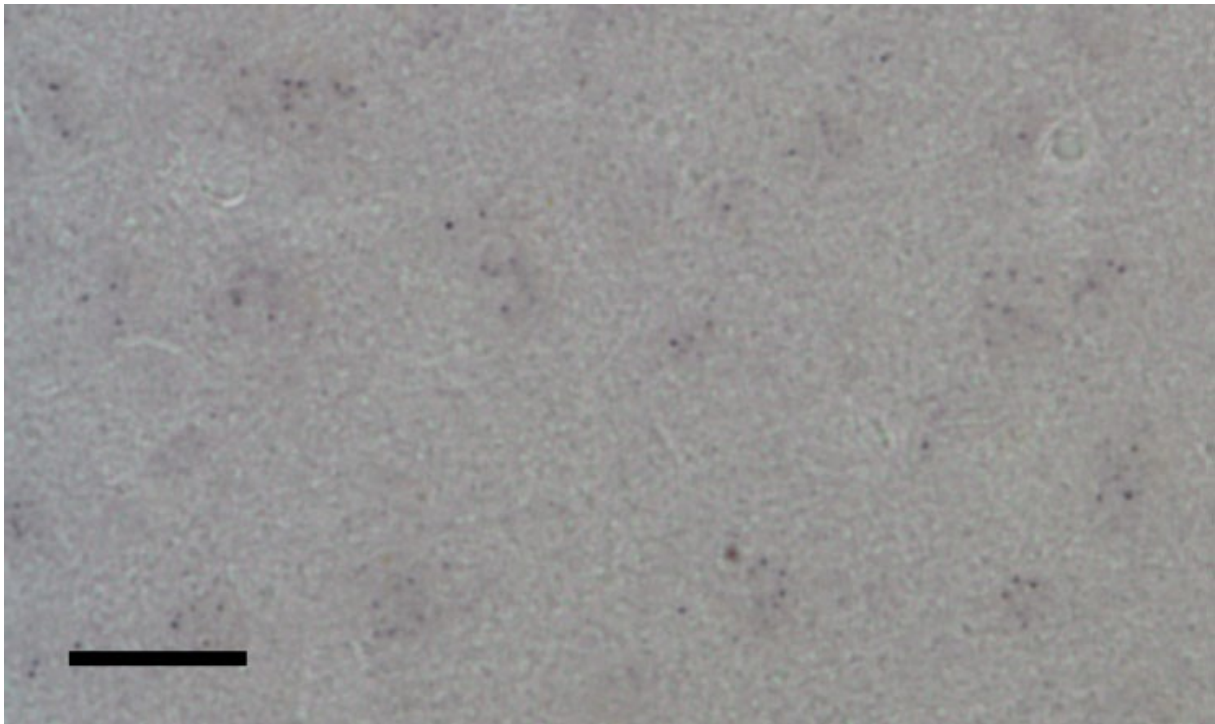


Abbildung 16: IHC-Färbung des Cortex einer Ratte mit dem AK S830

Die Einschlusskörperchen sind innerhalb der Perikarya abgrenzbar. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Eine Sonderstellung nehmen die Aggregate ein, die regelmäßig sowohl bei transgenen als auch Wildtyp-Tieren im Bereich des Ncl. accumbens um die Commissura anterior herum vorkommen. Hier scheinen sich einzelne Einschlüsse zu größeren, unregelmäßigen, zum Teil länglichen Aggregaten von 8-13 μm Länge zusammenzulagern (*Abbildung 17*).

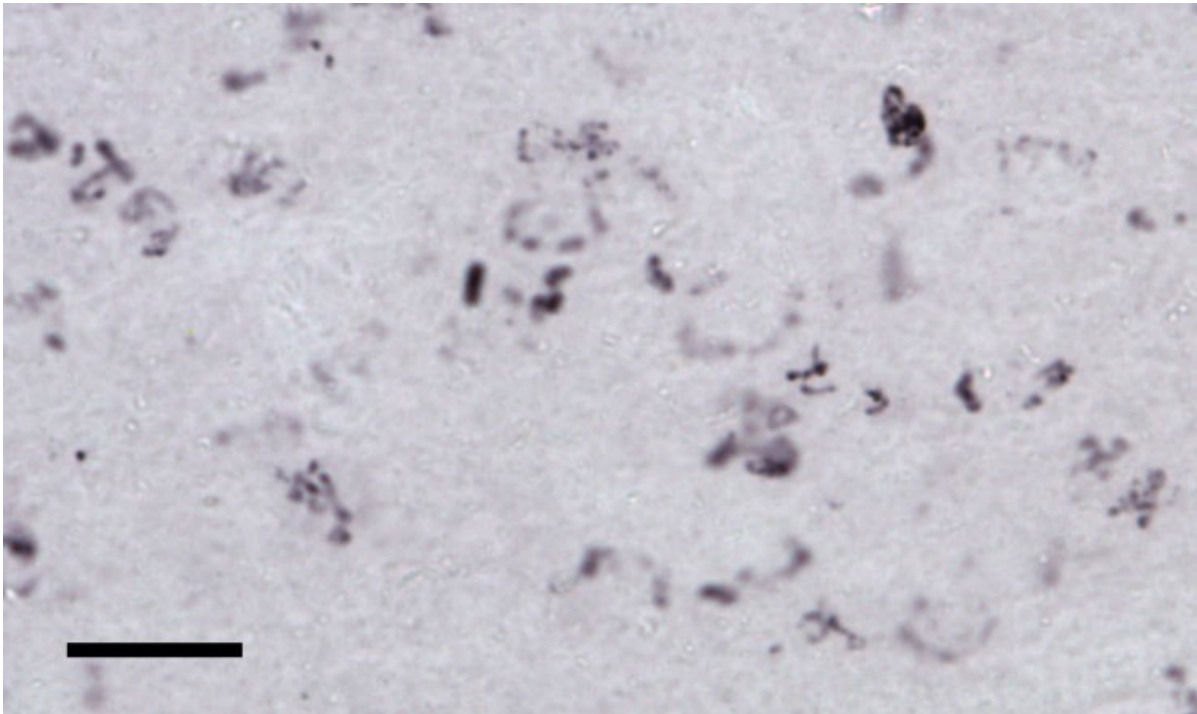


Abbildung 17: IHC-Färbung mit dem AK S830 vom Ncl. accumbens eines transgenen Tieres

Es zeigen sich teils längliche unregelmäßige Aggregate von ca. 10 μm Durchmesser innerhalb des Kerngebietes des Ncl. accumbens. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Um zu überprüfen, ob die Färbung der Aggregate wirklich spezifisch durch den AK S830 stattgefunden hat, wurde sowohl eine Einfachnegativkontrolle (ohne Primärantikörper), als auch eine Doppelnegativkontrolle (ohne Primär- und Sekundärantikörper) durchgeführt. In beiden Färbungen konnten keine Aggregate nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurden zum Vergleich der Ergebnisse mit anderen BACHD-Rattenlinien von Frau Yu-Täger vom Institut für Medizinische Genetik der Universität Tübingen Hirnschnitte der Linie TG5 zur Verfügung gestellt. Diese wurden ebenfalls mit dem Antikörper S830 gefärbt. Im Vergleich zur TG22-Linie sind wesentlich mehr Aggregate sichtbar und auch die Größe liegt mit 1 μm bis 3 μm deutlich über der der TG22-Tiere (*Abbildung 18*).

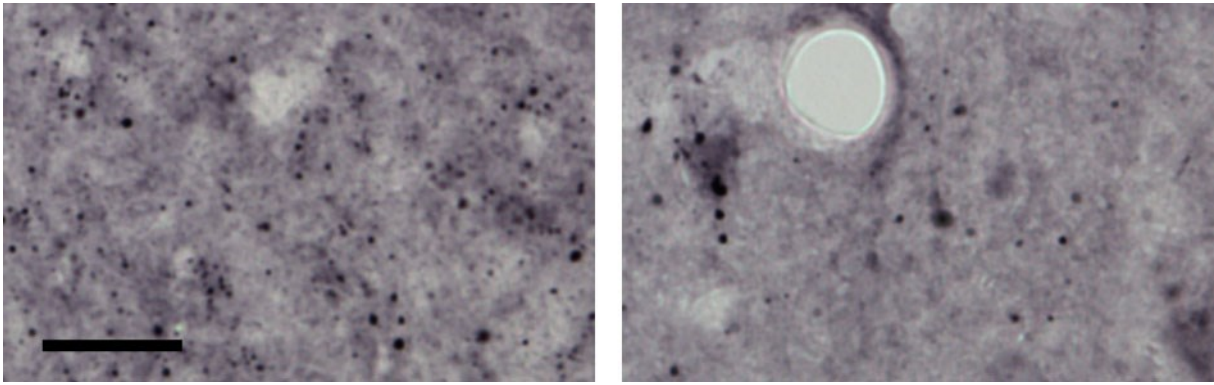


Abbildung 18: IHC-Färbungen mit dem AK S830 einer BACHD-Ratte der TG5-Linie

Zu erkennen sind zahlreiche Htt-Einschlusskörperchen von 1-3 μm Durchmesser. links: Gyrus dentatus, rechts: Cortex; Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

3.5.2. Quantitative Auswertung der Huntingtin-Aggregate

Um die Menge an Einschlusskörperchen quantitativ zu vergleichen, wurden im Gyrus dentatus von 15 Monaten alten transgenen und Wildtyp-Ratten Aggregate automatisch erkannt und ausgezählt.

Die Wildtyp-Tiere zeigten mit $208,5 \pm 29,8$ durchschnittlich mehr Einschlüsse als die transgenen Tiere, die im Schnitt $157,2 \pm 19,4$ Aggregate je Sichtfeld aufwiesen. Statistische Signifikanz erreichte der Unterschied jedoch nicht (U-Test, $p > 0,05$). Die Ergebnisse sind in **Abbildung 19: Durchschnittliche Anzahl von Einschlusskörperchen je Sichtfeld im Gyrus dentatus 15 Monate alter Ratten** *Abbildung 19* dargestellt.

Die durchschnittliche Fläche der einzelnen Aggregate stellt sich in der Wildtyp-Gruppe mit $14,6 \mu\text{m}^2 \pm 0,56 \mu\text{m}^2$ gegenüber $11,2 \mu\text{m}^2 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$ in den transgenen Tieren als hoch signifikant (T-Test, $p < 0,001$) größer heraus. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 20* dargestellt.

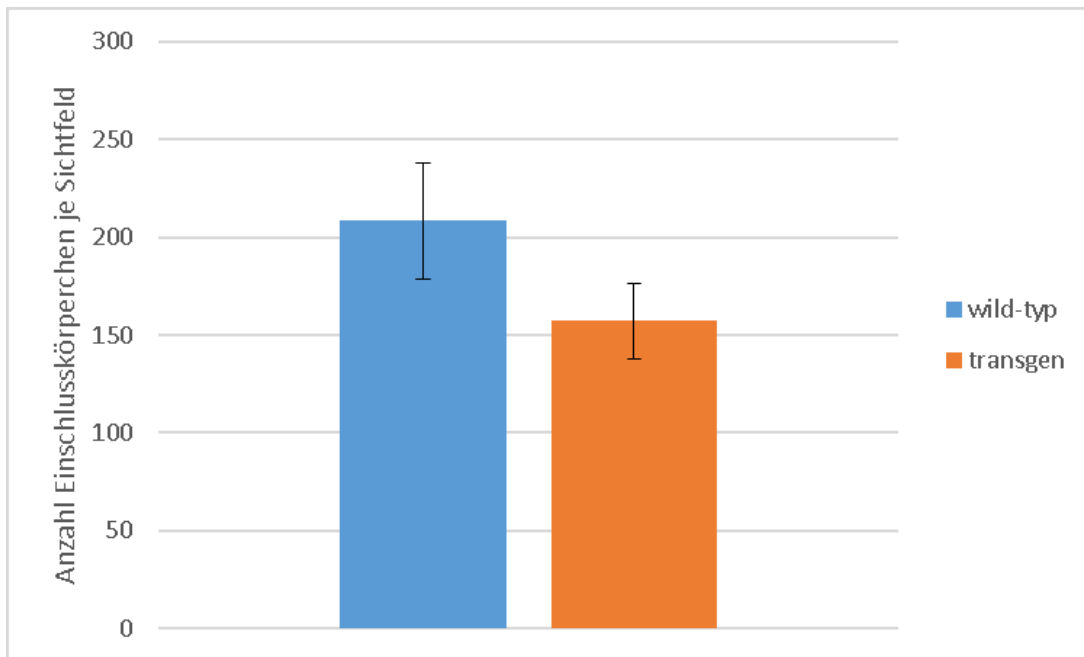


Abbildung 19: Durchschnittliche Anzahl von Einschlusskörperchen je Sichtfeld im Gyrus dentatus 15 Monate alter Ratten

Wildtyp-Ratten (links) zeigen mehr Aggregate als die transgenen Ratten (rechts). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

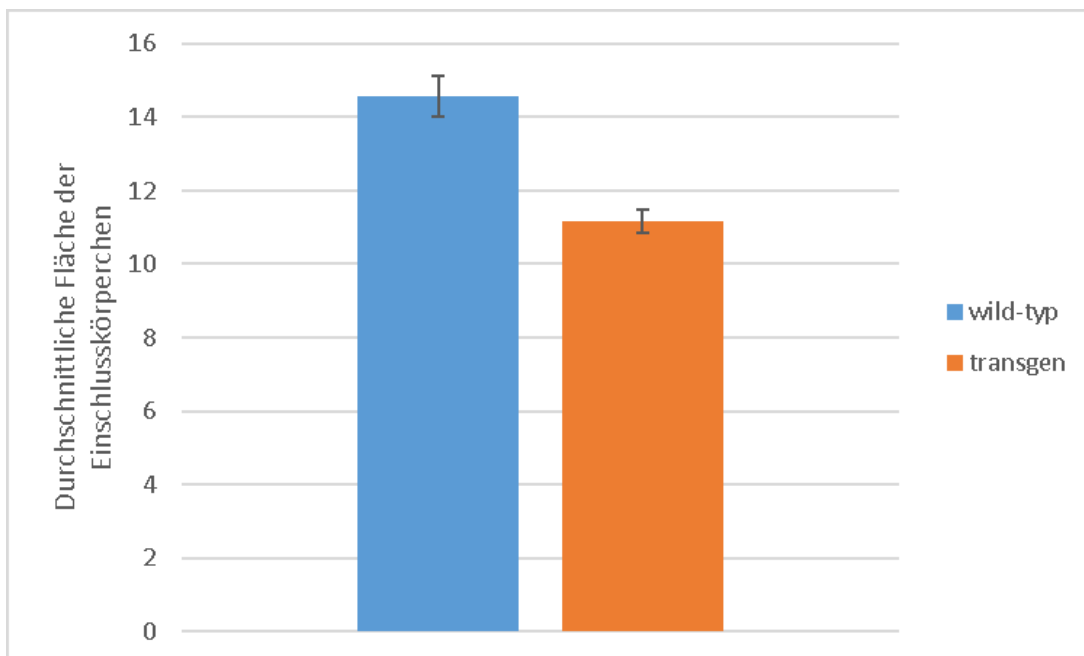


Abbildung 20: Durchschnittliche Fläche von Einschlusskörperchen im Gyrus dentatus 15 Monate alter Ratten

Wildtyp-Ratten (links) besitzen größere Aggregate als transgene Ratten (rechts). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

4. Diskussion

Mit den erfolgten Untersuchungen an TG22-Ratten sollte eine Einordnung im Bezug zu anderen HD-Tiermodellen hergestellt und ein Vergleich mit der humanen Erkrankung ermöglicht werden. Ein besonderer Schwerpunkt wurde hierbei auf die Neuropathologie und die Ausprägung des mutierten HTT gelegt. Nachdem Verhaltensexperimente bereits kognitive und motorische Defizite der TG22-Ratten gezeigt haben, erfolgte die histologische Aufarbeitung, um das Aggregationsverhalten von mutiertem HTT zu bewerten. *Tabelle 3:*

Vergleich der wichtigsten HD Tiermodelle

„----“ nicht erwähnt, (-/+) heterozygot, (+/+) homozygot, ↓ Abnahme, ↑ Zunahme, „=“ keine Veränderung zeigt, dass die Formation von HTT-Einschlusskörperchen nicht nur beim Menschen, sondern auch in allen transgenen HD-Tieren ein wichtiges histologisches Merkmal darstellt.

