



Aus dem Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kipp

Das vomeronasale Organ in einem Rattenmodell für Morbus Huntington

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Lina-Marielle Krysewski
aus Göttingen

Rostock, 2021

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger, MBA

1. **Gutachter:** Prof. Dr. med. Dr. h.c. Martin Witt, Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock
2. **Gutachter:** Prof. Dr. med. Tino Just, Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, KMG Klinikum Güstrow GmbH
3. **Gutachter:** Prof. Dr. habil. Gustav F. Jirikowski, Health and Medical University HMU Potsdam, Abt. Anatomie

Jahr der Einreichung: 2021

Jahr der Verteidigung: 2022

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Das vomeronasale Organ (VNO) der Ratte	1
1.1.1 Geschichtlicher Überblick zum VNO.....	1
1.1.2 Aufbau des VNO.....	3
1.1.3 Neurogenese im VNE	6
1.1.4 Funktion des VNO	7
1.2 Das VNO beim Menschen	9
1.3 Morbus Huntington.....	10
1.3.1 Definition, Geschichte und Epidemiologie.....	10
1.3.2 Ätiologie und Pathogenese	10
1.3.3 Diagnose und Klinik	13
1.3.4 Therapie	16
1.4 Riecheinschränkungen bei Morbus Huntington und anderen neurodegenerativen Krankheiten.....	16
1.5 Fragestellungen der Dissertation	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere	19
2.2 Tierhaltung.....	21
2.3 Bestimmung des Körpergewichts	21
2.4 Präparation und Gewebeaufbereitung.....	21
2.5 Präparateauswahl	22
2.6 Histologische und immunhistochemische Verfahren	23
2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	23
2.6.2 Immunhistochemische Verfahren	23
2.6.2.1 Olfactory marker protein (OMP)	26
2.6.2.2 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU).....	27
2.6.2.3 Caspase-3 und aktivierte (akt.) Caspase-3	27
2.6.2.4 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)	28
2.6.2.5 Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1).....	28
2.7 Stereologische Auswertung	29

3	Ergebnisse	35
3.1	Körpergewicht	35
3.2	Histologische und immunhistochemische Verfahren	37
3.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	37
3.2.2	Immunhistochemische Reaktionen	38
3.2.2.1	Olfactory marker protein (OMP)	38
3.2.2.2	5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU).....	41
3.2.2.3	Aktivierte Caspase-3 (akt. Caspase-3)	44
3.2.2.4	Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)	46
3.2.2.5	Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1).....	47
4	Diskussion	51
4.1	Tiermodell.....	51
4.2	Körpergewicht	53
4.3	Immunhistochemische Reaktionen im VNO	54
4.3.1	Olfactory marker protein (OMP)	54
4.3.2	5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU).....	56
4.3.3	Aktivierte Caspase-3 (akt. Caspase-3).....	57
4.3.4	Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)	59
4.3.5	Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1)	60
4.4	Methodenkritik	62
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	63
4.6	Zusammenfassung	64
5	Literaturverzeichnis	67
6	Abbildungsverzeichnis	85
7	Tabellenverzeichnis	87
8	Thesen	89
9	Anhang	91
9.1	Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	91
9.2	Protokolle für die Immunhistochemie	91
9.2.1	Protokoll für OMP-, akt. Caspase-3-, PGP 9.5-, Iba1-Nachweis	91
9.2.2	Protokoll für BrdU-Nachweis	93

9.3	Chemikalien und Antikörper	94
9.4	Lösungen.....	96
9.5	Gebrauchsmaterialien und Geräte.....	97
9.6	Software	98
9.7	Stereo Investigator – Optical Fractionator Workflow	98
9.8	Statistische Auswertung: Mittelwerte, Standardabweichung des Mittelwertes (SEM), p-Werte	99
10	Selbstständigkeitserklärung	101
11	Danksagung	103
12	Lebenslauf.....	105

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
A	
akt. Caspase-3	aktivierte Caspase-3
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
AK	Antikörper
AOB	Akzessorischer Bulbus olfactorius
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
B	
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BACHD	Bacterial Artificial Chromosome Huntington Disease
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (Wachstumsfaktor)
BrdU	Bromodesoxyuridin (5-Brom-2'-desoxyuridin)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	
°C	Grad Celsius
CAA	Cytosin-Adenin-Adenin
CAG	Cytosin-Adenin-Guanin
CE	Coefficient of error
cm	Zentimeter
D	
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-Hand-Familie	Spezifisches Aminosäuremotiv in Proteinen
G	
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
Gαi2	Guanine nucleotide-binding protein (G-Protein), alpha Inhibiting Activity Polypeptide-2
Gαo	Guanine Nucleotide-binding protein (G-Protein) mit Untereinheit alpha o
H	
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEAT	Proteindomäne (Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR)
HD ^{+/-}	Huntington Disease: transgene Tiere
HD ^{-/-}	Huntington Disease: Wildtyp
HTT	Huntingtin

I

Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IGF-Spiegel	Insulin-like growth factor
IT15	Interesting transcript 15

K

Kb	Kilobase
kDA	Kilodalton

L

l	Liter
LHRH	Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon
loxP	Locus of crossing over P1 (Erkennungssequenz)

M

M	Mittelwert
MAK	Monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MHC-Klasse III-Protein	Major histocompatibility complex
mHTT	Mutiertes Huntingtin
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
Mo	Monate
MOB	Main olfactory bulb
MOE	Main olfactory epithelium
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSN	Medium spiny neurons

N

NFL	Neurofilament light protein
NPC1	Morbus Niemann-Pick Typ C1
NSE	Nicht-sensorisches Epithel

O

OB	Bulbus olfactorius
OE	Olfaktorisches Sinnesepithel
OMP	Olfactory marker protein
OT	Objektträger

P

P3	Postnataler Tag 3
P4	Postnataler Tag 4
PAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PGP 9.5	Protein gene product 9.5

R

RAN	Repeat associated non-ATG protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest

S

SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
-----	------------------------------------

T

TPR2	Transient potential receptor channel 2
TG5, 9, 22	Transgene Linie 5, 9, 22

V

V1R, V2R, V3R	Vomeronasaler Rezeptor 1, 2 und 3
VEGF/VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor/-Rezeptor
VND	Ductus vomeronasalis
VNE	Vomeronasales Epithel
VNO	Vomeronasales Organ
VRN	Vomeronasale Rezeptorneurone

Y

YAC	Yeast Artificial Chromosome
-----	-----------------------------

Z

ZNS	Zentrales Nervensystem
-----	------------------------

1 Einleitung

Im Volksmund gilt der Geruchssinn von Menschen im Gegensatz zu dem von Tieren als nicht besonders ausgeprägt. McGann (2017) beschrieb diesen Mythos und revidierte ihn: Seinen Erkenntnissen zu Folge ist der Mensch für manche Gerüche sogar empfindlicher als Nager oder Hunde. So rückt die Rolle der olfaktorischen Kommunikation vermehrt in den Gegenstand aktueller Forschung. Das olfaktorische System ist auch als Indikator für neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer bekannt.

Neurodegenerative Erkrankungen besitzen einen hohen Stellenwert an der demographischen Entwicklung. Die jahrelange Betreuung der Patienten besitzt große sozioökonomische, kulturelle und pflegerische Auswirkungen. Morbus Huntington gehört als unheilbare Erbkrankheit zu dieser Gruppierung von Krankheiten.

Ziel dieser Forschungsarbeit ist der Erkenntnisgewinn über die Auswirkungen von Morbus Huntington auf das vomeronasale Organ (VNO) – als ein Teil des Riechsystems – in einem transgenen Rattenmodell. In diesem Zusammenhang wurde die Zelldynamik im VNO bei transgenen Ratten im Vergleich zu einer gesunden Population und in verschiedenen Altersgruppen erforscht.