4.1. Körpergewicht

Die Veränderung des Körpergewichtes ist ein klinisches Merkmal, das bei vielen HD-Patienten zu beobachten ist. Mehr als die Hälfte aller Patienten leiden im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf unter Gewichtsverlust (Kirkwood et al. 2001). Erkrankte nehmen in frühen Stadien weniger an Gewicht zu und sind schon bei Manifestation leichter als die übrige Normalbevölkerung. In einigen Subgruppen lässt sich auch eine Abnahme des Körpergewichts beobachten. Sie zeichnen sich vor allem durch starke choreatrische Symptome, schnelle Progression der Erkrankung sowie fehlen der depressiven Komponente aus (Hamilton 2004). Dementsprechend sind auch Erkrankte mit vielen CAG-Wiederholungen häufiger von Gewichtsverlust betroffen (Aziz et al. 2008). Ähnliche Veränderungen waren auch in zahlreichen HD-Tiermodellen zu beobachten. Besonders R6/2-Mäuse begannen schon nach 2,5 LM Gewicht zu verlieren und wogen zu ihrem Tod nur noch 60-70 % gleichaltriger Wildtyp-Mäuse. Auch die transgenen tgHD-Ratten zeigten ein bis zu 20 % erniedrigtes Körpergewicht gegenüber gesunden Tieren (Horsten et al. 2003). Dagegen gibt es jedoch auch transgene Tiermodelle, die ein erhöhtes Körpergewicht besitzen. YAC128- und BACHD-Mäuse wiesen ein ungefähr 20 % erhöhtes Körpergewicht auf (Slow et al. 2003; Gray et al. 2008). Es gibt Hinweise darauf, dass das Expressionslevel an full-length Wildtyp-HTT mit dem Körpergewicht korreliert. Es führt dabei sowohl zu einem Anstieg des Körperfettanteils als auch zu einer Erhöhung der fettfreien Körpermasse. Ebenso führt auch mutiertes full-length HTT zu einem Gewichtsanstieg in transgenen Mäusen, bewirkt hier allerdings fast ausschließlich eine Erhöhung des Fettanteils (van Raamsdonk et al. 2006). Verursacht wird die

Gewichtszunahme vermutlich durch einen Anstieg des insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1), der mit dem full-length HTT-Level korreliert und nicht nur direkt zu einer Zunahme der Organmasse führt, sondern über Steigerung des Leptinspiegels auch zu einem Anstieg der Fettmasse. Umgekehrt zeigten sowohl R6/2-Mäuse als auch HD-Patienten verminderte IGF-1-Spiegel, was deren Gewichtsverlust erklären könnte (Pouladi et al. 2010). Widersprüchlich ist allerdings, dass in R6/2-Mäusen trotz starkem Gewichtsverlustes ebenfalls eine Zunahme des Körperfetts nachweisbar ist (Fain et al. 2001). Auch müssten TG5 BACHD-Ratten, die mutiertes full-length HTT fünf Mal stärker exprimieren als endogenes HTT (Yu-Taeger et al. 2012) und in etwa doppelt so stark wie BACHD-Mäuse (Gray et al. 2008) eine besonders starke Gewichtszunahme zeigen. Ihr Gewicht unterscheidet sich jedoch nicht von denen der Wildtyp-Tiere. Dennoch ist auch hier, ähnlich den R6/2-Mäusen, ein Anstieg des Körperfettanteils und des regulierenden Hormons Leptin zu beobachten, während IGF-1-Spiegel vermindert sind und auch die fettfreie Körpermasse abnimmt (Yu-Täger 2013).

Wie schon für die TG5 und TG9 BACHD-Ratten konnte auch für die hier untersuchte TG22-Linie kein Gewichtsunterschied zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren festgestellt werden (siehe 3.1.). Beachtet werden sollte jedoch, dass die Stichprobenzahl in einigen Gruppen sehr niedrig war, was deren Aussagekraft limitiert.

Auch für TG22-Ratten wäre es interessant zu erforschen, inwieweit sich der Anteil an Körperfett gegenüber der fettfreien Masse verschoben hat und welche Veränderungen in den IGF-1 und Leptin-Spiegeln auftreten. Dies übersteigt jedoch den Umfang dieser Arbeit.

4.2. Hirngewicht

Eine weitere charakteristische Pathologie in HD ist die zerebrale Atrophie. Das Leitsymptom, die choreatische Bewegungsstörung, entsteht durch den Untergang striataler Neurone. So wurde im Kopf des Ncl. caudatus von Grad 4 Patienten ein 95 %iger Neuronenverlust festgestellt (Vonsattel et al. 1985). Das Volumen von Striatum und Globus pall. schrumpft auf gerade mal 40 % der normalen Größe zusammen und auch viele andere Hirnareale weisen ein beträchtlich reduziertes Volumen auf. Kortex, weiße Hirnsubstanz, Thalamus, Amygdala und Hippocampus sind um 20-30 % kleiner als in gesunden Patienten. In der Summe ist das Gesamtvolumen des Hirns um ca. 30 % und das Gewicht um ca. 20 % reduziert (Lange et al. 1976; La Monte et al. 1988; Halliday et al. 1998). Auch in Tiermodellen ist die Erfassung des Hirngewichtes ein gängiges Mittel zerebrale Atrophie zu erkennen. So zeigen Hirne 12 Wochen alter R6/2-Mäuse ein durchschnittlich um 20 % reduziertes Hirngewicht (Mangiarini et al.

1996), das von einjährigen YAC128-Mäusen unterscheidet sich um 10 % (Slow 2003) und einjährigen BACHD-Mäusen ebenfalls um 20 % (wobei hier nur das Hirngewicht ohne Cerebellum und Bulbus olfact. verglichen wurde) (Gray et al. 2008).

Die Erfassung des Hirngewichtes ist somit ein technisch einfaches Mittel, das Anhalt darüber geben kann, ob es zu größeren Verlusten an Hirnsubstanz gekommen ist. Auch in dieser Arbeit wurden für TG22 BACHD-Ratten die Gewichte des gesamten Hirns (Cerebrum + Cerebellum + Bulbus olfact.) zu verschiedenen LM erfasst und innerhalb des jeweiligen Geschlechts mit den Wildtyp-Tieren verglichen. Die transgenen Männchen weisen zwar zu allen Zeiten 2-10 % niedrigere Hirngewichte auf, jedoch erreicht der Unterschied nur im 3.-4. Monat Signifikanz. Anhand der Hirngewichte kann somit nicht auf eine zerebrale Atrophie geschlossen werden. Da es allerdings nicht in allen Hirnregionen gleichermaßen zum neuronalen Verlust kommt, würde eine stereologische Volumenmessung einzelner Hirnregionen oder die Untersuchung mittels MRT sensitiver atrophische Veränderungen aufdecken können. So konnte z. B. für TG5 und TG9 BACHD-Ratten anhand *ex vivo* MRT-Untersuchungen sowohl für das gesamte Hirn als auch einzelne Regionen wie Striatum und Kortex ein Volumenverlust ab dem 12. bzw. 15. LM nachgewiesen werden (Yu-Täger 2013).

Es stellt sich außerdem die Frage, wie das signifikant geringere Hirngewicht der 3-4 Monate alten transgenen Männchen zu interpretieren ist. Da es sich um den ersten Messzeitpunkt handelt, wäre ein Unterschied im Hirngewicht zur Geburt denkbar, der sich im Laufe der Entwicklung verliert. Im Menschen beginnt die Neuropathologie jedoch erst nach der klinischen Manifestation (Vonsattel et al. 1985) und auch zur Geburt sind keine Unterschiede erkennbar (Dure et al. 1994). Wahrscheinlicher ist somit, dass es sich hierbei um einen Fehler 1. Art handelt. Auch Wägefehler z. B. durch unterschiedliche Mengen verbliebender Flüssigkeit innerhalb der Ventrikel kämen als Erklärung in Frage.

Ähnlich verhalten sich die Messwerte der Hirngewichte der Weibchen. Wie im Ergebnisteil (3.2.) dargestellt, unterliegen die Daten erheblichen Schwankungen, die als einen Wechsel aus Wachstum und Atrophie interpretiert werden müssten. Dies erscheint biologisch jedoch wenig plausibel. Wie *Tabelle 5* zeigt, war die Anzahl der Versuchstiere für die weiblichen Ratten zu allen Zeiten größer als die der Männchen und auch der Standardfehler des Mittelwertes war im Allgemeinen kleiner als unter den männlichen Tieren. Somit wird auch ein zufälliger Fehler unwahrscheinlich, sodass es sich eher um einen systematischen Messfehler (Wägefehler) handelt und eine Interpretation der Daten wenig sinnvoll ist.

4.3. Expression von HTT

Wie **Error! Reference source not found.** zeigt, sind Hippocampus, Kortex und Cerebellum die Orte höchster HTT-Expression im gesunden menschlichen Gehirn und auch Affen und Ratten weisen eine ähnliche Verteilung von Wildtyp-HTT auf. Im Striatum, welches maßgeblich für die Symptomatik von HD verantwortlich ist, sind dagegen nur mittlere Konzentrationen von HTT zu finden und auch in den übrigen Basalganglien wie Substantia nigra pars compacta und der Globus pallidus kommen ähnliche Mengen an HTT vor. Sehr wenig tritt vor allem im Hirnstamm, Rückenmark und der weißen Hirnsubstanz auf.

Betrachtet man Hirne von HD-Patienten fallen vor allem erniedrigte HTT-Konzentrationen im Striatum und dem Globus pallidus auf. Regionen hoher HTT-Konzentration, wie der Hippocampus, bleiben dagegen unverändert. Die Abnahme der HTT-Menge gegenüber gesunden Hirnen wird allerdings hauptsächlich durch den Untergang von Neuronen verursacht und ist nur im geringen Maße Folge verminderter Expression. Jedoch hat auch die Länge der CAG-Repeats Einfluss auf die Proteinexpression, was vor allem in juveniler HD mit langen PolyQ-Abschnitten zu niedrigeren Mengen mHTT führt (Schilling et al. 1995; Evers et al. 2015).

Um die HTT-Expression in TG22 BACHD-Ratten zu untersuchen, wurde ein Western Blot mit dem Antikörper MAB2166 durchgeführt, wodurch eine semiquantitative Darstellung der HTT-Konzentration erfolgte. Wie in *Abbildung 12* deutlich wird, zeigen transgene und Wildtyp-Ratten keine größeren Unterschiede im Expressionsmuster von HTT. Bereiche wie das Striatum, in denen eine Abnahme der HTT-Konzentration zu erwarten wäre, weisen die gleiche Signalstärke auf. Bedenkt man, dass die Abnahme von HTT zumeist der neuronalen Atrophie geschuldet ist, erscheint dies als ein weiterer Hinweis für eine fehlende striatale Degeneration in TG22-Ratten. Das generelle Expressionsmuster von HTT in den unterschiedlichen Hirnregionen der TG22-Ratten ähnelt der in **Error! Reference source not found.** beschriebenen Verteilung aus anderen Untersuchungen an Ratte und Mensch: Besonders viel HTT war im Hippocampus und Kortex zu finden. Cerebellum und Bulbus olfactorius, welche normalerweise ebenfalls hohe Level aufweisen (Li et al. 1993), zeigten nur mittlere Konzentrationen, wie sie auch im Striatum und Hypothalamus zu finden waren. Im Hirnstamm der Ratten war kein HTT nachzuweisen.

Der Western Blot mit dem Antikörper S830, der ausschließlich mutiertes HTT erkennt, stellte sich neben Hippocampus und Kortex auch das Striatum als ein Ort hoher Proteinexpression dar (*Abbildung 13*). Eine ähnliche Verteilung war auch in TG5-Ratten zu finden. Ein Western Blot

mit dem Antikörper 1C2 registrierte zusätzlich auch im Cerebellum hohe Mengen mutierten HTTs. TG9-Ratten zeigten dagegen die höchsten HTT-Level in Striatum, Bulbus olfactorius und Hypothalamus (Yu-Taeger et al. 2012). Man sollte allerdings in Betracht ziehen, dass auch die Wahl des Antikörpers eine Rolle spielt und z. B. ein Western Blot mit MAB2168 bereits andere Ergebnisse für TG9 Ratten liefert (Yu-Täger 2013). Schon in der Arbeit von (Landles et al. 2010) war zu beobachten, dass verschiedene Antikörper jeweils HTT-Moleküle einer bestimmten Fragmentlänge besonders betonten.

Während in erkrankten menschlichen Gehirnen mutiertes HTT in geringeren Mengen als das endogene HTT vorliegt (Schilling et al. 1995), weisen transgene Tiere auf Grund der mehrfach integrierten Kopien des Gens Vielfache der normalen Proteinmenge auf. Auch die TG22-Ratten wurden von (Yu-Täger 2013) analysiert und sind vergleichend mit anderen Linien in *Abbildung 6* dargestellt. Die Proteinexpression von TG22-Ratten liegt demnach mehr als das Doppelte über dem endogenen HTT und nur etwas unter der der TG5-Ratten. In *Abbildung 12* erscheint das Signal der fl-mHTT-Bande jedoch genau so stark wie die Bande des Ratten-HTT, was wohl eher für eine gleich starke Expression spricht.

4.4. Bildung von HTT-Aggregaten

Die Bildung von unlöslichen HTT-Aggregaten ist ein wichtiges Charakteristikum der HD-Erkrankung. Die Einschlüsse sind intranukleär und im Zytoplasma zu finden und erlangen dadurch eine besondere Bedeutung, dass die Einschlüsse für gewöhnlich ausschließlich in erkrankten Hirnen nachweisbar sind. In *Tabelle 2* sind verschiedene Untersuchungen zu HTT-Einschlüssen in Hirnen von HD-Patienten und gesunden Kontrollen dargestellt. Die Einschlusskörperchen sind vor allem in den Schichten III, V und VI des Kortex, dem Striatum und Kerngebieten des Zwischenhirns zu finden. Obwohl das Cerebellum hohe Mengen an HTT exprimiert, sind nur wenige Einschlüsse nachweisbar. Sie erreichen im Neuropil eine Größe von über 20 µm, intranukleär bis zu 8 µm. Auch kleinere perinukleäre Einschlüsse unter 1 µm werden beschrieben (Gutekunst et al. 1999). Gesunde Kontrollhirne zeigen normalerweise keine Aggregate und nur in wenigen Untersuchungen wurden sehr kleine punktförmige Ablagerungen im Zytoplasma gefunden (Maat-Schieman et al. 1999; Sapp et al. 1997; Sharp et al. 1995; Trotter et al. 1995).

Wie *Tabelle 3*: Vergleich der wichtigsten HD Tiermodelle

„----“ nicht erwähnt, (-/+) heterozygot, (+/+) homozygot, ↓ Abnahme, ↑ Zunahme, „=“ keine Veränderung verdeutlicht, sind Aggregate auch in transgenen Tieren zu finden. Abhängig vom Tiermodell

sind die Einschlüsse jedoch sehr unterschiedlich verteilt und weisen verschiedene Größen auf. Übereinstimmend sind in verschiedenen Modellen die Einschlusskörperchen im Striatum und Kortex lokalisiert. Es finden sich allerdings auch häufig Einschlüsse in der Substantia nigra, Thalamus, Hippocampus, Amygdala und Cerebellum.

Table 3: Vergleich der wichtigsten HD Tiermodelle

„---“ nicht erwähnt, (-/+) heterozygot, (+/+) homozygot, ↓ Abnahme, ↑ Zunahme, „=“ keine Veränderung verdeutlicht außerdem, dass alle Tiermodelle, die eine HD ähnliche Symptomatik zeigen, auch Einschlusskörperchen aufweisen. Lediglich in einer Veröffentlichung über BACHD-Mäuse wird von fehlenden Aggregaten trotz charakteristischer Krankheitsmerkmale berichtet (Pouladi et al. 2012). Immunhistologische Färbungen mit dem Antikörper S830 konnten zwar Einschlusskörperchen in YAC128-Mäusen anfärben, waren aber nicht in der Lage, Aggregate in BACHD-Mausirnen nachzuweisen. Dagegen fanden (Gray et al. 2008) mit Hilfe des Antikörpers EM48 zytosolische Einschlusskörperchen ab dem 12. LM in Kortex und Striatum. Ihr Durchmesser variierte zwischen <1 µm Größe im Striatum und bis zu 2,5 µm in den tiefen Kortexschichten. Es ließen sich jedoch auch hier keine intranukleären Einschlüsse finden. In anderen Untersuchungen konnte sogar der Nachweis erbracht werden, dass auch S830 Einschlüsse in BACHD-Mäusen erkennt, wobei auch hier im Vergleich zu anderen Tiermodellen weniger und kleinere Aggregate zu sehen waren (Menalled et al., S. 32; Oliveira et al. 2016).

Umso widersprüchlicher erscheinen die Ergebnisse dieser Arbeit. Mit Hilfe des Antikörpers S830 wurden hier zum einen lediglich sehr kleine Aggregate in der Größenordnung eines Mikrometers nachgewiesen, andererseits waren diese Einschlüsse in ungefähr gleicher Menge auch in Wildtyp-Ratten zu finden. Hinzu kommt, dass die Anzahl HD-spezifischer Einschlusskörperchen mit dem Alter zunehmen müsste und normalerweise erst ab einer gewissen Lebenszeit überhaupt nachweisbar ist. Die Einschlüsse in den TG22- und Wildtyp-Ratten waren dagegen bereits im ersten Untersuchungszeitraum von 3-4 Monaten sichtbar und mit zunehmendem Alter nicht progredient.

Da alle Tiere im Vorfeld genotypisiert und zur Erkennung mit einem Chip versehen wurden, ist eine regelhafte Verwechslung von Wildtyp mit transgenen Tieren nahezu unmöglich. Gleichzeitig zeigt die Verwendung in zahlreichen Arbeiten, dass der Antikörper S830 spezifisch mutiertes HTT in menschlichen (Nguyen und Cenci 2015, S. 62) und Nagetierhirnen anfärbt (Landles et al. 2010; Bayram-Weston et al. 2012; Pouladi et al. 2012; Yu-Taeger et al. 2012; Clemens et al. 2015; Oliveira et al. 2016). Auch im Western Blot (siehe *Abbildung 13*) von Hirnlysaten der TG22 BACHD-Ratten wurde ausschließlich mutiertes HTT erkannt. In

einer vergleichenden Studie stellte sich S830 zudem als der sensitivste Antikörper gegen mutiertes HTT heraus (Bayram-Weston et al. 2016). Weiterhin wurde für die Immunhistochemie das Färbeprotokoll von (Yu-Taeger et al. 2012) übernommen und durch Einfach- und Doppelnegativkontrollen (siehe 3.5.1.) antikörperunabhängige Anfärbung ausgeschlossen. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass ein methodischer Fehler für die Ergebnisse verantwortlich ist.

Verschiedene Hinweise sprechen eher dafür, dass der S830-AK (auch wenn bisher nicht in der Literatur beschrieben) doch auch endogenes Ratten-HTT anfärben kann:

So gleicht der Ort, in dem HTT-Einschlüsse gefunden wurden, stark dem HTT-Expressionsmuster, welches im Western Blot mit dem AK MAB2166 auftrat. Hippocampus und Kortex, in denen die meisten Aggregate beobachtet wurden, wiesen hier auch am meisten HTT auf. Auch (Li et al. 1993) sowie (Strong et al. 1993) fanden in diesen Regionen die größte Menge HTT im Rattenhirn. Weitere Regionen für die eine hohe Konzentration von HTT beschrieben wurde, waren außerdem Cerebellum und Bulbus. Daher wurde exemplarisch ein Hirn der TG22-Ratten in diesen Bereichen gefärbt und in *Abbildung 21* dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Perikarya und Dendritenbäume der Purkinjezellen des Cerebellums sowie die großen Nervenzellkörper des Bulbus olfactorius viele HTT-Einschlusskörperchen aufweisen. Ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich um kleinste Aggregate aus endogenem HTT handeln könnte, sind die Beschreibungen von (Sharp et al. 1995) und (Sapp et al. 1997), die mit anderen HTT-Antikörpern kleine punktförmige Strukturen in den Hirnen gesunder Menschen entdeckt haben. Außerdem entdeckten (Herrera et al. 2011) in *in-vitro* Studien auch für Wildtyp-HTT eine geringe Aggregatsbildung. HTT wurde oft übereinstimmend mit Färbungen gegen Synaptophysin in Varikositäten, Nervenendigungen nachgewiesen, sodass es sich eventuell gar nicht um „echte“ unlösliche Aggregate handelt, sondern vielmehr Konzentrationen von löslichem HTT in Dendriten und Axonen sichtbar gemacht wurden (Gourfinkel-An et al. 1997; Sharp et al. 1995). So kann auch aus *Abbildung 21* gemutmaßt werden, dass die zahlreichen kleinen Einschlüsse Nervenendigungen entsprechen, welche auf ein Perikaryon konvergieren. Auch die Ansammlung in Endosomen (multivesicular bodies) wäre denkbar (Sapp et al. 1997).

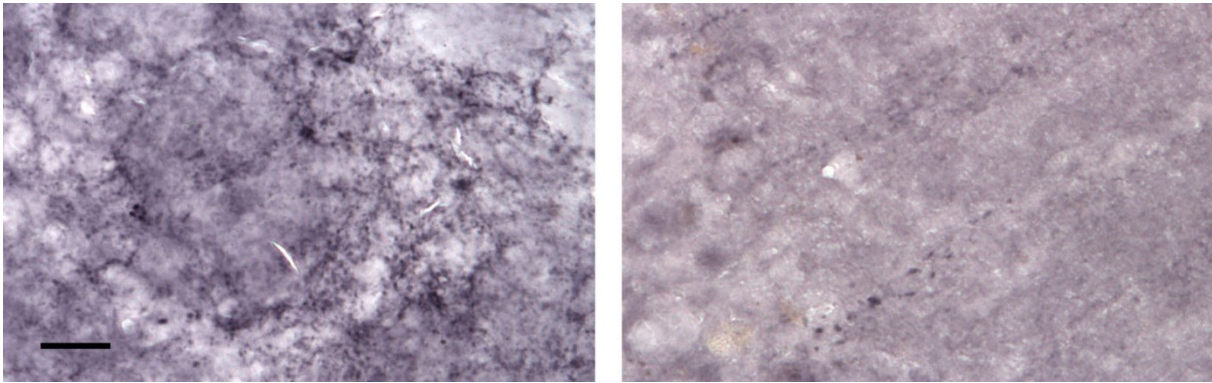


Abbildung 21: IHC-Färbung mit dem AK S830 von Bulbus (links) und Cerebellum (rechts) einer Ratte

Es sind zahlreiche kleine Aggregate vor allem um die Nervenzellkörper des Bulbus olfactorius und in den Purkinjezellen des Cerebellums nachweisbar. Neben den Perikarya enthalten auch die Dendriten der Purkinjezellen Einschlusskörperchen.

Zum Vergleich der Ergebnisse der TG22-Ratten wurde Hirnmaterial von TG5-Ratten, welches von Dr. Libo Yu-Täger vom Institut für Medizinische Genetik der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt wurde, mit dem AK S830 gefärbt. Es konnten hier zahlreiche bis 3 μm große Einschlüsse nachgewiesen und damit die Ergebnisse von (Yu-Taeger et al. 2012) reproduziert werden. Jedoch wiesen auch hier die Wildtyp-Kontrollen die gleichen kleinen Aggregate auf, wie sie schon in den TG22-Ratten und den zugehörigen Kontrollhirnen zu sehen waren.

Umgekehrt wurden auch Proben von TG22-Ratten durch Dr. Libo Yu-Täger und Mitarbeiter analysiert. Neben dem Primärantikörper S830 wurden auch immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern EM48 und 1C2 durchgeführt. Während sich EM48 ebenfalls gegen mutiertes HTT richtet (Millipore 2005) wurde 1C2 ursprünglich als Antikörper gegen den Polyglutaminabschnitt des Transkriptionsfaktors TATA Box-binding protein (TBP) erstellt. Er erkennt HTT besser je länger die Glutaminkette ist, weshalb auch in geringerem Maße Wildtyp-HTT und das nukleär vorliegende TBP angefärbt wird (Millipore 2008). Obwohl alle drei Antikörper in der Lage sind, Aggregate zu erkennen, konnten in den Färbungen keine nachgewiesen werden.

Eine weitere Methode zum Nachweis von Aggregaten ist die Verwendung eines Filter Trap Assays, auch Membran Filter Assay genannt, bei dem die hochmolekularen HTT-Aggregate mit Hilfe einer Nitrocellulosemembran gefiltert und anschließend durch einen spezifischen Antikörper detektiert werden (Wanker et al. op. 1999). Dieses Verfahren wurde ebenfalls im Labor der medizinischen Genetik der Uni Tübingen von Jonasz Weber angewendet. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 23* dargestellt. Gegenüber den immunhistochemischen Färbungen kam der Filter Trap zu sehr gegensätzlichen Ergebnissen, denn nicht nur für die TG5- und TG9-

Linien wurden positive Banden nachgewiesen, sondern auch für die TG22-Ratten war ein positives Ergebnis zu beobachten. Gleichzeitig waren in den Wildtyp-Ratten keine Aggregate nachweisbar. Weitere Betrachtungen an TG5- und TG22-Schnitten konnten jedoch zeigen, dass der Antikörper D7F7 lediglich diffuses lösliches HTT anfärbt und es auch in TG5-Ratten nicht zur Darstellung von Einschlusskörperchen kommt. Unklar bleibt, welche HTT-Form im Filter Trap erkannt wurde, da diese offensichtlich nur in transgenen Neuronen vorkommt. Denkbar wären Oligomere aus HTT, welche keine unlöslichen Aggregate bilden, jedoch groß genug sind, um im Filter Trap retiniert zu werden. Auch konnte die Frage nicht beantwortet werden, was zum Anfärben der kleinen Einschlusskörperchen geführt hat, die sich in unseren Färbungen sowohl in TG22- und Wildtyp-Tieren finden ließen. Bestätigt werden konnte jedoch, dass sich in TG22-Ratten, obwohl sie eine HD-ähnliche Symptomatik zeigen, keine HD spezifischen Einschlusskörperchen feststellen lassen.

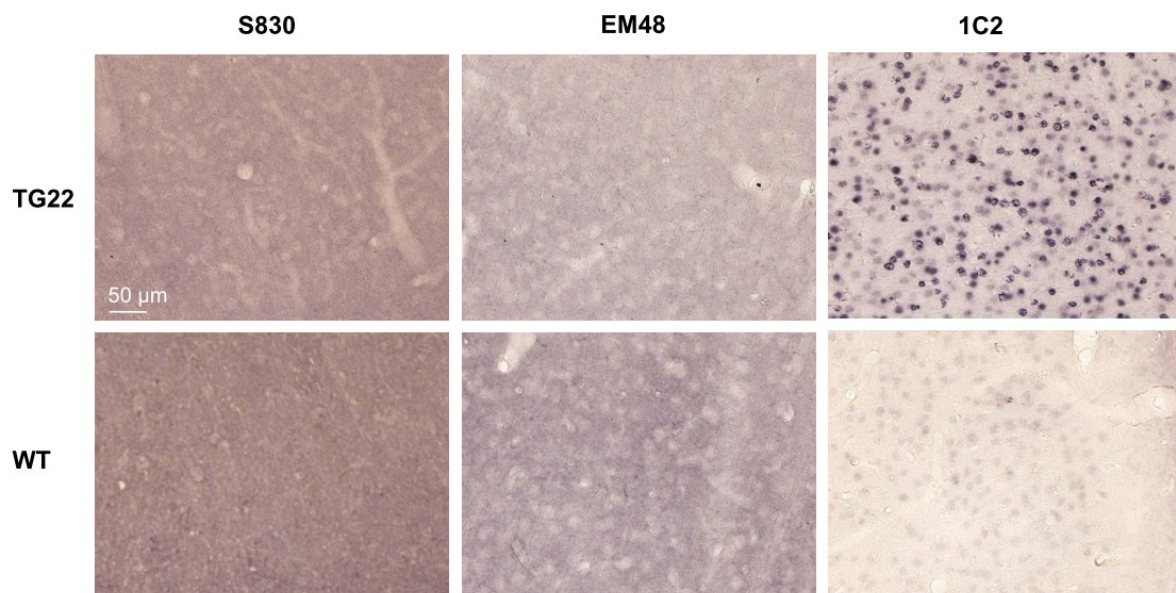


Abbildung 22: IHC-Färbungen von TG22-Hirnschnitten mit verschiedenen HTT-Antikörpern.