1.1 Das vomeronasale Organ (VNO) der Ratte

1.1.1 Geschichtlicher Überblick zum VNO

Schon 1703 wurde das vomeronasale Organ, ein chemosensorisches Organ, bei einer Obduktion an einem zwei Jahre alten Kind von dem holländischen Botaniker und Anatomen Frederik Ruysch entdeckt. Er beschrieb es als eine longitudinale Einsenkung am vorderen unteren Septum nasi und vermutete einen Gang, der u. a. zur Schleimsekretion dient (s. Abbildung 1, S. 2) (Ruysch 1703). Wissenschaftler vermuteten, dass es sich bei dieser Beschreibung um das VNO gehandelt hat (Bhatnagar und Reid 1996; Bhatnagar und Smith 2003).

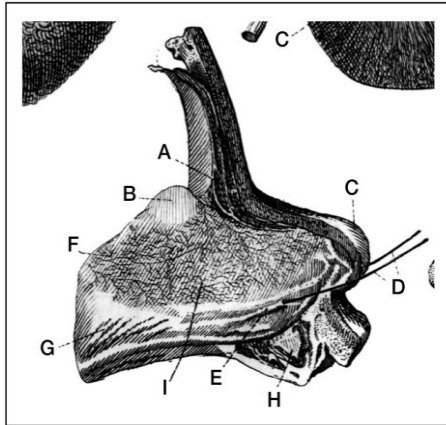


Abbildung 1: Die erste Beschreibung des humanen Ducutus vomeronasalis (VND) von F. Ruysch (1703). Laterale Sicht auf das Septum nasi. Teil des Os frontale (A), Crista galli in einem jungen Alter (B), Septum nasi (C), Sonden durch VND (D), VND (E), Blutgefäße, die sich am Septum befinden (F), Sulci obliqui (G), einer der Schneidezähne (H), Perichondrium, welches das knorpelige Septum nasi umgibt (I) (Ruysch 1703).

Auch wenn die Lokalisation in seiner Darstellung zu nah am Os palatinum war, wird Ruysch heute als Entdecker des VNO am Menschen angesehen (Trotier und Døving 1998; Bhatnagar und Smith 2003). Die vage Beschreibung von Ruysch und die fehlende detaillierte Darstellung ermutigte weitere Forscher wie von Sömmering (1809), Jacobson (1811, 1813), Gratiolet (1845), Dursy (1869) und von Kölliker (1877), dieses Organ näher zu untersuchen. 1811 wurden zum ersten Mal die Monographien zum VNO in Säugetieren des dänischen Chirurgen Ludwig Levin Jacobson von Francois George Curvier veröffentlicht. Curvier veröffentlichte wahrscheinlich Jacobson's Memoiren. Jacobson verneinte das Vorhandensein des VNO beim Menschen und beschränkte sich nur auf die Säugetiere (Jacobson 1811; Bhatnagar und Reid 1996). Wahrscheinlich erwähnte Rathke (1838) zum ersten Mal den Begriff Jacobson's Organ. Der Terminus vomeronasales Organ entwickelte sich erst später (Trotier und Døving 1998; Bhatnagar und Smith 2003).

Rudolf Albert von Kölliker erstellte 1877 die erste detaillierte histologische Beschreibung des VNO beim menschlichen Fetus und Erwachsenen. Er verglich außerdem das menschliche VNO mit dem von Säugetieren. Seine Darstellung illustrierte Ähnlichkeiten zwischen Mensch und Tier. Von Kölliker beschrieb das humane VNO als Schleimdrüse und somit als ein nicht atrophiertes Organ. Er schlug den Begriff „Jacobson's Organ“ vor (von Kölliker 1877).

1.1.2 Aufbau des VNO

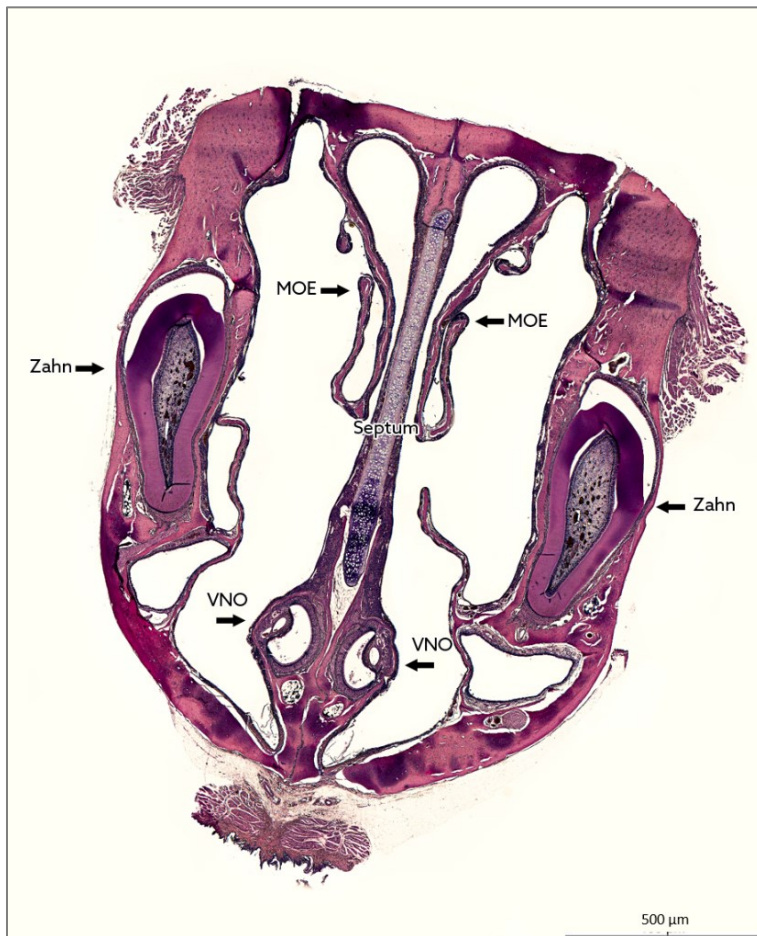


Abbildung 2: Frontaler Schnitt durch die Nase der Ratte. Das vomeronasale Organ (VNO), das Riechepithel (main olfactory epithelium, MOE) und die Zähne sind mit Pfeilen markiert. Maßstab: 500 µm.

Das vomeronasale Organ ist bei den meisten Wirbeltieren und Amphibien im vorderen Bereich der Nasenhöhle, am Septum nasi mit einem blind endenden Gang, zu finden (s. Abbildung 2, S. 3). Tiere ohne Anlage eines VNO sind beispielsweise Vögel und Krokodile. Der histologische Zellaufbau variiert zwischen Tierarten (Halpern und Martínez-Marcos 2003), Geschlechtern (Segovia und Guillamón 1993) und Altersgruppen (Wilson und Raisman 1980). Es besteht aus einem größeren sensorischen bzw. vomeronasalen Epithel (VNE) an der medialen Seite und einem nicht-sensorischen Epithel (NSE) an der lateralen Seite. Neuere Studien haben postuliert, dass im NSE möglicherweise doch sensorische Zellen aktiv sind (Rodewald et al. 2016). Der Bereich um das VNO wird aufgrund der Drüsen und Gefäße auch als „Mushroom Body“ bezeichnet (s. Abbildung 3, S. 4).



Abbildung 3: Aufbau des vomeronasalen Organs. 1: Sensorisches Epithel, 2: Nicht-sensorisches Epithel, 3: Ductus vomeronasalis, 4: Eminentia fungiformis mit Drüsen, Nerven und Gefäßen, 5: Knorpeliger Anteil des Septum nasi, 6: Gaumen. Maßstab: 50µm

Die zahlreichen Drüsen enden, wie Jacobson (1813) schon beschrieb, im Lumen des VNO (Halpern 1987; Døving und Trotier 1998). Wegen dieser Bestandteile wurde das VNO von Cooper und Bhatnagar (1976) als vomeronasaler Komplex bezeichnet. Das sensorische Epithel ist ein mehrreihiges, säulenartiges Epithel. Es enthält drei Zelltypen: Rezeptorzellen, Stützzellen und Basalzellen (Mendoza 1993) (s. Abbildung 4, S. 4).