Keiner der Primärantikörper S830, EM48 und 1C2 konnten in TG22- oder Wildtyp-Ratten Aggregate nachweisen. Antikörper 1C2 erkennt Polyglutaminabschnitte abhängig von ihrer Länge mit steigender Affinität und hat in den Nuclei von TG22-Neuronen mutiertes HTT in einem inhomogenen Muster angefärbt. Endogenes HTT zeigt dagegen nur eine sehr schwache Reaktion. (Yu-Täger 2016)

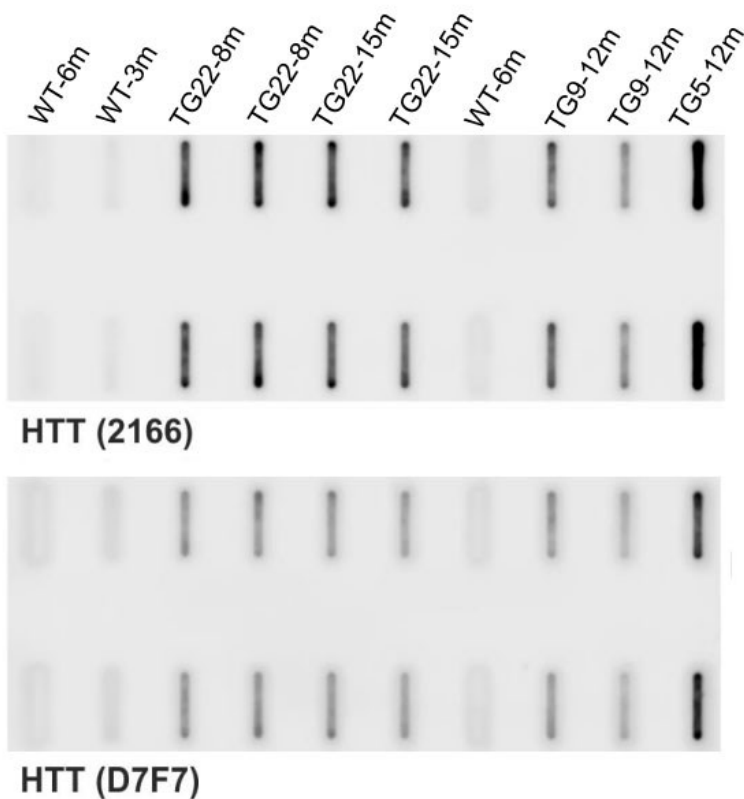


Abbildung 23: Filter Trap Assay zum Nachweis von Aggregaten in verschiedenen BACHD Ratten-Linien und Wildtyp-Kontrollen

Die Antikörper MAB2166 und D7F7 konnten in allen transgenen BACHD Ratten-Linien Aggregate nachweisen. In Wildtyp-Ratten ist dagegen keine Anfärbung sichtbar. (Yu-Täger 2016)

Dies stellt ein Novum in der HD-Forschung dar und widerlegt die Vermutung, dass die Bildung von Aggregaten die Degeneration von Neuronen verursacht. Doch auch vorher gab es bereits starke Hinweise darauf, dass die Bildung von Aggregaten eher ein Nebenprodukt des Zellstoffwechsels ohne pathologischen Wert darstellt. Beispielsweise lassen sich in Hirnen von „shortstop“ YAC128-Mäusen zahlreiche Einschlüsse in Striatum, Kortex und Hippocampus finden, obwohl die Mäuse weder HD-ähnliche Symptome noch Neurodegeneration zeigen (Slow et al. 2005). Die Aggregate weisen somit keinen pathologischen Wert auf bzw. scheinen sie sich sogar protektiv auf das Zellüberleben auszuwirken, indem freie HTT-Monomere und Oligomere gebunden und unschädlich gemacht werden (Arrasate et al. 2004).

Warum allerdings nur eine Linie der BACHD-Ratten keine Einschlusskörperchen zeigt, während sich in mindestens zwei anderen Linien zum Teil sehr viele Einschlüsse finden lassen, bleibt unklar. Schließlich sind alle Ratten nach identischem Vorgehen erstellt worden und tragen somit das gleiche Transgen. Normalerweise ist die Stärke der Aggregatbildung abhängig von der Menge des exprimierten HTT (Graham et al. 2006b) und der Länge des *CAG*-Repeats (Becher et al. 1998). Ersteres unterscheidet sich allerdings nicht wesentlich von den TG9-Ratten (siehe *Abbildung 6*) und da es sich in allen Linien um das gleiche BACHD-Konstrukt handelt, welches zudem durch das *CAG/CAA*-Repeat vor meiotischer Instabilität geschützt ist (Gray et al. 2008), muss auch die Länge der Polyglutaminkette identisch sein.

Eine mögliche Erklärung liegt vielleicht in den unterschiedlichen Integrationsorten des BAC im Rattengenom. Es ist bekannt, dass es bestimmte regulatorische Proteine gibt, die Einfluss auf das Aggregationsverhalten von HTT haben (Khoshnan et al. 2004). Es wäre denkbar, dass die zufällige Integration des mutierten *HTT*-Gens in Genabschnitte solcher assoziierten Moleküle oder deren regulatorischen Einheiten zu einer veränderten Transkription oder Funktionslosigkeit geführt haben.

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre die Bildung eines Fusionsproteins (aus mutiertem HTT und endogenem Protein). Anstelle von Veränderungen in den Transkription-regulierenden-Einheiten könnte ein verändertes HTT-Protein exprimiert werden, welches zwar zum erwarteten Phänotyp führt, jedoch durch Veränderung/ Maskierung des Epitops in der immunhistochemischen Färbung nicht mehr durch den S830 Antikörper erkannt wird. Erstaunlich wäre jedoch, dass der Nachweis im Western Blot noch möglich ist. Zur endgültigen Klärung müsste eine Genomsequenzierung durchgeführt werden.

4.5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde damit begonnen die Zuchtlinie TG22 der transgenen BACHD-Ratten zu charakterisieren und auf ihren Wert für die HD-Forschung zu prüfen. Nachdem sich bereits früh in den Verhaltenstests Auffälligkeiten in der Motorik und Aktivität gezeigt haben, wurden die Ratten auf verschiedene Merkmale HD-spezifischer Pathologie untersucht. Die Ergebnisse sollen im Folgenden noch einmal kurz zusammengefasst werden:

Ein gemeinsames, eher unspezifisches Merkmal, welches man bei vielen HD erkrankten Patienten und zahlreichen Tiermodellen antrifft, ist eine Veränderung des Körpergewichtes. Wie schon in den beiden anderen Linien des BACHD-Modells konnten auch bei den TG22-Ratten keine Gewichtsunterschiede zu den Wildtyp-Ratten registriert werden. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass sich ebenfalls Stoffwechselstörungen wie muskuläre Atrophie bei gleichzeitig verstärkter Lipogenese finden lassen.

Ein weiteres Merkmal von HD ist die neuronale Degeneration. Neben dem besonders starken Verlust striataler Neurone ist auch immer eine globale Atrophie des Cerebrums zu verzeichnen. In der Untersuchung der Hirngewichte konnten zwar keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, doch ist es auch hier denkbar, dass sensitivere Untersuchungsmethoden atrophische Veränderungen nachweisen könnten. Die noch ausstehenden Ergebnisse der stereologischen Volumenmessung der Striata werden hier vermutlich noch weitere wichtige Erkenntnisse liefern.

Der weitaus größte Teil dieser Arbeit widmete sich jedoch der regionalen Verteilung des für die Erkrankung verantwortlich gemachten HTT-Proteins und dessen Formierung zu unlöslichen Aggregaten. Die Expressionstärke des mutierten Proteins in den unterschiedlichen Hirnarealen der TG22-Ratten stimmte im Wesentlichen mit dem Verteilungsmuster des endogenem HTT der Wildtyp-Ratten überein, wobei in den heterozygoten Ratten das mutierte HTT mindestens in gleicher Menge wie endogenes HTT vorlag.

Trotz der ansonsten großen Ähnlichkeit zu den anderen BACHD-Linien erwies sich die TG22-Linie unter dem Gesichtspunkt der Aggregatbildung als Novum, welches in dieser Form bisher in keinem Tiermodell beschrieben wurde. Es konnten zwar mittels immunhistologischer Färbung einige kleinste Einschlusskörperchen nachgewiesen werden, jedoch waren gleichförmige Aggregate in ebenso großer Zahl auch in den Wildtyp-Ratten zu finden. Damit bilden die TG22 BACHD-Ratten das erste Modell, in dem es trotz HD-ähnlicher Verhaltensweisen und nachweislicher Expression mutierten HTTs zu keiner Bildung von Einschlusskörperchen kommt. Der Nachweis intranukleärer und zytosolischer Einschlüsse galt bisher als untrennbares pathologisches Merkmal von HD. Auch wenn die Rolle der Aggregate auf den Krankheitsverlauf noch immer nicht vollständig geklärt ist, konnten hiermit wichtige Indizien gefunden werden, dass sie zumindest nicht für den Untergang der Nervenzellen verantwortlich sind. Sollte sich außerdem die Hypothese von (Arrasate et al. 2004) bewahrheiten und die Aggregatsbildung eher einen protektiven Einfluss auf den erkrankten Zellstoffwechsel haben, ließen sich durch eine gezielt gesteuerte Aggregation eventuell neue Therapieansätze in der Behandlung von HD finden. Auch wenn noch weitere Arbeit nötig sein wird, um die die Aggregatbildung unterdrückenden Mechanismen zu entschlüsseln, könnten sich die TG22-Ratten doch als wichtiger Baustein auf dem Weg zur Heilung von HD erweisen.

5. Anhang

Tabelle 4: Körpergewichte

Alter	Sex	KG	Genotyp	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
3/4 Monate	männlich	KG	Wildtyp	28	469,21	38,094	7,199
			transgen	35	456,77	46,250	7,818
	weiblich	KG	Wildtyp	41	299,85	25,427	3,971
			transgen	30	289,13	37,637	6,872
6 Monate	männlich	KG	Wildtyp	10	538,80	26,486	8,376
			transgen	10	570,20	55,188	17,452
	weiblich	KG	Wildtyp	10	330,00	22,131	6,998
			transgen	10	314,40	32,603	10,310
7/8 Monate	männlich	KG	Wildtyp	3	588,67	22,030	12,719
			transgen	0	.	.	.
	weiblich	KG	Wildtyp	7	307,43	17,539	6,629
			transgen	4	382,50	34,886	17,443
9 Monate	männlich	KG	Wildtyp	10	592,30	65,899	20,839
			transgen	14	564,93	50,778	13,571
	weiblich	KG	Wildtyp	11	339,64	25,928	7,818
			transgen	10	367,70	36,640	11,586
11/12 Monate	männlich	KG	Wildtyp	5	630,20	71,894	32,152
			transgen	7	597,57	103,492	39,116
	weiblich	KG	Wildtyp	10	351,20	25,685	8,122
			transgen	2	423,50	12,021	8,500
14/15 Monate	männlich	KG	Wildtyp	2	595,00	72,125	51,000
			transgen	2	480,00	214,960	152,000
	weiblich	KG	Wildtyp	6	383,67	49,774	20,320
			transgen	6	379,00	33,722	13,767
17/18 Monate	männlich	KG	Wildtyp	4	640,50	122,881	61,440
			transgen	0	.	.	.
20 Monate	männlich	KG	Wildtyp	2	591,00	49,497	35,000
			transgen	0	.	.	.
	weiblich	KG	Wildtyp	4	429,00	34,506	17,253
			transgen	5	412,80	29,987	13,410

Tabelle 5: Hirngewichte

Alter	Sex	Genotyp	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert	
3/4 Monate	männlich	HG	Wildtyp	19	2,42205	,113668	,026077
			transgen	19	2,32058	,120619	,027672
	weiblich	HG	Wildtyp	27	2,17507	,092508	,017803
			transgen	20	2,08340	,251521	,056242
6 Monate	männlich	HG	Wildtyp	5	2,42840	,080308	,035915
			transgen	5	2,39740	,133665	,059777
	weiblich	HG	Wildtyp	5	2,19040	,102481	,045831
			transgen	5	2,17740	,074366	,033257
7/8 Monate	männlich	HG	Wildtyp	3	2,45233	,139389	,080476
			transgen	0	.	.	.
	weiblich	HG	Wildtyp	7	2,13100	,033226	,012558
			transgen	4	2,22675	,059135	,029567
9 Monate	männlich	HG	Wildtyp	5	2,39980	,019045	,008517
			transgen	8	2,34975	,152139	,053789
	weiblich	HG	Wildtyp	4	2,18325	,028791	,014395
			transgen	5	2,23200	,069545	,031101
11/12 Monate	männlich	HG	Wildtyp	5	2,40700	,055077	,024631
			transgen	5	2,34320	,085541	,038255
	weiblich	HG	Wildtyp	5	2,30860	,071132	,031811
			transgen	5	2,17880	,033581	,015018
14/15 Monate	männlich	HG	Wildtyp	2	2,43600	,053740	,038000
			transgen	2	2,18200	,049497	,035000
	weiblich	HG	Wildtyp	6	2,20000	,133828	,054635
			transgen	6	2,11083	,135339	,055252
17/18 Monate	männlich	HG	Wildtyp	4	2,31850	,123284	,061642
20 Monate	männlich	HG	Wildtyp	2	2,40150	,229810	,162500
			transgen	0	.	.	.
	weiblich	HG	Wildtyp	4	2,19575	,086673	,043337
			transgen	5	2,23440	,145092	,064887

5.1. Thesen

In der/ Die TG22 Linie des BACHD Rattenmodells:

1. lässt sich gegenüber gesunden Ratten eine Veränderung des Körpergewichts nachweisen, wie sie auch bei humanen Erkrankten und anderen HD- Tiermodellen zu finden ist.
2. lässt sich eine Abnahme des Hirngewichts als Hinweis auf einen Nervenzelluntergang des Gehirns registrieren.
3. liegt das Expressionslevel von mutiertem HTT innerhalb der Nervenzellen über dem von Wildtyp-HTT.
4. entspricht das Verteilungsmuster von mutiertem HTT innerhalb der verschiedenen Hirnareale dem anderer HD-Tiermodelle.
5. kann die HD-typische neuronale Aggregatsbildung des HTT-Proteins mittels immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen werden.
6. korreliert das Ausmaß der HTT-Aggregatsbildung mit der neuronalen Degeneration und der Schwere der Erkrankung.
7. bildet einen wichtigen Schritt zur Klärung der Pathophysiologie von Chorea Huntington und eröffnet die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapieansätze.

5.2. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit gebe ich folgende Erklärung ab:

Die vorgelegte Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die wörtlich oder inhaltlich verwendeten Quellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich noch kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Rostock, den

.....

Franz Dieckmann

6. Literaturverzeichnis

Abada, Y.-s. K.; Nguyen, H. P.; Ellenbroek, B.; Schreiber, R. (2013a): Reversal learning and associative memory impairments in a BACHD rat model for Huntington disease. In: *PloS one* 8 (11), e71633. DOI: 10.1371/journal.pone.0071633.

Abada, Y.-s. K.; Nguyen, H. P.; Schreiber, R.; Ellenbroek, B. (2013b): Assessment of motor function, sensory motor gating and recognition memory in a novel BACHD transgenic rat model for huntington disease. In: *PloS one* 8 (7), e68584. DOI: 10.1371/journal.pone.0068584.

Abada, Y.-s. K.; Schreiber, R.; Ellenbroek, B. (2013c): Motor, emotional and cognitive deficits in adult BACHD mice: a model for Huntington's disease. In: *Behavioural brain research* 238, S. 243–251. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.10.039.

Adjeroud, N.; Yagüe, S.; Yu-Taeger, L.; Bozon, B.; Leblanc-Veyrac, P.; Riess, O. et al. (2015): Reduced impact of emotion on choice behavior in presymptomatic BACHD rats, a transgenic rodent model for Huntington Disease. In: *Neurobiology of learning and memory* 125, S. 249–257. DOI: 10.1016/j.nlm.2015.10.003.

Albin, R. L.; Reiner, A.; Anderson, K. D.; Dure, L. S., 4th.; Handelin, B.; Balfour, R. et al. (1992): Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. In: *Annals of Neurology* 31 (4), S. 425–430. DOI: 10.1002/ana.410310412.

Albin, R. L.; Young, A. B.; Penney, J. B.; Handelin, B.; Balfour, R.; Anderson, K. D. et al. (1990): Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. In: *The New England journal of medicine* 322 (18), S. 1293–1298. DOI: 10.1056/NEJM199005033221807.

Allen, T. D.; Cronshaw, J. M.; Bagley, S.; Kiseleva, E.; Goldberg, M. W. (2000): The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. In: *Journal of cell science* 113 (Pt 10), S. 1651–1659.

Ambrose, C. M.; Duyao, M. P.; Barnes, G.; Bates, G. P.; Lin, C. S.; Srinidhi, J. et al. (1994): Structure and expression of the Huntington's disease gene. Evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. In: *Somatic cell and molecular genetics* 20 (1), S. 27–38. DOI: 10.1007/BF02257483.

- Andresen, J. M.; Gayan, J.; Djousse, L.; Roberts, S.; Brocklebank, D.; Cherny, S. S. et al. (2007): The relationship between CAG repeat length and age of onset differs for Huntington's disease patients with juvenile onset or adult onset. In: *Annals of human genetics* 71 (Pt 3), S. 295–301. DOI: 10.1111/j.1469-1809.2006.00335.x.
- Arrasate, M.; Mitra, S.; Schweitzer, E. S.; Segal, M. R.; Finkbeiner, S. (2004): Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. In: *Nature* 431 (7010), S. 805–810. DOI: 10.1038/nature02998.
- Aziz, N. A.; van der Burg, J. M.; Landwehrmeyer, G. B.; Brundin, P.; Stijnen, T.; Roos, R. A. (2008): Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number. In: *Neurology* 71 (19), S. 1506–1513. DOI: 10.1212/01.wnl.0000334276.09729.0e.
- Baquet, Z. C.; Gorski, J. A.; Jones, K. R. (2004): Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (17), S. 4250–4258. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3920-03.2004.
- Bates, G.; Tabrizi, S.; Jones, L. (Hg.) (2014): Huntington's disease. Fourth edition, edited by Gillian Bates, Sarah Tabrizi, and Lesley Jones. [Oxford]: Oxford University Press (Oxford monographs on medical genetics).
- Baxa, M.; Hruska-Plochan, M.; Juhas, S.; Vodicka, P.; Pavlok, A.; Juhasova, J. et al. (2013): A transgenic minipig model of Huntington's Disease. In: *Journal of Huntington's disease* 2 (1), S. 47–68. DOI: 10.3233/JHD-130001.
- Bayram-Weston, Z.; Jones, L.; Dunnett, S. B.; Brooks, S. P. (2012): Light and electron microscopic characterization of the evolution of cellular pathology in YAC128 Huntington's disease transgenic mice. In: *Brain research bulletin* 88 (2-3), S. 137–147. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2011.05.005.
- Bayram-Weston, Z.; Jones, L.; Dunnett, S. B.; Brooks, S. P. (2016): Comparison of mHTT Antibodies in Huntington's Disease Mouse Models Reveal Specific Binding Profiles and Steady-State Ubiquitin Levels with Disease Development. In: *PloS one* 11 (5), e0155834. DOI: 10.1371/journal.pone.0155834.
- Becher, M. W.; Kotzuk, J. A.; Sharp, A. H.; Davies, S. W.; Bates, G. P.; Price, D. L.; Ross, C. A. (1998): Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and

pallidoluysian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. In: *Neurobiology of disease* 4 (6), S. 387–397. DOI: 10.1006/nbdi.1998.0168.

Bennett, E. J.; Bence, N. F.; Jayakumar, R.; Kopito, R. R. (2005): Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. In: *Molecular cell* 17 (3), S. 351–365. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.12.021.

Brignull, H. R.; Morley, J. F.; Garcia, S. M.; Morimoto, R. I. (2006): Modeling Polyglutamine Pathogenesis in *C. elegans*. In: Indu Kheterpal und Ronald Wetzel (Hg.): *Amyloid, prions, and other protein aggregates*, Bd. 412. Amsterdam [u.a.]: Elsevier (Methods in Enzymology, 412), S. 256–282. DOI: 10.1016/S0076-6879(06)12016-9.

Cao, C.; Temel, Y.; Blokland, A.; Ozen, H.; Steinbusch, H. W.; Vlamings, R. et al. (2006): Progressive deterioration of reaction time performance and choreiform symptoms in a new Huntington's disease transgenic ratmodel. In: *Behavioural brain research* 170 (2), S. 257–261. DOI: 10.1016/j.bbr.2006.02.028.

Chan, A. W.; Jiang, J.; Chen, Y.; Li, C.; Prucha, M. S.; Hu, Y. et al. (2015): Progressive cognitive deficit, motor impairment and striatal pathology in a transgenic Huntington disease monkey model from infancy to adulthood. In: *PloS one* 10 (5), e0122335. DOI: 10.1371/journal.pone.0122335.

Chan, A. W.; Xu, Y.; Jiang, J.; Rahim, T.; Zhao, D.; Kocerha, J. et al. (2014): A two years longitudinal study of a transgenic Huntington disease monkey. In: *BMC neuroscience* 15, S. 36. DOI: 10.1186/1471-2202-15-36.

Chang, D. T.; Rintoul, G. L.; Pandipati, S.; Reynolds, I. J. (2006): Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. In: *Neurobiology of disease* 22 (2), S. 388–400. DOI: 10.1016/j.nbd.2005.12.007.

Clemens, L. E.; Weber, J. J.; Wlodkowski, T. T.; Yu-Taeger, L.; Michaud, M.; Calaminus, C. et al. (2015): Olesoxime suppresses calpain activation and mutant huntingtin fragmentation in the BACHD rat. In: *Brain : a journal of neurology*. DOI: 10.1093/brain/awv290.

Clemensson, E. K.; Clemensson, L. E.; Fabry, B.; Riess, O.; Nguyen, H. P. (2017a): Further investigation of phenotypes and confounding factors of progressive ratio performance and feeding behavior in the BACHD rat model of Huntington disease. In: *PloS one* 12 (3), e0173232. DOI: 10.1371/journal.pone.0173232.

- Clemensson, E. K.; Clemensson, L. E.; Riess, O.; Nguyen, H. P. (2017b): The BACHD Rat Model of Huntington Disease Shows Signs of Fronto-Striatal Dysfunction in Two Operant Conditioning Tests of Short-Term Memory. In: *PloS one* 12 (1), e0169051. DOI: 10.1371/journal.pone.0169051.
- Colby, D. W.; Chu, Y.; Cassady, J. P.; Duennwald, M.; Zazulak, H.; Webster, J. M. et al. (2004): Potent inhibition of huntingtin aggregation and cytotoxicity by a disulfide bond-free single-domain intracellular antibody. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (51), S. 17616–17621. DOI: 10.1073/pnas.0408134101.
- Colomer, V. (1997): Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) binds to a Trio-like polypeptide, with a rac1 guanine nucleotide exchange factor domain. In: *Human molecular genetics* 6 (9), S. 1519–1525. DOI: 10.1093/hmg/6.9.1519.
- Crittenden, J. R.; Graybiel, A. M. (2011): Basal Ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. In: *Frontiers in neuroanatomy* 5, S. 59. DOI: 10.3389/fnana.2011.00059.
- Crossman, A. R.; Mitchell, I. J.; SAMBROOK, M. A.; JACKSON, A. (1988): CHOREA AND MYOCLONUS IN THE MONKEY INDUCED BY GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID ANTAGONISM IN THE LENTIFORM COMPLEX. In: *Brain* 111 (5), S. 1211–1233. DOI: 10.1093/brain/111.5.1211.
- Davies, S. W.; Turmaine, M.; Cozens, B. A.; DiFiglia, M.; Sharp, A. H.; Ross, C. A. et al. (1997): Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. In: *Cell* 90 (3), S. 537–548. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80513-9.
- del Toro, D.; Alberch, J.; Lázaro-Diéguez, F.; Martín-Ibáñez, R.; Xifró, X.; Egea, G.; Canals, J. M. (2009): Mutant huntingtin impairs post-Golgi trafficking to lysosomes by delocalizing optineurin/Rab8 complex from the Golgi apparatus. In: *Molecular biology of the cell* 20 (5), S. 1478–1492. DOI: 10.1091/mbc.E08-07-0726.
- Deng, Y. P.; Albin, R. L.; Penney, J. B.; Young, A. B.; Anderson, K. D.; Reiner, A. (2004): Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 27 (3), S. 143–164. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2004.02.005.

- Di Maio, L.; Squitieri, F.; Napolitano, G.; Campanella, G.; Trofatter, J. A.; Conneally, P. M. (1993): Suicide risk in Huntington's disease. In: *Journal of medical genetics* 30 (4), S. 293–295. DOI: 10.1136/jmg.30.4.293.
- DiFiglia, M.; Sapp, E.; Chase, K.; Schwarz, C.; Meloni, A.; Young, C. et al. (1995): Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. In: *Neuron* 14 (5), S. 1075–1081. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90346-1.
- DiFiglia, M.; Sapp, E.; Chase, K. O.; Davies, S. W.; Bates, G. P.; Vonsattel, J. P.; Aronin, N. (1997): Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5334), S. 1990–1993. DOI: 10.1126/science.277.5334.1990.
- Djousse, L.; Knowlton, B.; Hayden, M.; Almqvist, E. W.; Brinkman, R.; Ross, C. et al. (2003): Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. In: *American journal of medical genetics. Part A* 119A (3), S. 279–282. DOI: 10.1002/ajmg.a.20190.
- Dr. Carsten Holzmann (2015): BACHD transgenic rats. Rostock, 15.01.2015. E-mail an Franz Dieckmann.
- Dunah, A. W.; Jeong, H.; Griffin, A.; Kim, Y.-M.; Standaert, D. G.; Hersch, S. M. et al. (2002): Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5576), S. 2238–2243. DOI: 10.1126/science.1072613.
- Dure, L. S.; Landwehrmeyer, B. G.; Golden, J.; McNeil, S. M.; Ge, P.; Aizawa, H. et al. (1994): IT15 gene expression in fetal human brain. In: *Brain research* 659 (1-2), S. 33–41. DOI: 10.1016/0006-8993(94)90860-5.
- El Massioui, N.; Lamirault, C.; Yague, S.; Adjeroud, N.; Garces, D.; Maillard, A. et al. (2016): Impaired Decision Making and Loss of Inhibitory-Control in a Rat Model of Huntington Disease. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 10, S. 204. DOI: 10.3389/fnbeh.2016.00204.
- Engelender, S.; Sharp, A. H.; Colomer, V.; Tokito, M. K.; Lanahan, A.; Worley, P. et al. (1997): Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. In: *Human molecular genetics* 6 (13), S. 2205–2212. DOI: 10.1093/hmg/6.13.2205.

- Evers, M. M.; Schut, M. H.; Peppers, B. A.; Atalar, M.; van Belzen, M. J.; Faull, R. L. et al. (2015): Making (anti-) sense out of huntingtin levels in Huntington disease. In: *Molecular neurodegeneration* 10, S. 21. DOI: 10.1186/s13024-015-0018-7.
- Fain, J. N.; Del Mar, N. A.; Meade, C. A.; Reiner, A.; Goldowitz, D. (2001): Abnormalities in the functioning of adipocytes from R6/2 mice that are transgenic for the Huntington's disease mutation. In: *Human molecular genetics* 10 (2), S. 145–152. DOI: 10.1093/hmg/10.2.145.
- Fan, W.; Nassiri, A.; Zhong, Q. (2011): Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (19), S. 7769–7774. DOI: 10.1073/pnas.1016472108.
- Ferrante, R. J.; Gutekunst, C. A.; Persichetti, F.; McNeil, S. M.; Kowall, N. W.; Gusella, J. F. et al. (1997): Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (9), S. 3052–3063.
- Ferrante, R. J.; Kowall, N. W.; Beal, M. F.; Martin, J. B.; Bird, E. D.; Richardson, E. P., JR (1987): Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 46 (1), S. 12–27. DOI: 10.1097/00005072-198701000-00002.
- Fink, K. D.; Rossignol, J.; Crane, A. T.; Davis, K. K.; Bavar, A. M.; Dekorver, N. W. et al. (2012): Early cognitive dysfunction in the HD 51 CAG transgenic rat model of Huntington's disease. In: *Behavioral neuroscience* 126 (3), S. 479–487. DOI: 10.1037/a0028028.
- Gafni, J.; Ellerby, L. M. (2002): Calpain activation in Huntington's disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (12), S. 4842–4849.
- Gafni, J.; Hermel, E.; Young, J. E.; Wellington, C. L.; Hayden, M. R.; Ellerby, L. M. (2004): Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (19), S. 20211–20220. DOI: 10.1074/jbc.M401267200.
- Gafni, J.; Papanikolaou, T.; Degiacomo, F.; Holcomb, J.; Chen, S.; Menalled, L. et al. (2012): Caspase-6 activity in a BACHD mouse modulates steady-state levels of mutant huntingtin protein but is not necessary for production of a 586 amino acid proteolytic fragment. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (22), S. 7454–7465. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6379-11.2012.

Gauthier, L. R.; Charrin, B. C.; Borrell-Pages, M.; Dompierre, J. P.; Rangone, H.; Cordelieres, F. P. et al. (2004): Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. In: *Cell* 118 (1), S. 127–138. DOI: 10.1016/j.cell.2004.06.018.

Gómez-Tortosa, E.; MacDonald, M. E.; Friend, J. C.; Taylor, S. A.; Weiler, L. J.; Cupples, L. A. et al. (2001): Quantitative neuropathological changes in presymptomatic Huntington's disease. In: *Annals of Neurology* 49 (1), S. 29–34. DOI: 10.1002/1531-8249(200101)49:1<29::AID-ANA7>3.0.CO;2-B.

Gourfinkel-An, I.; Cancel, G.; Duyckaerts, C.; Faucheux, B.; Hauw, J. J.; Trottier, Y. et al. (1998): Neuronal distribution of intranuclear inclusions in Huntington's disease with adult onset. In: *Neuroreport* 9 (8), S. 1823–1826.

Gourfinkel-An, I.; Cancel, G.; Trottier, Y.; Devys, D.; Tora, L.; Lutz, Y. et al. (1997): Differential distribution of the normal and mutated forms of huntingtin in the human brain. In: *Annals of Neurology* 42 (5), S. 712–719. DOI: 10.1002/ana.410420507.

Graham, R. K.; Deng, Y.; Slow, E. J.; Haigh, B.; Bissada, N.; Lu, G. et al. (2006a): Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. In: *Cell* 125 (6), S. 1179–1191. DOI: 10.1016/j.cell.2006.04.026.

Graham, R. K.; Slow, E. J.; Deng, Y.; Bissada, N.; Lu, G.; Pearson, J. et al. (2006b): Levels of mutant huntingtin influence the phenotypic severity of Huntington disease in YAC128 mouse models. In: *Neurobiology of disease* 21 (2), S. 444–455. DOI: 10.1016/j.nbd.2005.08.007.

Graveland, G.; Williams, R.; DiFiglia, M. (1985): Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. In: *Science* 227 (4688), S. 770–773. DOI: 10.1126/science.3155875.

Gray, M.; Shirasaki, D. I.; Cepeda, C.; André, V. M.; Wilburn, B.; Lu, X.-H. et al. (2008): Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (24), S. 6182–6195. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0857-08.2008.

Graybiel, A. M. (1990): Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. In: *Trends in neurosciences* 13 (7), S. 244–254. DOI: 10.1016/0166-2236(90)90104-I.