Die sensorischen Neurone des VNO sind, wie auch beim Riechepithel („main olfactory epithelium“, MOE), bipolar. Ihre Dendriten reichen bis zur Oberfläche des Epithels, sind aber mit Mikrovilli besetzt. Die Neuronen senden ihre Axone zu den Mitralzellen im akzessorischen Bulbus olfactorius, welcher in die Amygdala projiziert. Von dort aus werden Signale in den Hypothalamus gesendet (Dulac und Axel 1995; Trotier und Døving 1998).

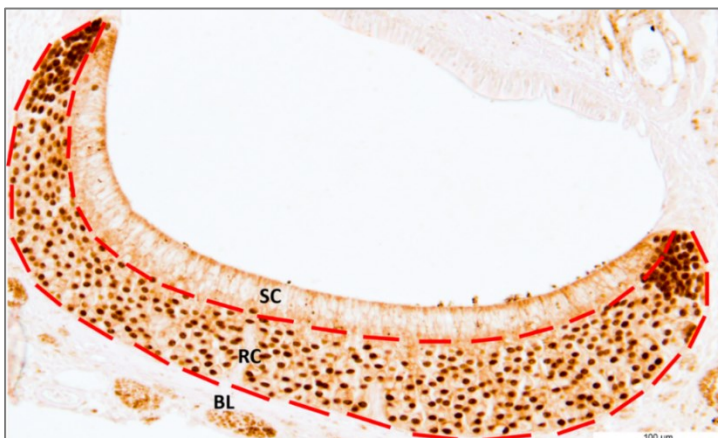


Abbildung 4: Schichtaufbau des vomeronasalen Epithels (VNE). Das VNE besteht aus einer Basallamina (BL), einer Rezeptorzellschicht (RC) und einer Stützzellschicht (SC). Immunhistochemie mit PGP 9.5. Maßstab: 100 µm.

Die vorherrschenden chemosensorischen Rezeptoren des VNO von Wirbeltieren können in zwei Klassen eingeteilt werden: V1R und V2R. Dies sind unabhängige Familien von sieben-transmembran G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Rezeptorzellen mit kurzen Dendriten exprimieren V1R und sind G- α 2 gekoppelt. Sie befinden sich im mittleren Kompartiment des sensorischen Epithels. Ihre Projektion reicht in den rostralen Teil des akzessorischen Bulbus olfactorius (AOB) (s. Abbildung 5, S. 6, grüne Zellen). Die zweite Klasse der Rezeptormoleküle, die V2R, werden von sensorischen Neuronen mit langen Dendriten exprimiert. Ihre Zellkörper liegen im basalen Epithel. In ihren Mikrovilli befinden sich G α o-Proteine. Ihre Fortleitung erfolgt in den kaudalen Teil des AOB (s. Abbildung 5, S. 6, rote Zellen). Anschließend erfolgt die Weiterleitung in die oben beschriebenen höheren Gehirnareale (Dulac und Axel 1995; Herada und Dulac 1997; Ryba und Tirindelli 1997; Jia und Halpern 1996). In den Mikrovilli von Zellen beider Rezeptortypen befinden sich transient receptor potential 2 (TRP2)-Ionen Kanäle (Menco et al. 2001). Pantages und Dulac (2000) postulierten die Existenz einer weiteren Rezeptorklasse V3R. Diese Rezeptorklasse wurde in späteren Studien eher als Subklasse der V1R-Rezeptoren interpretiert, sodass weiterhin im Wesentlichen nur von zwei Rezeptorfamilien ausgegangen wird (Del Punta et al. 2000; Rodriguez und Mombaerts 2002).

Innerviert wird das VNO von parasympathischen Nervenfasern über das Ganglion pterygopalatinum, welches die Gefäße und die exokrinen Drüsen versorgt. Sympathische Fasern aus dem Ganglion cervicale superius innervieren primär die Gefäße (Anggård et al. 1983). Der N. canalis pterygoidei enthält beide Fasertypen und bewirkt bei Stimulation eine Vasodilatation und Schleimsekretion (Anggård und Edwall 1974). Zusätzlich ist auch der N. trigeminus mit sensiblen Anteilen Teil der sensorischen Innervation (Trotier und Døving 1998). Im Zusammenspiel von Stimulus und nervaler Reizung wird Flüssigkeit mittels Pumpmechanismus und Endozytose aktiv in das VNO aufgenommen und aktiv weitergeleitet (Meredith et al. 1980; Khew-Goodall et al. 1991). In diesem Zusammenhang wird oft der Begriff des Flehmens bei Tieren verwendet (Ladewig und Hart 1980).

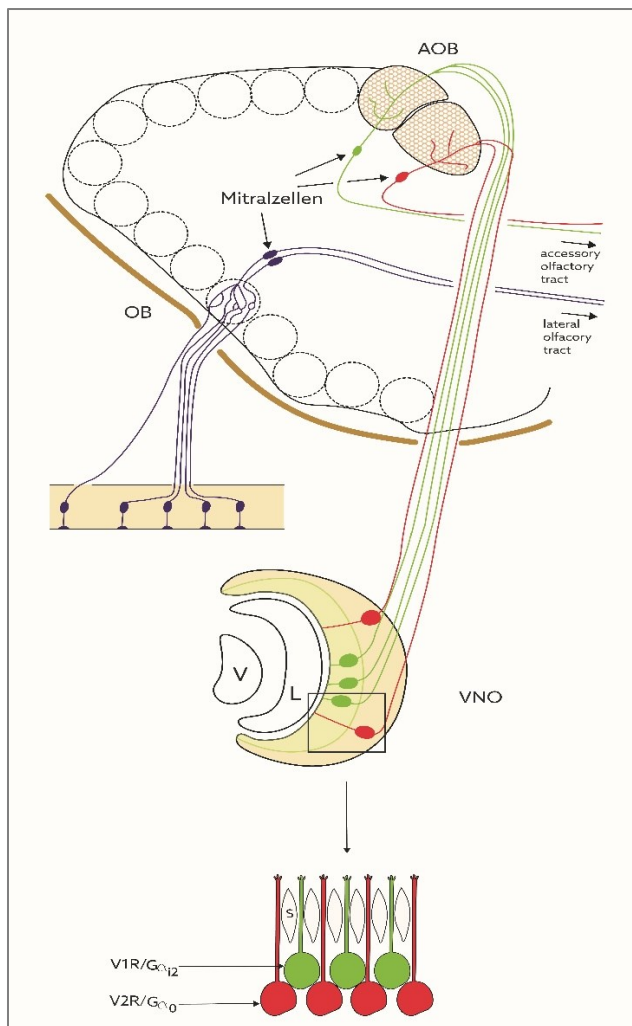


Abbildung 5: Sagittale Darstellung durch den Kopf einer adulten Ratte. Das main olfactory epithelium (MOE-blau) projiziert in den Bulbus olfactorius (OB), wird verschaltet und über den lateralen olfaktorischen Trakt weitergeleitet. Das VNO mit dem Lumen (L) und der anliegenden Vene (V) projiziert in den akzessorischen Bulbus olfactorius (AOB). Dabei sind V1R-Rezeptoren mit kurzen Dendriten im apikalen Epithel und Gai2-gekoppelt (grün) und projizieren in den rostralen AOB. Weiterer Verlauf über den akzessorischen olfaktorischen Trakt. V2R-Rezeptoren mit langen Dendriten im basalen Epithel sind Gao-gekoppelt (rot). Projektion in den kaudalen AOB. Stützzellen (S) (modifiziert nach Herrada und Dulac 1997).

1.1.3 Neurogenese im VNE

Die Reproduktion und Migration unreifer vomeronasaler Rezeptorneurone (VRN) und der Stützzellen stammt aus zwei Quellen (s. Abbildung 6, S. 7). Untersuchungen an Mäusen mittels 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) explorierten eine Zellanhäufung am Übergang vom sensorischen zum nicht-sensorischen Epithel. Die VRN migrierten von dem Randbereich in Richtung des Zentrums und wiesen somit einen horizontalen Reifungsprozess auf (Barber und Raisman 1978a, 1978b). Diese horizontale Wanderung ist deutlich langsamer als die ebenfalls vorhandene vertikale Wanderung und legt nur ca. 10 % der Distanz von der Peripherie bis zum Zentrum zurück. Damit ist eine Beteiligung an dem zentralen Reifungsprozess unwahrscheinlich (Martinez-Marcos et al. 2005). Die Lage der mitotischen Zellen in den Randbereichen verfügt über folgende potentielle Funktionen (Wilson und Raisman 1980; Weiler et al. 1999a; Giacobini et al. 2000; Martinez-Marcos et al. 2005; Brann und Firestein 2010):

- Sie nehmen am zellulären Turnover teil.
- Sie sind für das Größenwachstum des VNO zuständig.

- Sie stellen pluripotente Vorläuferzellen für vomeronasale Rezeptorneurone und Stützzellen dar.
- Sie haben ein mögliches Potential zur Neuroregeneration.
- Sie werden nach kurzer Zeit apoptotisch.

Die Zellen in der Zentralregion migrieren vertikal. Den Basalzellen im Zentrum des sensorischen Epithels wird ebenfalls eine Rolle am Zellumsatz zugeschrieben (Weiler et al. 1999b; Giacobini et al. 2000; Martinez-Marcos et al. 2005). Um die Beschreibung des sensorischen Epithels in der vorliegenden Dissertation genauer zu spezifizieren, wird in dieser Arbeit zwischen einem medialen, zentralen Kompartiment und einem lateralen Kompartiment, welches den Randbereich darstellt, unterschieden (s. Abbildung 6, S. 7).

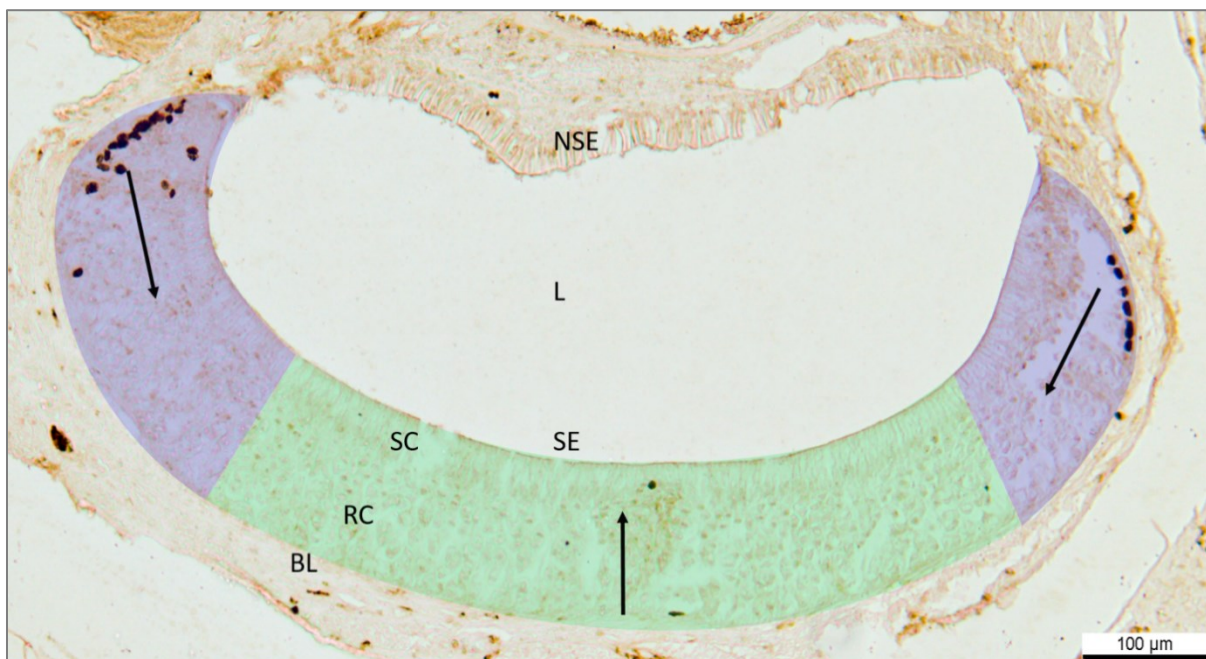


Abbildung 6: Die zelluläre Migration im VNE. Das vomeronasale Epithel wird in zwei Kompartimente eingeteilt. In den Randbereichen befindet sich das laterale Kompartiment (blau) mit horizontaler Migration (Pfeil) der Neurone. Im medialen, zentralen Kompartiment (grün) migrieren die Zellen vertikal (Pfeil). Basallamina (BL). Rezeptorzellschicht (RC). Stützzellschicht (SC). Sensorisches Epithel (SE). Nicht-sensorisches Epithel (NSE). Lumen (L). Maßstab: 100 µm.

1.1.4 Funktion des VNO

Die abschließende Funktion des VNO ist noch nicht genau definiert und Gegenstand aktueller Forschung. Die Funktionsweise bei Tieren ist, im Gegensatz zu der bei Menschen, aufgrund der fehlenden postpartalen Regression besser verstanden (Stoyanov et al. 2018). Wie in 1.1.2, S. 3 erklärt, kann das vomeronasale Organ chemosensorische Reize aufnehmen. In vielen Tier-

studien wurden wichtige Erkenntnisse über den Einfluss des VNO auf den Organismus gewonnen. Die aufgenommenen Signale über das VNO geben Auskunft über das Geschlecht sowie die Geschlechtsreife und haben Auswirkungen auf das Sozial- und Sexualverhalten und den Hormonhaushalt (Wysocki 1979; Dulac und Axel 1995; Trotier und Døving 1998; Trouillet et al. 2021). Tiere nutzen Pheromone für ihre soziale Kommunikation. Diese Stoffe können durch das VNO aufgenommen und verarbeitet werden (Meredith 2001). Pheromone wurden erstmalig von Karlson und Lüscher (1959) als Substanzen definiert, die von Individuen sezerniert werden, um dann von anderen Individuen derselben Spezies empfangen zu werden. Dieser Prozess löst spezifische Reaktionen oder Handlungsweisen aus. Hormonell hat das VNO Einfluss auf die Ausschüttung vom Luteinisierenden-Hormon-Releasing-Hormon (LHRH) und Prolaktin. In Studien wurde bewiesen, dass es bei männlichen Mäusen ohne VNO nicht zur konsekutiven Erhöhung des Luteinisierenden Hormons bei Geruch von weiblichem Urin kommt (Coquelin et al. 1984; Johns et al. 1978). Neben der Erkennung eines Geschlechtspartners und den Auswirkungen auf den Hormonhaushalt und den Paarungsakt, nutzen andere Tiere, beispielsweise Schlangen, das VNO auch zum Erkennen von Nahrung (Døving und Trotier 1998; Dulac und Axel 1995; Halpern 1987). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Neurone für die V1-Rezeptoren selektiv für kleine pheromonale Moleküle sind. Die V2R-Neuronen selektieren wahrscheinlich für Vektorproteine und Peptide. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Nager chemische Reize von Pheromonen nicht nur durch das VNO, sondern auch durch das Riechepithel und ein weiteres kleines chemosensorisches Organ, das Grüneberg Ganglion, detektieren können (Trotier 2011; Pérez-Gómez et al. 2014). Die detaillierte molekulare Funktion der Rezeptoren ist noch nicht bis ins Detail verstanden. Es werden stetig weitere Subklassen der Rezeptorfamilien V1R und V2R beschrieben und zusätzlich neue entdeckt. Es besteht eine hohe Diversität zwischen Tierarten (Nikaido 2019; Zhang und Nikaido 2020). Ein gutes Beispiel hierfür sind Fische. Initial glaubte man, dass das VNO bei Fischen nicht existiert. Mittlerweile ist bekannt, dass einige Spezies wie der Lungenfisch ein solches besitzen (D'Aniello et al. 2017). Das VNO spielt nicht nur beim Sexualverhalten eine Rolle, sondern auch bei der Erkennung und Abwehr von Feinden, im Aggressionsverhalten und bei angeborenen Instinkten (Chamero et al. 2011; Pérez-Gómez et al. 2014; Trouillet et al. 2019). Hier wird deutlich, dass noch weitere Forschung notwendig ist, um genau abbilden zu können, welche Funktionen die verschiedenen Teile des vomeronasalen Organs haben.