- Graybiel, A. M.; Ragsdale, C. W., JR (1978): Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (11), S. 5723–5726. DOI: 10.1073/pnas.75.11.5723.
- Gutekunst, C. A.; Levey, A. I.; Heilman, C. J.; Whaley, W. L.; Yi, H.; Nash, N. R. et al. (1995): Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (19), S. 8710–8714. DOI: 10.1073/pnas.92.19.8710.
- Gutekunst, C. A.; Li, S. H.; Yi, H.; Mulroy, J. S.; Kuemmerle, S.; Jones, R. et al. (1999): Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (7), S. 2522–2534.
- Hackam, A. S.; Singaraja, R.; Wellington, C. L.; Metzler, M.; McCutcheon, K.; Zhang, T. et al. (1998): The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. In: *The Journal of cell biology* 141 (5), S. 1097–1105. DOI: 10.1083/jcb.141.5.1097.
- Halliday, G. M.; McRitchie, D. A.; Macdonald, V.; Double, K. L.; Trent, R. J.; McCusker, E. (1998): Regional specificity of brain atrophy in Huntington's disease. In: *Experimental neurology* 154 (2), S. 663–672. DOI: 10.1006/exnr.1998.6919.
- Hamilton, J. M. (2004): Rate and correlates of weight change in Huntington's disease. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 75 (2), S. 209–212. DOI: 10.1136/jnnp.2003.017822.
- Hattula, K.; Peranen, J. (2000): FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. In: *Current biology : CB* 10 (24), S. 1603–1606. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)00864-2.
- Hedreen, J. C.; Folstein, S. E. (1995): Early Loss of Neostriatal Striosome Neurons in Huntington's Disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 54 (1), S. 105–120. DOI: 10.1097/00005072-199501000-00013.
- Hedreen, J. C.; Peyser, C. E.; Folstein, S. E.; Ross, C. A. (1991): Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. In: *Neuroscience letters* 133 (2), S. 257–261. DOI: 10.1016/0304-3940(91)90583-F.

- Henley, S. M.; Wild, E. J.; Hobbs, N. Z.; Scahill, R. I.; Ridgway, G. R.; Macmanus, D. G. et al. (2009): Relationship between CAG repeat length and brain volume in premanifest and early Huntington's disease. In: *Journal of neurology* 256 (2), S. 203–212. DOI: 10.1007/s00415-009-0052-x.
- Herndon, E. S.; Hladik, C. L.; Shang, P.; Burns, D. K.; Raisanen, J.; White, C. L. (2009): Neuroanatomic profile of polyglutamine immunoreactivity in Huntington disease brains. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 68 (3), S. 250–261. DOI: 10.1097/NEN.0b013e318198d320.
- Herrera, F.; Tenreiro, S.; Miller-Fleming, L.; Outeiro, T. F. (2011): Visualization of cell-to-cell transmission of mutant huntingtin oligomers. In: *PLoS currents* 3, RRN1210. DOI: 10.1371/currents.RRN1210.
- Hodgson, J. (1996): Human huntingtin derived from YAC transgenes compensates for loss of murine huntingtin by rescue of the embryonic lethal phenotype. In: *Human molecular genetics* 5 (12), S. 1875–1885. DOI: 10.1093/hmg/5.12.1875.
- Hodgson, J. G.; Agopyan, N.; Gutekunst, C.-A. A.; Leavitt, B. R.; LePiane, F.; Singaraja, R. et al. (1999): A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. In: *Neuron* 23 (1), S. 181–192. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80764-3.
- Hoffner, G.; Island, M.-L.; Djian, P. (2005): Purification of neuronal inclusions of patients with Huntington's disease reveals a broad range of N-terminal fragments of expanded huntingtin and insoluble polymers. In: *Journal of neurochemistry* 95 (1), S. 125–136. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03348.x.
- Holbert, S.; Dedeoglu, A.; Humbert, S.; Saudou, F.; Ferrante, R. J.; Neri, C. (2003): Cdc42-interacting protein 4 binds to huntingtin: neuropathologic and biological evidence for a role in Huntington's disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (5), S. 2712–2717. DOI: 10.1073/pnas.0437967100.
- Holzmann, C. (2015): BACHD transgenic rats: Results of behavioral tests: - Cognition - Motoric abilities - Emotionality; E-mail an Dieckmann, F.; 15.01.2015
- Hoogeveen, A. T.; Willemsen, R.; Meyer, N.; Rooij, K. E. de; Roos, R. A.; van Ommen, G. J.; Galjaard, H. (1993): Characterization and localization of the Huntington disease gene product. In: *Human molecular genetics* 2 (12), S. 2069–2073. DOI: 10.1093/hmg/2.12.2069.

- Horsten, S. von; Schmitt, I.; Nguyen, H. P.; Holzmann, C.; Schmidt, T.; Walther, T. et al. (2003): Transgenic rat model of Huntington's disease. In: *Human molecular genetics* 12 (6), S. 617–624. DOI: 10.1093/hmg/ddg075.
- Huang, C. C.; Faber, P. W.; Persichetti, F.; Mittal, V.; Vonsattel, J. P.; MacDonald, M. E.; Gusella, J. F. (1998): Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins. In: *Somatic cell and molecular genetics* 24 (4), S. 217–233. DOI: 10.1023/B:SCAM.0000007124.19463.e5.
- Iannaccone, P. M.; Jacob, H. J. (2009): Rats! In: *Disease models & mechanisms* 2 (5-6), S. 206–210. DOI: 10.1242/dmm.002733.
- Iuchi, S.; Hoffner, G.; Verbeke, P.; Djian, P.; Green, H. (2003): Oligomeric and polymeric aggregates formed by proteins containing expanded polyglutamine. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (5), S. 2409–2414. DOI: 10.1073/pnas.0437660100.
- Jacobsen, J. C.; Bawden, C. S.; Rudiger, S. R.; McLaughlan, C. J.; Reid, S. J.; Waldvogel, H. J. et al. (2010): An ovine transgenic Huntington's disease model. In: *Human molecular genetics* 19 (10), S. 1873–1882. DOI: 10.1093/hmg/ddq063.
- Janssen, J.; Laatz, W. (2017): Statistische Datenanalyse mit SPSS. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-662-53477-9.
- Jansson, E. K.; Clemens, L. E.; Riess, O.; Nguyen, H. P. (2014): Reduced motivation in the BACHD rat model of Huntington disease is dependent on the choice of food deprivation strategy. In: *PLoS one* 9 (8), e105662. DOI: 10.1371/journal.pone.0105662.
- Jarrett, J. T.; Lansbury, P. T. (1993): Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid. A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? In: *Cell* 73 (6), S. 1055–1058. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90635-4.
- Kantor, O.; Temel, Y.; Holzmann, C.; Raber, K.; Nguyen, H.-P.; Cao, C. et al. (2006): Selective striatal neuron loss and alterations in behavior correlate with impaired striatal function in Huntington's disease transgenic rats. In: *Neurobiology of disease* 22 (3), S. 538–547. DOI: 10.1016/j.nbd.2005.12.014.
- Kar, K.; Jayaraman, M.; Sahoo, B.; Kodali, R.; Wetzel, R. (2011): Critical nucleus size for disease-related polyglutamine aggregation is repeat-length dependent. In: *Nature structural & molecular biology* 18 (3), S. 328–336. DOI: 10.1038/nsmb.1992.

Kaushik, S.; Singh, R.; Cuervo, A. M. (2010): Autophagic pathways and metabolic stress. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 12 Suppl 2, S. 4–14. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2010.01263.x.

Kennedy, L.; Evans, E.; Chen, C.-M.; Craven, L.; Detloff, P. J.; Ennis, M.; Shelbourne, P. F. (2003): Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. In: *Human molecular genetics* 12 (24), S. 3359–3367. DOI: 10.1093/hmg/ddg352.

Khoshnan, A.; Ko, J.; Watkin, E. E.; Paige, L. A.; Reinhart, P. H.; Patterson, P. H. (2004): Activation of the IkappaB kinase complex and nuclear factor-kappaB contributes to mutant huntingtin neurotoxicity. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (37), S. 7999–8008. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2675-04.2004.

Kirch, R. D.; Meyer, P. T.; Geisler, S.; Braun, F.; Gehrig, S.; Langen, K.-J. et al. (2013): Early deficits in declarative and procedural memory dependent behavioral function in a transgenic rat model of Huntington's disease. In: *Behavioural brain research* 239, S. 15–26. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.10.048.

Kirkwood, S. C.; Su, J. L.; Conneally, P. M.; Foroud, T. (2001): Progression of Symptoms in the Early and Middle Stages of Huntington Disease. In: *Arch Neurol* 58 (2), S. 273. DOI: 10.1001/archneur.58.2.273.

Kittler, J. T.; Thomas, P.; Tretter, V.; Bogdanov, Y. D.; Haucke, V.; Smart, T. G.; Moss, S. J. (2004): Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (34), S. 12736–12741. DOI: 10.1073/pnas.0401860101.

Koga, H.; Martinez-Vicente, M.; Arias, E.; Kaushik, S.; Sulzer, D.; Cuervo, A. M. (2011): Constitutive upregulation of chaperone-mediated autophagy in Huntington's disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (50), S. 18492–18505. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3219-11.2011.

Kremer, B.; Almqvist, E.; Theilmann, J.; Spence, N.; Telenius, H.; Goldberg, Y. P.; Hayden, M. R. (1995): Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. In: *American journal of human genetics* 57 (2), S. 343–350.

- Krench, M.; Littleton, J. T. (2013): Modeling Huntington disease in *Drosophila*: Insights into axonal transport defects and modifiers of toxicity. In: *Fly* 7 (4), S. 229–236. DOI: 10.4161/fly.26279.
- Kuemmerle, S.; Gutekunst, C. A.; Klein, A. M.; Li, X. J.; Li, S. H.; Beal, M. F. et al. (1999): Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. In: *Annals of Neurology* 46 (6), S. 842–849. DOI: 10.1002/1531-8249(199912)46:6<842::AID-ANA6>3.0.CO;2-O.
- La Monte, S. M. de; Vonsattel, J. P.; Richardson, E. P., JR (1988): Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 47 (5), S. 516–525. DOI: 10.1097/00005072-198809000-00003.
- Labadorf, A. T.; Myers, R. H. (2015): Evidence of Extensive Alternative Splicing in Post Mortem Human Brain HTT Transcription by mRNA Sequencing. In: *PloS one* 10 (10), e0141298. DOI: 10.1371/journal.pone.0141298.
- Laforet, G. A.; Sapp, E.; Chase, K.; McIntyre, C.; Boyce, F. M.; Campbell, M. et al. (2001): Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (23), S. 9112–9123.
- Lakhani, V. V.; Ding, F.; Dokholyan, N. V. (2010): Polyglutamine induced misfolding of huntingtin exon1 is modulated by the flanking sequences. In: *PLoS computational biology* 6 (4), e1000772. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000772.
- Landles, C.; Sathasivam, K.; Weiss, A.; Woodman, B.; Moffitt, H.; Finkbeiner, S. et al. (2010): Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (12), S. 8808–8823. DOI: 10.1074/jbc.M109.075028.
- Landles, C.; Weiss, A.; Franklin, S.; Howland, D.; Bates, G. (2012): Caspase-6 does not contribute to the proteolysis of mutant huntingtin in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington ' s disease, S. 1–12. DOI: 10.1371/4fd085bfc9973.Funding.
- Landwehrmeyer, G. B.; McNeil, S. M.; Dure, L. S., 4th.; Ge, P.; Aizawa, H.; Huang, Q. et al. (1995): Huntington's disease gene: regional and cellular expression in brain of normal and

affected individuals. In: *Annals of Neurology* 37 (2), S. 218–230. DOI: 10.1002/ana.410370213.

Langbehn, D. R.; Hayden, M. R.; Paulsen, J. S. (2010): CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): a review and validation study of statistical approaches. In: *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B (2), S. 397–408. DOI: 10.1002/ajmg.b.30992.

Lange, H.; Thorner, G.; Hopf, A.; Schroder, K. F. (1976): Morphometric studies of the neuropathological changes in choreatic diseases. In: *Journal of the neurological sciences* 28 (4), S. 401–425. DOI: 10.1016/0022-510X(76)90114-3.

Lanska, D. J. (1988): Conditions Associated With Huntington's Disease at Death. In: *Arch Neurol* 45 (8), S. 878. DOI: 10.1001/archneur.1988.00520320068017.

Legleiter, J.; Mitchell, E.; Lotz, G. P.; Sapp, E.; Ng, C.; DiFiglia, M. et al. (2010): Mutant huntingtin fragments form oligomers in a polyglutamine length-dependent manner in vitro and in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (19), S. 14777–14790. DOI: 10.1074/jbc.M109.093708.

Lewis, E. A.; Smith, G. A. (2016): Using *Drosophila* models of Huntington's disease as a translatable tool. In: *Journal of Neuroscience Methods* 265, S. 89–98. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.07.026.

Li, S.-H.; Schilling, G.; Young, W. S.; Li, X.-.; Margolis, R. L.; Stine, O. C. et al. (1993): Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. In: *Neuron* 11 (5), S. 985–993. DOI: 10.1016/0896-6273(93)90127-D.

Li, X. J.; Li, S. H.; Sharp, A. H.; Nucifora, F. C., JR; Schilling, G.; Lanahan, A. et al. (1995): A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. In: *Nature* 378 (6555), S. 398–402. DOI: 10.1038/378398a0.

Li, Y.; Chin, L.-S.; Levey, A. I.; Li, L. (2002): Huntingtin-associated protein 1 interacts with hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate and functions in endosomal trafficking. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (31), S. 28212–28221. DOI: 10.1074/jbc.M111612200.

Lin, B.; Rommens, J. M.; Graham, R. K.; Kalchman, M.; MacDonald, H.; Nasir, J. et al. (1993): Differential 3' polyadenylation of the Huntington disease gene results in two mRNA

species with variable tissue expression. In: *Human molecular genetics* 2 (10), S. 1541–1545. DOI: 10.1093/hmg/2.10.1541.

Lin, C. H.; Tallaksen-Greene, S.; Chien, W. M.; Cearley, J. A.; Jackson, W. S.; Crouse, A. B. et al. (2001): Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. In: *Human molecular genetics* 10 (2), S. 137–144. DOI: 10.1093/hmg/10.2.137.

Liu, Y. F.; Deth, R. C.; Devys, D. (1997): SH3 Domain-dependent Association of Huntingtin with Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Complexes. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (13), S. 8121–8124. DOI: 10.1074/jbc.272.13.8121.

Lüesse, H. (2001): Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease. Behavioral testing and impact of diabetes mellitus. In: *Behavioural brain research* 126 (1-2), S. 185–195. DOI: 10.1016/S0166-4328(01)00261-3.

Lunkes, A.; Lindenberg, K. S.; Ben-Häïem, L.; Weber, C.; Devys, D.; Landwehrmeyer, G. et al. (2002): Proteases Acting on Mutant Huntingtin Generate Cleaved Products that Differentially Build Up Cytoplasmic and Nuclear Inclusions. In: *Molecular cell* 10 (2), S. 259–269. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00602-0.

Maat-Schieman, M. L.; Dorsman, J. C.; Smoor, M. A.; Siesling, S.; van Duinen, S. G.; Verschuuren, J. J. et al. (1999): Distribution of inclusions in neuronal nuclei and dystrophic neurites in Huntington disease brain. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58 (2), S. 129–137. DOI: 10.1097/00005072-199902000-00003.

Manfre, G.; Doyere, V.; Bossi, S.; Riess, O.; Nguyen, H. P.; El Massioui, N. (2016): Impulsivity trait in the early symptomatic BACHD transgenic rat model of Huntington disease. In: *Behavioural brain research* 299, S. 6–10. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.11.007.

Mangiarini, L.; Sathasivam, K.; Mahal, A.; Mott, R.; Seller, M.; Bates, G. P. (1997): Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. In: *Nature genetics* 15 (2), S. 197–200. DOI: 10.1038/ng0297-197.

Mangiarini, L.; Sathasivam, K.; Seller, M.; Cozens, B.; Harper, A.; Hetherington, C. et al. (1996): Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. In: *Cell* 87 (3), S. 493–506. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81369-0.