1.2 Das VNO beim Menschen

Die Bedeutung und genaue Funktion des menschlichen VNO wird bis heute kontrovers diskutiert (Stoyanov et al. 2018). McGann (2017) dementierte die Existenz eines vomeronasalen Organs im Menschen. Jacobson glaubte vor 200 Jahren ebenso nur an die Existenz des VNO in Tieren (Bhatnagar und Reid 1996). Die Existenz des VNO beim Erwachsenen bleibt strittig. Vomeronasale Strukturen entwickeln sich beim Embryo zwischen der vierten und fünften Woche (Müller und O'Rahilly 2004). Aus dem medialen Epithel gehen Strukturen wie vomeronasale Neurone, der Nervus terminalis und Zellen für die Expression des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) hervor. Die GnRH-Zellen migrieren zum Hypothalamus (Schwanzel-Fukuda 1999; Wray 2010). Zusätzlich lassen sich bipolare Neurone und eine Dreischichtung des Epithels nachweisen. Eine Detektion von VEGF/VEGFR-immunreaktiven Zellen gibt einen weiteren Hinweis auf die Chemorezeptor-Aktivität und neuronale Migration im fetalen VNO (Marini et al. 2019). Circa in der achten Entwicklungswoche bildet sich der VND aus, welcher bei Erwachsenen endoskopisch darstellbar ist (s. Abbildung 7, S. 9).

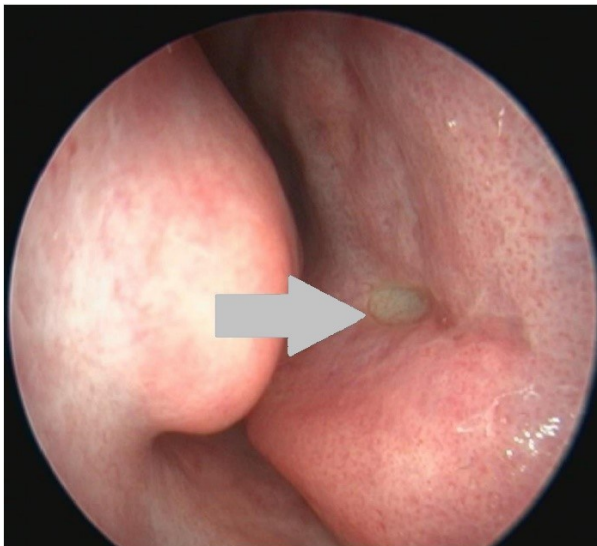


Abbildung 7: Endoskopische Sicht auf das humane vomeronasale Organ. Der Pfeil zeigt auf die Struktur im vorderen Bereich des Septum nasi. Rechte Seite. (modifiziert nach Stoyanov et al. 2018).

Der VND endet blind. Einen AOB, wie man ihn bei Nagern findet, gibt es im Menschen nicht. Die Degeneration der vomeronasalen Strukturen ist vor der 28. Woche festzustellen. Der residuale VND variiert zwischen Individuen und ist nicht bei allen Menschen vorhanden. Die Daten für die Häufigkeit der postnatalen Präsenz bei Erwachsenen divergieren, je nach Technik, zwischen 10 – 93 % (Witt und Hummel 2006; Witt und Woźniak 2006; Witt und Meredith 2014;

Gebhart et al. 2019). Witt und Meredith (2014) gaben, mit Argumenten für und gegen ein funktionierendes humanes VNO, eine gute Übersicht. Der Mensch besitzt die meisten Rezeptoren wie V1R und V2R mit ihren TRP2-Kanälen nicht, jedoch sind fünf V1R-ähnliche Gene zu finden und auch andere chemosensorische Zellen könnten an einer Funktion beteiligt sein. Die chemosensorische Reizverarbeitung und die Pheromondetektion könnten über das MOE oder andere potentielle Chemorezeptoren in der Nase, wie zum Beispiel das Grüneberg Ganglion, erfolgen. Gebhart et al. (2019) proklamierten bei Erwachsenen im Bereich des möglichen VNO zusätzliche OMP-reaktive Epithelzellen. Lange galt die OMP-Negativität im menschlichen VNE als Zeichen der Funktionslosigkeit (Witt et al. 2002). Wessels et al. (2014) berichteten, dass eine Verbindung zwischen vomeronasalen Rezeptorzellen und den umliegenden Kapillaren bestünde. Sie schrieben dem VNO zusätzlich eine potentielle endokrine Aktivität zu, da Calcium-bindende Proteine in diesen Rezeptorzellen nachgewiesen wurden. Dieser Aspekt beschreibt eine weitere Funktion des VNO, welcher über die reine Pheromonverarbeitung hinaus geht (D'Aniello et al. 2017).

1.3 Morbus Huntington

1.3.1 Definition, Geschichte und Epidemiologie

Morbus Huntington ist eine unheilbare, autosomal-dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung. Sie wurde 1872 von dem amerikanischen Arzt George Huntington beschrieben und war bis 1960 als „Huntington’s chorea“ und später als „Huntington’s disease“ (HD) bekannt. Huntington beschrieb eine Erbkrankheit, die mit progressiven psychiatrischen und kognitiven Symptomen einhergeht und sich zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr manifestiert (Wexler et al. 2016). Das Wort „Chorea“ bedeutet im Deutschen „Veitstanz“. Hiermit wird eine distal betonte Bewegungsstörung zum Ausdruck gebracht, welche mit Hyperkinese und allgemeiner Hypotonie der Muskulatur einhergeht (Pschyrembel Online 2021). Die Prävalenz der westlichen Bevölkerung liegt zwischen 5,7 und 13,7 pro 100.000 Einwohner. In Asien ist die Prävalenz mit 0,1 – 0,7 pro 100.000 Einwohner deutlich geringer. Der Grund für die unterschiedliche Prävalenz zwischen ethnischen Gruppen ist die genetisch unterschiedliche Expression des Huntingtin-Gens. Populationen mit einer höheren Prävalenz haben längere CAG- (Cytosin-Adenin-Guanin) repeats (Pringsheim et al. 2012; Bates et al. 2015; McColgan und Tabrizi 2018).

1.3.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Pathologie der Erbkrankheit Morbus Huntington beruht auf der Mutation im Gen für Huntingtin (HTT). Sie wurde 1993 als eine instabile repetitive Sequenz der Basen CAG in der

codierenden Region des Gens IT15 festgestellt. Die Mutation befindet sich auf dem kurzen Arm (p) des Chromosoms 4, auf Position 4p16.3. Dieses Gen auf dem Chromosom 4 kodiert für das Protein Huntingtin. Am N-Terminus des ersten Exons verfügt IT15 über 21 CAG-Triplettabfolgen, die für Glutamin kodieren (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993). Je nach Anzahl der Wiederholungen des Basentriplets CAG manifestiert sich die Krankheit Morbus Huntington. Die gesunde Bevölkerung weist eine Wiederholungsrate von 6 bis 34 CAG-Basentriplets auf. Zwischen 35 und 39 CAG-Wiederholungen ist eine Diagnose unsicher und eine klinische Manifestation findet sich eher in der älteren Bevölkerung wieder. Die Mehrheit der HD-Patienten besitzt zwischen 40 und 55 CAG-Repetitionen. 6 % aller HD-Patienten haben mit einem Erkrankungsbeginn vor dem 20. Lebensjahr und teilweise über 70 CAG-Wiederholungen eine juvenile Form. Die Anzahl von CAG-Repetitionen korreliert invers mit dem Manifestationsalter und dem Zeitpunkt des Todes (Vonsattel und DiFiglia 1998). Eine Verlängerung der Trinukleotidsequenzen bei paternaler Vererbung mit einhergehender Aggravation der Krankheit wird ebenfalls beobachtet. Grund hierfür ist die erhöhte Expressionsvariabilität der CAG-Sequenzen in Spermien (Telenius et al. 1994).

Das ungefaltete, abnormale Huntingtin gilt als Auslöser der Erkrankung und führt auf verschiedenen Wegen zu neuronaler Dysfunktion und zum Zelltod. Der genaue Pathomechanismus ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Die Mutation des Huntingtin resultiert in multiplen Veränderungen auf zellulärer Ebene, die potentiell Ziele für therapeutische Maßnahmen sind (Ross und Tabrizi 2011).

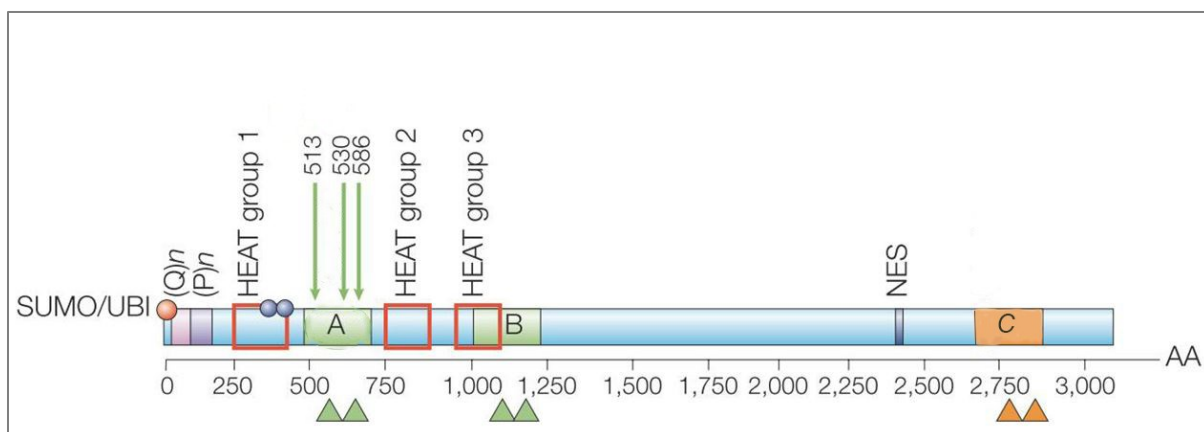


Abbildung 8: Vereinfachte, schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen des Huntingtin. (Q)n bezeichnet den Polyglutamin-Trakt, welchem sich die Polyproline Sequenz (P)n anschließt. Die roten Kästen stehen für die drei Hauptcluster der HEAT-Wiederholungen. Die Pfeile zeigen die Spaltstelle der Caspasen mit der Position der Aminosäure. B identifiziert die Region, die bevorzugt im cerebralen Kortex gespalten wird. C zeigt die Hauptspaltungsstelle im Striatum und A eine Region in beiden Hirnarealen. Die grünen und orangenen unteren Pfeile zeigen auf die Aminosäuresequenz für Proteasespaltung. NES ist das Kernexportsignal. Die roten und blauen Kreise deuten auf posttranslationale Modifikationen hin: Ubiquitinierung (UBI) und/oder Sumoylierung (SUMO)(rot) und Phosphorylierung an Position 421 und 434 (blau) (modifiziert nach Cattaneo et al. 2005).

Huntingtin ist ein großes Protein mit ca. 50 repetitiven Aminosäureeinheiten, welche auch als HEAT bezeichnet werden. Die Funktion dieser Aminosäuren ist noch nicht bekannt, jedoch sind sie ebenfalls in anderen Proteinen zu finden, die am intrazellulären Transport beteiligt sind (Neuwald und Hirano 2000; Li und Li 2004). HTT hat einige Interaktionen am N-Terminus und wird durch einige posttranslationale Modifikationen wie proteolytische Spaltung mittels Caspasen, Phosphorylierungen, Acetylierungen und Additionen von Ubiquitin-ähnlichen Modifikatoren beeinflusst (s. Abbildung 8, S. 11) (Li et al. 2006; Ross und Tabrizi 2011). Die zelluläre Funktion von HTT ist Gegenstand aktueller Forschung. Das meistens zytoplasmatische Protein besitzt möglicherweise am C-Terminus ein Exportsignal, kann in den Zellkern eindringen, ist am vesikulären Transport beteiligt und reguliert die Transkription. Eine der Hauptthesen der Pathogenese ist die toxische Funktion des fehlgefalteten, mutierten HTT. Die RNA an sich und das funktionslose HTT können ebenso eine Erklärung sein (Cattaneo et al. 2005; Shao und Diamond 2007). Durch Studien an Knock-out Mäusen konnte die Rolle von HTT an der embryonalen Entwicklung dargestellt werden. Hier zeigten sich frühe Veränderungen in der Entwicklung. Es wurde geschlussfolgert, dass die medium spiny neurons (MSN), also die GABAergen inhibitorischen Neurone im Striatum, wesentlich vulnerabler auf Stressoren reagieren (Molero et al. 2009). Die Schädigung der Neurone führt nicht nur zum Zelltod im Striatum, sondern zusätzlich zu Dysfunktionen und zum Zelluntergang in anderen Regionen, wie dem Cortex (Reiner et al. 1988). Die striatale Pathologie ist biphasisch. Der initiale Verlust von MSN führt über den indirekten Pfad zum hyperkinetischen Phänotyp, wohingegen der Verlust über den direkten Weg zum hypokinetischen Phänotyp führt (Plotkin und Surmeier 2015; McColgan und Tabrizi 2018). Ein möglicher Grund für die selektive Vulnerabilität der MNS des indirekten Weges sind Dopamin D2-Rezeptoren, die nur dort exprimiert werden (Deyts et al. 2009; McColgan und Tabrizi 2018).

Ross und Tabrizi (2011) postulierten sechs Hauptmerkmale der Pathogenese von Morbus Huntington. Erstens besitzt das mutierte HTT eine abnormale Konformation und bildet zum Teil große Proteinaggregate. Zweitens sind der Abtransport und der Umgang mit diesen Proteinen in HD-Patienten beeinträchtigt. Drittens entstehen durch die Spaltung und Kürzung des HTT toxische Fragmente am N-Terminus. Viertens beeinflussen posttranslationale Modifikationen die Toxizität von HTT. Fünftens führt die nukleäre Translokation mit transkriptionsverbundenen Effekten vom mutierten HTT ebenfalls zur gesteigerten Toxizität. Abschließend sind die zellulären metabolischen Wege, u. a. durch Autophagozytose und indirekte Effekte auf Mitochondrien, bei Patienten mit Morbus Huntington beeinträchtigt (s. Abbildung 9, S. 13).

Weitere Hypothesen der Pathogenese sind der Verlust des brain-derived neurotropic factors (BDNF) oder eine erhöhte Anfälligkeit für Excitotoxizität als Ursache der cortikalo-striatalen Projektionen (Ross und Tabrizi 2011). Neu entdeckt wurden vier weitere polymere Expansionsproteine, die im menschlichen Gehirn akkumulieren und für Apoptose in verschiedenen Hirnregionen verantwortlich sind. Sie werden als repeat associated non-ATG (RAN) Proteine bezeichnet (Bañez-Coronel et al. 2015).