- Manley, M. S.; Young, S. J.; Groves, P. M. (1994): Compartmental organization of the peptide network in the human caudate nucleus. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 7 (3), S. 191–201. DOI: 10.1016/0891-0618(94)90029-9.
- Martin, D. D.; Heit, R. J.; Yap, M. C.; Davidson, M. W.; Hayden, M. R.; Berthiaume, L. G. (2014): Identification of a post-translationally myristoylated autophagy-inducing domain released by caspase cleavage of huntingtin. In: *Human molecular genetics* 23 (12), S. 3166–3179. DOI: 10.1093/hmg/ddu027.
- Martinez-Vicente, M.; Tallozy, Z.; Wong, E.; Tang, G.; Koga, H.; Kaushik, S. et al. (2010): Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. In: *Nature neuroscience* 13 (5), S. 567–576. DOI: 10.1038/nn.2528.
- McGuire, J. R.; Rong, J.; Li, S.-H.; Li, X.-J. (2006): Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (6), S. 3552–3559. DOI: 10.1074/jbc.M509806200.
- Menalled, L.; El-Khodor, B. F.; Patry, M.; Suárez-Fariñas, M.; Orenstein, S. J.; Zahasky, B. et al. (2009): Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. In: *Neurobiology of disease* 35 (3), S. 319–336. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.05.007.
- Menalled, L.; Lutz, C.; Ramboz, S.; Brunner, D.; Lager, B.; Noble, S. et al. (Hg.): *A Field Guide to Working with Mouse Models of Huntington's Disease* 2014.
- Menalled, L. B.; Sison, J. D.; Dragatsis, I.; Zeitlin, S.; Chesselet, M.-F. (2003): Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. In: *The Journal of comparative neurology* 465 (1), S. 11–26. DOI: 10.1002/cne.10776.
- Menalled, L. B.; Sison, J. D.; Wu, Y.; Olivieri, M.; Li, X.-J.; Li, H. et al. (2002): Early Motor Dysfunction and Striosomal Distribution of Huntingtin Microaggregates in Huntington's Disease Knock-In Mice. In: *J. Neurosci.* 22 (18), S. 8266–8276. Online verfügbar unter <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/22/18/8266.full.pdf>.
- Metzler, M.; Legendre-Guillemain, V.; Gan, L.; Chopra, V.; Kwok, A.; McPherson, P. S.; Hayden, M. R. (2001): HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (42), S. 39271–39276. DOI: 10.1074/jbc.C100401200.

- Miller, J.; Arrasate, M.; Brooks, E.; Libeu, C. P.; Legleiter, J.; Hatters, D. et al. (2011): Identifying polyglutamine protein species in situ that best predict neurodegeneration. In: *Nature chemical biology* 7 (12), S. 925–934. DOI: 10.1038/nchembio.694.
- Miller, J.; Arrasate, M.; Shaby, B. A.; Mitra, S.; Masliah, E.; Finkbeiner, S. (2010): Quantitative relationships between huntingtin levels, polyglutamine length, inclusion body formation, and neuronal death provide novel insight into huntington's disease molecular pathogenesis. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (31), S. 10541–10550. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0146-10.2010.
- Millipore (2005): MOUSE ANTI-HUNTINGTIN MONOCLONAL ANTIBODY. MAB5374. Hg. v. Millipore Corporation. Online verfügbar unter http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Anti-Huntingtin-Protein-Antibody-clone-mEM48,MM_NF-MAB5374?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.de%2F, zuletzt geprüft am 27.02.2018.
- Millipore (2008): MOUSE ANTI-POLYGLUTAMINE Polyglutamine-Expansion Diseases Marker MONOCLONAL ANTIBODY. 5TF1-1C2. Hg. v. Millipore Corporation. Online verfügbar unter http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Anti-Polyglutamine-Expansion-Diseases-Marker-Antibody-clone-5TF1-1C2,MM_NF-MAB1574?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.de%2F&bd=1#documentation, zuletzt geprüft am 27.02.2018.
- Mishra, S. K.; Agostinelli, N. R.; Brett, T. J.; Mizukami, I.; Ross, T. S.; Traub, L. M. (2001): Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (49), S. 46230–46236. DOI: 10.1074/jbc.M108177200.
- Modregger, J. (2002): PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. In: *Human molecular genetics* 11 (21), S. 2547–2558. DOI: 10.1093/hmg/11.21.2547.
- Moffitt, H.; McPhail, G. D.; Woodman, B.; Hobbs, C.; Bates, G. P. (2009): Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. In: *PloS one* 4 (11), e8025. DOI: 10.1371/journal.pone.0008025.

- Möller, T. (2010): Neuroinflammation in Huntington's disease. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 117 (8), S. 1001–1008. DOI: 10.1007/s00702-010-0430-7.
- Morton, A. J.; Nicholson, L. F.; Faull, R. L. (1993): Compartmental loss of NADPH diaphorase in the neuropil of the human striatum in Huntington's disease. In: *Neuroscience* 53 (1), S. 159–168. DOI: 10.1016/0306-4522(93)90294-P.
- Myers, R. H.; Vonsattel, J. P.; Paskevich, P. A.; Kiely, D. K.; Stevens, T. J.; Cupples, L. A. et al. (1991): Decreased neuronal and increased oligodendroglial densities in Huntington's disease caudate nucleus. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 50 (6), S. 729–742. DOI: 10.1097/00005072-199111000-00005.
- Nagai, Y.; Inui, T.; Popiel, H. A.; Fujikake, N.; Hasegawa, K.; Urade, Y. et al. (2007): A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. In: *Nature structural & molecular biology* 14 (4), S. 332–340. DOI: 10.1038/nsmb1215.
- Nagai, Y.; Tucker, T.; Ren, H.; Kenan, D. J.; Henderson, B. S.; Keene, J. D. et al. (2000): Inhibition of polyglutamine protein aggregation and cell death by novel peptides identified by phage display screening. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (14), S. 10437–10442. DOI: 10.1074/jbc.275.14.10437.
- Nasir, J.; Floresco, S. B.; O'Kusky, J. R.; Diewert, V. M.; Richman, J. M.; Zeisler, J. et al. (1995): Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. In: *Cell* 81 (5), S. 811–823. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90542-1.
- Nguyen, H. H.; Cenci, M. A. (2015): Behavioral Neurobiology of Huntington's Disease and Parkinson's Disease. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (22). DOI: 10.1007/978-3-662-46344-4.
- Nguyen, H. P.; Kobbe, P.; Rahne, H.; Worpel, T.; Jager, B.; Stephan, M. et al. (2006): Behavioral abnormalities precede neuropathological markers in rats transgenic for Huntington's disease. In: *Human molecular genetics* 15 (21), S. 3177–3194. DOI: 10.1093/hmg/ddl394.
- Nucifora, L. G.; Burke, K. A.; Feng, X.; Arbez, N.; Zhu, S.; Miller, J. et al. (2012): Identification of novel potentially toxic oligomers formed in vitro from mammalian-derived

- expanded huntingtin exon-1 protein. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (19), S. 16017–16028. DOI: 10.1074/jbc.M111.252577.
- Nucifora, F. C., JR; Sasaki, M.; Peters, M. F.; Huang, H.; Cooper, J. K.; Yamada, M. et al. (2001): Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. In: *Science (New York, N.Y.)* 291 (5512), S. 2423–2428. DOI: 10.1126/science.1056784.
- Oliveira, A. O.; Osmand, A.; Outeiro, T. F.; Muchowski, P. J.; Finkbeiner, S. (2016): α B-Crystallin overexpression in astrocytes modulates the phenotype of the BACHD mouse model of Huntington's disease. In: *Human molecular genetics* 25 (9), S. 1677–1689. DOI: 10.1093/hmg/ddw028.
- Olzscha, H.; Schermann, S. M.; Woerner, A. C.; Pinkert, S.; Hecht, M. H.; Tartaglia, G. G. et al. (2011): Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. In: *Cell* 144 (1), S. 67–78. DOI: 10.1016/j.cell.2010.11.050.
- Ona, V. O.; Li, M.; Vonsattel, J. P.; Andrews, L. J.; Khan, S. Q.; Chung, W. M. et al. (1999): Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. In: *Nature* 399 (6733), S. 263–267. DOI: 10.1038/20446.
- Ortega, Z.; Lucas, J. J. (2014): Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 7, S. 77. DOI: 10.3389/fnmol.2014.00077.
- Oyanagi, K.; Takeda, S.; Takahashi, H.; Ohama, E.; Ikuta, F. (1989): A quantitative investigation of the substantia nigra in Huntington's disease. In: *Annals of Neurology* 26 (1), S. 13–19. DOI: 10.1002/ana.410260103.
- Palfi, S.; Brouillet, E.; Jarraya, B.; Bloch, J.; Jan, C.; Shin, M. et al. (2007): Expression of mutated huntingtin fragment in the putamen is sufficient to produce abnormal movement in non-human primates. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15 (8), S. 1444–1451. DOI: 10.1038/sj.mt.6300185.
- Penzes, P.; Johnson, R. C.; Sattler, R.; Zhang, X.; Haganir, R. L.; Kambampati, V. et al. (2001): The Neuronal Rho-GEF Kalirin-7 Interacts with PDZ Domain-Containing Proteins and Regulates Dendritic Morphogenesis. In: *Neuron* 29 (1), S. 229–242. DOI: 10.1016/S0896-6273(01)00193-3.

Perutz, M. F. (1996): Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. In: *Current opinion in structural biology* 6 (6), S. 848–858. DOI: 10.1016/S0959-440X(96)80016-9.

Petrasch-Parwez, E.; Nguyen, H.-P.; Löbbecke-Schumacher, M.; Habbes, H.-W.; Wieczorek, S.; Riess, O. et al. (2007): Cellular and subcellular localization of Huntingtin [corrected] aggregates in the brain of a rat transgenic for Huntington disease. In: *The Journal of comparative neurology* 501 (5), S. 716–730. DOI: 10.1002/cne.21272.

Poirier, M. A.; Li, H.; Macosko, J.; Cai, S.; Amzel, M.; Ross, C. A. (2002): Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (43), S. 41032–41037. DOI: 10.1074/jbc.M205809200.

Pouladi, M. A.; Graham, R. K.; Karasinska, J. M.; Xie, Y.; Santos, R. D.; Petersen, A.; Hayden, M. R. (2009): Prevention of depressive behaviour in the YAC128 mouse model of Huntington disease by mutation at residue 586 of huntingtin. In: *Brain : a journal of neurology* 132 (Pt 4), S. 919–932. DOI: 10.1093/brain/awp006.

Pouladi, M. A.; Morton, A. J.; Hayden, M. R. (2013): Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. In: *Nature reviews. Neuroscience* 14 (10), S. 708–721. DOI: 10.1038/nrn3570.

Pouladi, M. A.; Stanek, L. M.; Xie, Y.; Franciosi, S.; Southwell, A. L.; Deng, Y. et al. (2012): Marked differences in neurochemistry and aggregates despite similar behavioural and neuropathological features of Huntington disease in the full-length BACHD and YAC128 mice. In: *Human molecular genetics* 21 (10), S. 2219–2232. DOI: 10.1093/hmg/dds037.

Pouladi, M. A.; Xie, Y.; Skotte, N. H.; Ehrnhoefer, D. E.; Graham, R. K.; Kim, J. E. et al. (2010): Full-length huntingtin levels modulate body weight by influencing insulin-like growth factor 1 expression. In: *Human molecular genetics* 19 (8), S. 1528–1538. DOI: 10.1093/hmg/ddq026.

Pringsheim, T.; Wiltshire, K.; Day, L.; Dykeman, J.; Steeves, T.; Jette, N. (2012): The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27 (9), S. 1083–1091. DOI: 10.1002/mds.25075.

Qiu, Z.; Norflus, F.; Singh, B.; Swindell, M. K.; Buzescu, R.; Bejarano, M. et al. (2006): Sp1 is up-regulated in cellular and transgenic models of Huntington disease, and its reduction is

neuroprotective. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (24), S. 16672–16680. DOI: 10.1074/jbc.M511648200.

Quintanilla, R. A.; Johnson, G. V. (2009): Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease. In: *Brain research bulletin* 80 (4-5), S. 242–247. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2009.07.010.

Reddy, P. H.; Williams, M.; Charles, V.; Garrett, L.; Pike-Buchanan, L.; Whetsell, W. O., JR et al. (1998): Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. In: *Nature genetics* 20 (2), S. 198–202. DOI: 10.1038/2510.

Reid, S. J.; Patassini, S.; Handley, R. R.; Rudiger, S. R.; McLaughlan, C. J.; Osmand, A. et al. (2013): Further molecular characterisation of the OVT73 transgenic sheep model of Huntington's disease identifies cortical aggregates. In: *Journal of Huntington's disease* 2 (3), S. 279–295. DOI: 10.3233/JHD-130067.

Reilmann, R.; Lippross, V.; Hölzner, E.; Gigengack, F.; Bohlen, S.; Kugel, H. et al. (2015): FDG μ PET Fails to Detect a Disease-Specific Phenotype in Rats Transgenic for Huntington's Disease – A 15 Months Follow-up Study. In: *Journal of Huntington's disease* 4 (1), S. 37–47. DOI: 10.3233/JHD-130084.

Reiner, A.; Albin, R. L.; Anderson, K. D.; D'Amato, C. J.; Penney, J. B.; Young, A. B. (1988): Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (15), S. 5733–5737.

Richfield, E. K.; Maguire-Zeiss, K. A.; Vonkeman, H. E.; Voorn, P. (1995): Preferential loss of preproenkephalin versus preprotachykinin neurons from the striatum of Huntington's disease patients. In: *Annals of Neurology* 38 (6), S. 852–861. DOI: 10.1002/ana.410380605.

Rong, J.; McGuire, J. R.; Fang, Z.-H.; Sheng, G.; Shin, J.-Y.; Li, S.-H.; Li, X.-J. (2006): Regulation of intracellular trafficking of huntingtin-associated protein-1 is critical for TrkA protein levels and neurite outgrowth. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (22), S. 6019–6030. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1251-06.2006.

Rooij, K. E. de; Dorsman, J. C.; Smoor, M. A.; Den Dunnen, J. T.; van Ommen, G. J. (1996): Subcellular localization of the Huntington's disease gene product in cell lines by

- immunofluorescence and biochemical subcellular fractionation. In: *Human molecular genetics* 5 (8), S. 1093–1099. DOI: 10.1093/hmg/5.8.1093.
- Roos, Raymund A C (2010): Huntington's disease: a clinical review. In: *Orphanet journal of rare diseases* 5, S. 40. DOI: 10.1186/1750-1172-5-40.
- Rosas, H. D.; Koroshetz, W. J.; Chen, Y. I.; Skeuse, C.; Vangel, M.; Cudkowicz, M. E. et al. (2003): Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD. An MRI-based morphometric analysis. In: *Neurology* 60 (10), S. 1615–1620. DOI: 10.1212/01.WNL.0000065888.88988.6E.
- Rub, U.; Hoche, F.; Brunt, E. R.; Heinsen, H.; Seidel, K.; Del Turco, D. et al. (2013): Degeneration of the cerebellum in Huntington's disease (HD): possible relevance for the clinical picture and potential gateway to pathological mechanisms of the disease process. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 23 (2), S. 165–177. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2012.00629.x.
- Sahlender, D. A.; Roberts, R. C.; Arden, S. D.; Spudich, G.; Taylor, M. J.; Luzio, J. P. et al. (2005): Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. In: *J Cell Biol* 169 (2), S. 285–295. DOI: 10.1083/jcb.200501162.
- Sapp, E.; Kegel, K. B.; Aronin, N.; Hashikawa, T.; Uchiyama, Y.; Tohyama, K. et al. (2001): Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60 (2), S. 161–172. DOI: 10.1093/jnen/60.2.161.
- Sapp, E.; Schwarz, C.; Chase, K.; Bhide, P. G.; Young, A. B.; Penney, J. et al. (1997): Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. In: *Annals of Neurology* 42 (4), S. 604–612. DOI: 10.1002/ana.410420411.
- Sarkar, S.; Ravikumar, B.; Floto, R. A.; Rubinsztein, D. C. (2009): Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. In: *Cell death and differentiation* 16 (1), S. 46–56. DOI: 10.1038/cdd.2008.110.
- Sathasivam, K.; Neueder, A.; Gipson, T. A.; Landles, C.; Benjamin, A. C.; Bondulich, M. K. et al. (2013): Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington

disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (6), S. 2366–2370. DOI: 10.1073/pnas.1221891110.