Vonsattel und Difiglia (1998) erkannten bereits makroskopisch, dass Atrophien des Nucleus caudatus und des Putamens vorliegen. Außerdem sind der Globus pallidus und der Nucleus accumbens betroffen. Mit neuen technischen Verfahren des Neuroimaging konnte durch Tabrizi et al. (2011) nachgewiesen werden, dass es neben den bekannten Anteilen des Gehirns zusätzlich eine generalisierte Atrophie des Gehirns gibt. Hier war auch eine Beteiligung der striatalen und kortikalen weißen Substanz in sehr frühen Stadien der Huntington-Krankheit sichtbar.

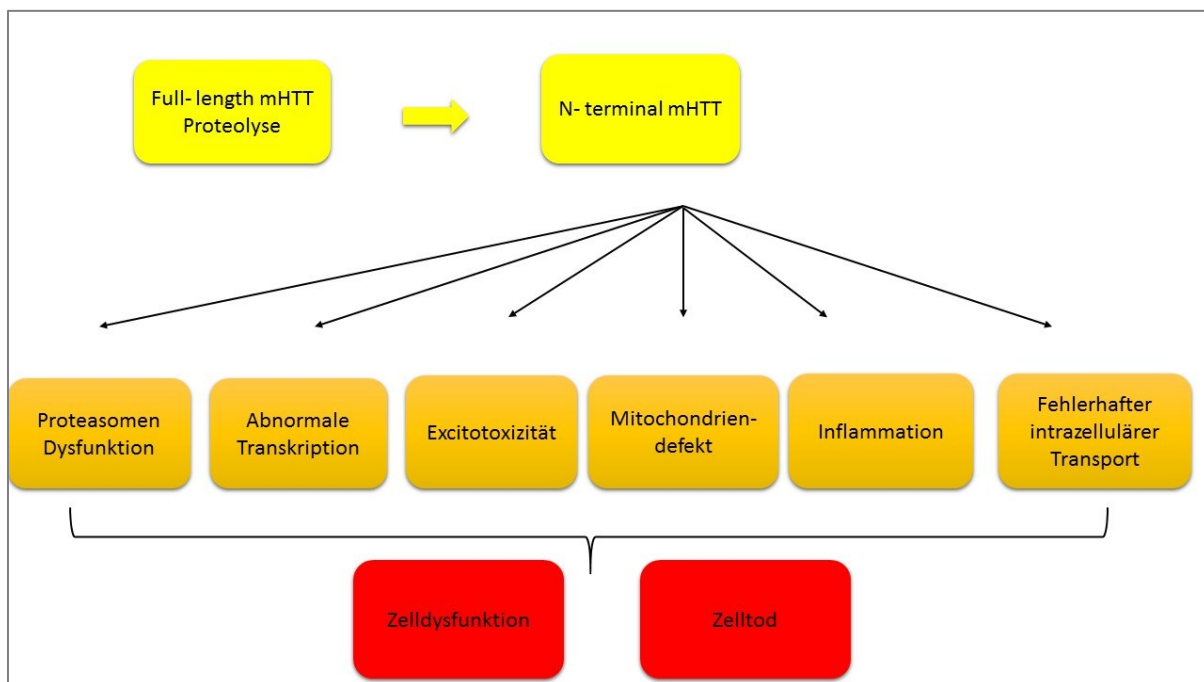


Abbildung 9: Die Auswirkungen von mutiertem Huntingtin (mHTT) auf den Zellmechanismus (modifiziert nach Chang et al. 2015).

1.3.3 Diagnose und Klinik

Die Basis der Diagnostik von Morbus Huntington bilden genetische und funktionelle Tests. Auch im Rahmen der Pränataldiagnostik sind mittlerweile genetische Tests verfügbar (Moutou

et al. 2004). Der Grund für eine Einleitung diagnostischer Verfahren ist eine positive Familienanamnese oder das Auftreten von motorischen Symptomen. Von der Huntington Study Group (1996) wurde ein klinisches Testsystem entwickelt. Die Unified HD Rating Scale (UHDRS) dient zur Beurteilung der vier Domänen der klinischen Symptomatik bei Morbus Huntington. Evaluiert werden die motorischen Funktionen, die kognitiven Funktionen, die Verhaltensauffälligkeiten oder psychischen Symptome und die alltägliche funktionelle Kapazität. In den letzten Jahren sind neben dem Neuroimaging die Biomarker zur Prädiktion in den Vordergrund getreten (Tabrizi et al. 2011; McColgan und Tabrizi 2018). Vielversprechend ist der Nachweis des Neurofilament light proteins (NFL) im Blut, welches mit Gehirnatrophie sowie motorischen und kognitiven Auffälligkeiten korreliert (Byrne et al. 2017). Außerdem ist es möglich, mHTT in Monozyten nachzuweisen, was mit dem Ausmaß der Krankheit und der Atrophie des Nucleus caudatus korreliert (Weiss et al. 2012). mHTT kann ebenfalls im Liquor nachgewiesen werden und ist mit motorischer und kognitiver Funktion verknüpft (Wild et al. 2015).

In der Literatur werden drei Formen von Morbus Huntington unterschieden: Der prämanifeste Typ, der juvenile/early-onset Typ und der adulte/late-onset Typ. Langbehn et al. (2004) beantworteten die Frage nach einem Vorhersagewert für das Erkrankungsalter – je kürzer die CAG-Wiederholungen bei einem Patienten sind, desto später ist das Erkrankungsalter. Mit 40 CAG-Basentriplets besteht mit 65 Jahren eine 100%ige Penetranz. Das mutierte Huntingtin ist aber nicht der alleinige Faktor für eine manifeste Erkrankung. Umweltfaktoren und genetische Faktoren, wie das Erkrankungsalter der Eltern und die mütterliche oder väterliche Vererbung (s. 1.3.2, S. 10), spielen darüber hinaus eine Rolle. Der Einfluss dieser zusätzlichen Faktoren nimmt jedoch mit der Größe der CAG-Replikationen (> 44), aufgrund des starken Einflusses der Polyglutamin-Sequenzen, ab. Hieraus leitet sich eine größere Variabilität des Erkrankungsalters bei geringen CAG-Wiederholungen ab. Viele Studien beschäftigten sich mittlerweile mit dem prämanifesten Typ (Paulsen et al. 2008). 15 bis 20 Jahre vor einem manifesten Morbus Huntington können Einschränkungen in der Motorik wie z. B. reduzierte Fingerbewegungen (Paulsen et al. 2008), kognitive Einschränkungen wie eine verlangsamte Informationsverarbeitung oder die Deutung visueller Wahrnehmungen (Diamond et al. 1992; Kirkwood et al. 1999; Duff et al. 2010), psychische Störungen wie Angststörungen oder Depression (Nehl et al. 2001; Marshall et al. 2007), reduziertes Riechvermögen (Moberg et al. 1987; Paulsen et al. 2008) sowie bildmorphologisch vermindertes striatales Volumen (Aylward et al. 2004; Tabrizi et al. 2009) nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht die Komplexität dieses Krankheitsbildes und nur die Analyse aller Symptombereiche sollte als Grundlage für die Vorhersage einer möglichst

akkuraten individuellen Prognose herangezogen werden (Marshall et al. 2007; Paulsen et al. 2008; Tabrizi et al. 2009; Duff et al. 2010).