Saudou, F.; Finkbeiner, S.; Devys, D.; Greenberg, M. E. (1998): Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. In: *Cell* 95 (1), S. 55–66. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81782-1.

Schaffar, G.; Breuer, P.; Boteva, R.; Behrends, C.; Tzvetkov, N.; Strippel, N. et al. (2004): Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. In: *Molecular cell* 15 (1), S. 95–105. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.06.029.

Scherzinger, E.; Lurz, R.; Turmaine, M.; Mangiarini, L.; Hollenbach, B.; Hasenbank, R. et al. (1997): Huntingtin-Encoded Polyglutamine Expansions Form Amyloid-like Protein Aggregates In Vitro and In Vivo. In: *Cell* 90 (3), S. 549–558. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80514-0.

Schilling, G.; Becher, M. W.; Sharp, A. H.; Jinnah, H. A.; Duan, K.; Kotzuc, J. A. et al. (1999): Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. In: *Human molecular genetics* 8 (3), S. 397–407. DOI: 10.1093/hmg/8.3.397.

Schilling, G.; Sharp, A. H.; Loev, S. J.; Wagster, M. V.; Li, S. H.; Stine, O. C.; Ross, C. A. (1995): Expression of the Huntington's disease (IT15) protein product in HD patients. In: *Human molecular genetics* 4 (8), S. 1365–1371. DOI: 10.1093/hmg/4.8.1365.

Seto-Ohshima, A.; Lawson, E.; Emson, P. C.; Mountjoy, C. Q.; Carrasco, L. H. (1988): LOSS OF MATRIX CALCIUM-BINDING PROTEIN-CONTAINING NEURONS IN HUNTINGTON'S DISEASE. In: *The Lancet* 331 (8597), S. 1252–1255. DOI: 10.1016/S0140-6736(88)92073-9.

Sharp, A. H.; Loev, S. J.; Schilling, G.; Li, S.-H.; Li, X.-J.; Bao, J. et al. (1995): Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. In: *Neuron* 14 (5), S. 1065–1074. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90345-3.

Shelbourne, P. F.; Killeen, N.; Hevner, R. F.; Johnston, H. M.; Tecott, L.; Lewandoski, M. et al. (1999): A Huntington's Disease CAG Expansion at the Murine Hdh Locus Is Unstable and Associated with Behavioural Abnormalities in Mice. In: *Human molecular genetics* 8 (5), S. 763–774. DOI: 10.1093/hmg/8.5.763.

Shimohata, T.; Nakajima, T.; Yamada, M.; Uchida, C.; Onodera, O.; Naruse, S. et al. (2000): Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. In: *Nature genetics* 26 (1), S. 29–36. DOI: 10.1038/79139.

Sieradzan, K. A.; Mehan, A. O.; Jones, L.; Wanker, E. E.; Nukina, N.; Mann, D. M. (1999): Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. In: *Experimental neurology* 156 (1), S. 92–99. DOI: 10.1006/exnr.1998.7005.

Slow, E. J. (2003): Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. In: *Human molecular genetics* 12 (13), S. 1555–1567. DOI: 10.1093/hmg/ddg169.

Slow, E. J.; Graham, R. K.; Osmand, A. P.; Devon, R. S.; Lu, G.; Deng, Y. et al. (2005): Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (32), S. 11402–11407. DOI: 10.1073/pnas.0503634102.

Slow, E. J.; van Raamsdonk, J.; Rogers, D.; Coleman, S. H.; Graham, R. K.; Deng, Y. et al. (2003): Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. In: *Human molecular genetics* 12 (13), S. 1555–1567. DOI: 10.1093/hmg/ddg169.

Sørensen, S. A.; Fenger, K. (1992): Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives. In: *Journal of medical genetics* 29 (12), S. 911–914.

Squitieri, F.; Gellera, C.; Cannella, M.; Mariotti, C.; Cislighi, G.; Rubinsztein, D. C. et al. (2003): Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. In: *Brain : a journal of neurology* 126 (Pt 4), S. 946–955. DOI: 10.1093/brain/awg077.

Stefani, M. (2012): Structural features and cytotoxicity of amyloid oligomers: implications in Alzheimer's disease and other diseases with amyloid deposits. In: *Progress in neurobiology* 99 (3), S. 226–245. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2012.03.002.

Steffan, J. S.; Kazantsev, A.; Spasic-Boskovic, O.; Greenwald, M.; Zhu, Y. Z.; Gohler, H. et al. (2000): The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12), S. 6763–6768. DOI: 10.1073/pnas.100110097.

Strong, T. V.; Tagle, D. A.; Valdes, J. M.; Elmer, L. W.; Boehm, K.; Swaroop, M. et al. (1993): Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. In: *Nature genetics* 5 (3), S. 259–265. DOI: 10.1038/ng1193-259.

Sugars, K. L.; Brown, R.; Cook, L. J.; Swartz, J.; Rubinsztein, D. C. (2004): Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (6), S. 4988–4999. DOI: 10.1074/jbc.M310226200.

Suhr, S. T.; Senut, M. C.; Whitelegge, J. P.; Faull, K. F.; Cuizon, D. B.; Gage, F. H. (2001): Identities of sequestered proteins in aggregates from cells with induced polyglutamine expression. In: *The Journal of cell biology* 153 (2), S. 283–294. DOI: 10.1083/jcb.153.2.283.

Sun, Y.; Savanenin, A.; Reddy, P. H.; Liu, Y. F. (2001): Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (27), S. 24713–24718. DOI: 10.1074/jbc.M103501200.

Tai, Y. F.; Pavese, N.; Gerhard, A.; Tabrizi, S. J.; Barker, R. A.; Brooks, D. J.; Piccini, P. (2007): Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. In: *Brain : a journal of neurology* 130 (Pt 7), S. 1759–1766. DOI: 10.1093/brain/awm044.

Takahashi, T.; Kikuchi, S.; Katada, S.; Nagai, Y.; Nishizawa, M.; Onodera, O. (2008): Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. In: *Human molecular genetics* 17 (3), S. 345–356. DOI: 10.1093/hmg/ddm311.

Telenius, H.; Kremer, B.; Goldberg, Y. P.; Theilmann, J.; Andrew, S. E.; Zeisler, J. et al. (1994): Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. In: *Nature genetics* 6 (4), S. 409–414. DOI: 10.1038/ng0494-409.

Thakur, A. K.; Jayaraman, M.; Mishra, R.; Thakur, M.; Chellgren, V. M.; Byeon, I.-J. L. et al. (2009): Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. In: *Nature structural & molecular biology* 16 (4), S. 380–389. DOI: 10.1038/nsmb.1570.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993): A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. In: *Cell* 72 (6), S. 971–983. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90585-E.

Tippett, L. J.; Waldvogel, H. J.; Thomas, S. J.; Hogg, V. M.; van Roon-Mom, W.; Synek, B. J. et al. (2007): Striosomes and mood dysfunction in Huntington's disease. In: *Brain : a journal of neurology* 130 (Pt 1), S. 206–221. DOI: 10.1093/brain/awl243.

Trepel, M. (2015): Neuroanatomie. Struktur und Funktion. 6. Aufl. München: Elsevier, Urban et Fischer.

- Trottier, Y.; Devys, D.; Imbert, G.; Saudou, F.; An, I.; Lutz, Y. et al. (1995): Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. In: *Nature genetics* 10 (1), S. 104–110. DOI: 10.1038/ng0595-104.
- TURNER, M. A. (2002): Subcortical dementia. In: *The British Journal of Psychiatry* 180 (2), S. 148–151. DOI: 10.1192/bjp.180.2.148.
- van Raamsdonk, J. M.; Gibson, W. T.; Pearson, J.; Murphy, Z.; Lu, G.; Leavitt, B. R.; Hayden, M. R. (2006): Body weight is modulated by levels of full-length huntingtin. In: *Human molecular genetics* 15 (9), S. 1513–1523. DOI: 10.1093/hmg/ddl072.
- van Raamsdonk, J. M.; Pearson, J.; Rogers, D. A.; Bissada, N.; Vogl, A. W.; Hayden, M. R.; Leavitt, B. R. (2005): Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease. In: *Human molecular genetics* 14 (10), S. 1379–1392. DOI: 10.1093/hmg/ddi147.
- van Roon-Mom, W. M.; Hogg, V. M.; Tippett, L. J.; Faull, R. L. (2006): Aggregate distribution in frontal and motor cortex in Huntington's disease brain. In: *Neuroreport* 17 (6), S. 667–670. DOI: 10.1097/00001756-200604240-00022.
- Velier, J.; Kim, M.; Schwarz, C.; Kim, T. W.; Sapp, E.; Chase, K. et al. (1998): Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. In: *Experimental neurology* 152 (1), S. 34–40. DOI: 10.1006/exnr.1998.6832.
- Vonsattel, J. P. (2008): Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. In: *Acta neuropathologica* 115 (1), S. 55–69. DOI: 10.1007/s00401-007-0306-6.
- Vonsattel, J. P.; DiFiglia, M. (1998): Huntington disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 57 (5), S. 369–384. DOI: 10.1097/00005072-199805000-00001.
- Vonsattel, J. P.; Myers, R. H.; Stevens, T. J.; Ferrante, R. J.; Bird, E. D.; Richardson, E. P. (1985): Neuropathological classification of Huntington's disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 44 (6), S. 559–577. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2932539>.
- Wacker, J. L.; Zareie, M. H.; Fong, H.; Sarikaya, M.; Muchowski, P. J. (2004): Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. In: *Nature structural & molecular biology* 11 (12), S. 1215–1222. DOI: 10.1038/nsmb860.

Waelter, S. (2001): The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis. In: *Human molecular genetics* 10 (17), S. 1807–1817. DOI: 10.1093/hmg/10.17.1807.

Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. (1993): Compartmentalization of parvalbumin immunoreactivity in the human striatum. In: *Brain research* 610 (2), S. 311–316. DOI: 10.1016/0006-8993(93)91415-O.

Wanker, E. E.; Scherzinger, E.; Heiser, V.; Sittler, A.; Eickhoff, H.; Lehrach, H. (op. 1999): [24] Membrane filter assay for detection of amyloid-like polyglutamine-containing protein aggregates. In: Ronald Wetzel (Hg.): *Amyloid, prions, and other protein aggregates*, Bd. 309. San Diego, CA: Academic Press (Methods in Enzymology, vol. 309), S. 375–386. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)09026-6.

Wegrzynowicz, M.; Bichell, T. J.; Soares, B. D.; Loth, M. K.; McGlothan, J. S.; Mori, S. et al. (2015): Novel BAC Mouse Model of Huntington's Disease with 225 CAG Repeats Exhibits an Early Widespread and Stable Degenerative Phenotype. In: *Journal of Huntington's disease* 4 (1), S. 17–36. DOI: 10.3233/JHD-140116.

Wellington, C. L.; Singaraja, R.; Ellerby, L.; Savill, J.; Roy, S.; Leavitt, B. et al. (2000): Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (26), S. 19831–19838. DOI: 10.1074/jbc.M001475200.

Wheeler, V. C.; White, J. K.; Gutekunst, C. A.; Vrbanac, V.; Weaver, M.; Li, X. J. et al. (2000): Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. In: *Human molecular genetics* 9 (4), S. 503–513. DOI: 10.1093/hmg/9.4.503.

White, J. K.; Auerbach, W.; Duyao, M. P.; Vonsattel, J. P.; Gusella, J. F.; Joyner, A. L.; MacDonald, M. E. (1997): Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. In: *Nature genetics* 17 (4), S. 404–410. DOI: 10.1038/ng1297-404.

Wong, B. K.; Ehrnhoefer, D. E.; Graham, R. K.; Martin, D. D.; Ladha, S.; Uribe, V. et al. (2015): Partial rescue of some features of Huntington Disease in the genetic absence of caspase-6 in YAC128 mice. In: *Neurobiology of disease* 76, S. 24–36. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.12.030.

Wong, S. L.; Chan, W. M.; Chan, H. Y. (2008): Sodium dodecyl sulfate-insoluble oligomers are involved in polyglutamine degeneration. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (9), S. 3348–3357. DOI: 10.1096/fj.07-103887.

Wong, Y. C.; Holzbaur, Erika L F (2014): The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (4), S. 1293–1305. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1870-13.2014.

Yang, D.; Wang, C.-E.; Zhao, B.; Li, W.; Ouyang, Z.; Liu, Z. et al. (2010): Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. In: *Human molecular genetics* 19 (20), S. 3983–3994. DOI: 10.1093/hmg/ddq313.

Yang, S.-H.; Cheng, P.-H.; Banta, H.; Piotrowska-Nitsche, K.; Yang, J.-J.; Cheng, E. C. et al. (2008): Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. In: *Nature* 453 (7197), S. 921–924. DOI: 10.1038/nature06975.

Yang, W.; Dunlap, J. R.; Andrews, R. B.; Wetzel, R. (2002): Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. In: *Human molecular genetics* 11 (23), S. 2905–2917. DOI: 10.1093/hmg/11.23.2905.

Yu, Z.-X.; Li, S.-H.; Nguyen, H.-P.; Li, X.-J. (2002): Huntingtin inclusions do not deplete polyglutamine-containing transcription factors in HD mice. In: *Human molecular genetics* 11 (8), S. 905–914. DOI: 10.1093/hmg/11.8.905.

Yu-Taeger, L.; Petrasch-Parwez, E.; Osmand, A. P.; Redensek, A.; Metzger, S.; Clemens, L. E. et al. (2012): A novel BACHD transgenic rat exhibits characteristic neuropathological features of Huntington disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (44), S. 15426–15438. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1148-12.2012.

Yu-Täger, L. (2013): Generierung und Charakterisierung eines Rattenmodells, das menschliches mutiertes Huntingtin Protein der vollen Länge überexprimiert. Dissertation. Universität Tübingen. Online verfügbar unter <https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/handle/10900/46081>.

Yu-Täger, L. (2016): Analysis of mHTT aggregation in TG22 BACHD rats; E-mail an Holzmann, C.; 18.04.2016

Zakzanis, K. K. (1998): The subcortical dementia of Huntington's disease. In: *Journal of clinical and experimental neuropsychology* 20 (4), S. 565–578. DOI: 10.1076/jcen.20.4.565.1468.

Zeef, D. H.; van Goethem, Nick P; Vlamings, R.; Schaper, F.; Jahanshahi, A.; Heschem, S. et al. (2012): Memory deficits in the transgenic rat model of Huntington's disease. In: *Behavioural brain research* 227 (1), S. 194–198. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.11.009.

Zeitlin, S.; Liu, J. P.; Chapman, D. L.; Papaioannou, V. E.; Efstratiadis, A. (1995): Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. In: *Nature genetics* 11 (2), S. 155–163. DOI: 10.1038/ng1095-155.

Zuccato, C.; Tartari, M.; Crotti, A.; Goffredo, D.; Valenza, M.; Conti, L. et al. (2003): Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. In: *Nature genetics* 35 (1), S. 76–83. DOI: 10.1038/ng1219.