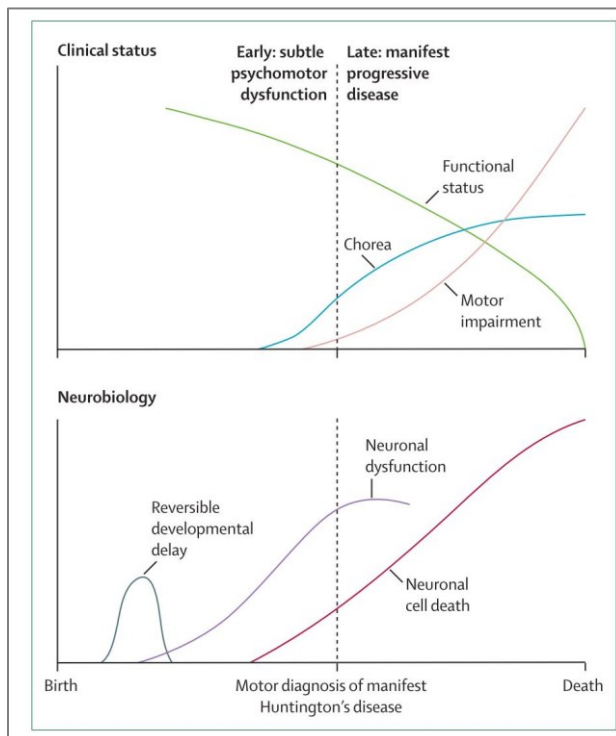


Abbildung 10: Progression von Morbus Huntington. Das mittlere Erkrankungsalter ist 40 Jahre. Leichte Symptome beginnen schon Jahre vor einer manifesten motorischen Auffälligkeit. Die motorischen Symptome korrelieren mit striataler Atrophie und können als Prädiktor gesehen werden. Chorea ist oft das erste motorische Symptom, gefolgt von Bradykinesie, Koordinations- und Gangstörungen (motor impairment). In jungen Jahren gibt es vermutlich noch reversible Phasen und die Prodromalsymptome werden durch neuronale Dysfunktion bestimmt. Im späteren Krankheitsverlauf ist der neuronale Zelltod in vulnerablen Regionen des Gehirns vorherrschend und korreliert mit der Ausprägung der Krankheitssymptome (Ross und Tabrizi 2011).

Zusammenfassend verdeutlicht Abbildung 10, S. 15 den Krankheitsverlauf von Morbus Huntington. Das durchschnittliche Erkrankungsalter ist 40 Jahre und führt innerhalb von 15 bis 20 Jahren zum Tod. Die Chorea ist oft ein prominenter Indikator für die Erkrankung, gefolgt von einer späteren Bradykinesie, Koordinations- und Gangstörungen und Rigidity (= motor impairment) (Rosenblatt et al. 2003). Ursächlich hierfür ist u. a. der Untergang der MSN (s. 1.3.2, S. 10). Außerdem wird eine Phase der neuronalen Dysfunktion vor der Apoptose vermutet. Geistige und kognitive Einschränkungen wie mangelnde Emotionserkennung, geistige Verlangsamung und Wahrnehmungsstörungen gehören zur frühen und späten Phase der Huntington-Krankheit. Darüber hinaus gibt es vielfältige neuropsychiatrische Symptome. Apathie, Angststörung, Reizbarkeit, Depression, Zwangsstörungen und Psychosen gehören dazu. Die Apathie ist hierbei, begründet durch den Mangel an Therapiemöglichkeiten, das verbreitetste Symptom. Im Gegensatz dazu finden bei Depressionen oder Angststörungen Antidepressiva oder Antipsychotika Anwendung (van Duijn et al. 2014; McColgan und Tabrizi 2018). Jahre vor dem Ausbruch der Krankheit wird eine reversible Phase der neuronalen Dysfunktion vermutet – diese reversible Phase gibt Hoffnung auf einen Therapieansatz (Ross und Tabrizi 2011).

1.3.4 Therapie

Für die neurodegenerative Erkrankung Morbus Huntington gibt es keine kurative Therapie. So vielfältig wie die in Abbildung 9, S. 13 beschriebenen Auswirkungen des mHTT, sind auch die Therapieansätze. Die nicht-genetischen Therapieansätze mit Auswirkungen auf die Apoptose, den intra- und interzellulären Transport, die Mitochondrienfunktion, den BDNF-Funktionsverlust, die Excitotoxizität und die Neuroprotektion wurden in Studien getestet und führten zu frustrierten Ergebnissen (Wyant et al. 2017). Das optimale Management von Morbus Huntington besteht aus einem interdisziplinärem Team aus Ärzten, Krankenschwestern, Physiotherapeuten, Logopäden und anderen Professionen (McColgan und Tabrizi 2018). Im Laufe der Jahre ist stets eine Anpassung und Optimierung der Therapie für den Patienten anzustreben. Trotz intensiver Forschung bleibt die medikamentöse Therapie limitiert. Der Haupttherapieansatz beruht auf der symptomatischen Behandlung der führenden Symptome (Wyant et al. 2017). Tetrabenazin und Tiaprid sind beispielsweise die gängigsten Medikamente zur Behandlung von Hyperkinesien (Saft C. et al. 2017). Viele andere Ansätze der krankheitsmodifizierenden Therapie (z. B. Medikamente mit dem Gene-silencing-Ansatz) sind in präklinischer Forschung (Wyant et al. 2017). Das Ziel sollte es sein den Krankheitsbeginn und die Progression zu verlangsamen, um den Patienten ein längeres, lebenswertes Leben zu bieten (Paulsen et al. 2008).

Trotz gegenwärtig noch limitierter Therapiemöglichkeiten ist Chorea Huntington im Vergleich zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen genetisch vorhersehbar. Studien können deswegen eine Möglichkeit zur frühen Intervention bieten. Darüber hinaus kann hier ein Vorteil für prävalentere Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson gewonnen werden (Ross und Tabrizi 2011).

1.4 Riecheinschränkungen bei Morbus Huntington und anderen neurodegenerativen Krankheiten

Die olfaktorische Funktion des Menschen nimmt mit steigendem Lebensalter, besonders ab dem 50. Lebensjahr, stetig ab (Venstrom und Amoore 1968; Doty et al. 1984). Die Gründe hierfür sind multifaktoriell und u. a. durch Degeneration des Riechepithels (Nakashima et al. 1984), etliche virale Infekte (Deems et al. 1991), toxische Düfte, Kopfverletzungen und Kalzifizierung um die Lamina cribrosa (Krmpotić-Nemanić 1969; Doty 1989; Deems et al. 1991) bedingt. Weitere neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Ansari und Johnson 1975), Morbus Alzheimer (Serby et al. 1991), Morbus Niemann-Pick (Hovakimyan et al. 2013) und Multiple Sklerose (Zivadnov et al. 1999) sind mit Dysosmie gekennzeichnet. Bei Morbus

Parkinson und der Alzheimer Krankheit sind Riechstörungen ein früher Indikator und diagnostisches Mittel für eine spätere Manifestation der Krankheit (Doty 1989; Barresi et al. 2012). Das olfaktorische System wurde ebenfalls an Niemann-Pick Typ C1 (NPC1-defizienten) Mäusen untersucht. Eines der ersten Symptome war eine Einschränkung des olfaktorischen Systems (Hovakimyan et al. 2013). Bei früher Detektion ist ein therapeutischer Ansatz mit resultierender Normalisierung des Riechvermögens möglich (Meyer et al. 2018). Witt et al. (2018) beschrieben den Einfluss von NPC1 auf das VNO und die Riechschleimhaut. Vomeronasale Rezeptorneurone waren im Gegensatz zu olfaktorischen Rezeptorneuronen weniger empfindlich für eine NPC1-Pathologie. Im Vergleich zu einer Wildtypgruppe war im VNE eine erhöhte Regenerationsfähigkeit darstellbar. Bei der Huntington-Krankheit konnte schon vor 30 Jahren gezeigt werden, dass bei der frühen Form der HD die olfaktorische Komponente vor verbalen und visuellen Systemen eingeschränkt ist (Moberg et al. 1987). Die Forschungsergebnisse von Barrios et al. (2007) haben verdeutlicht, dass nicht ausschließlich das olfaktorische Epithel für die Hyposmie verantwortlich ist, sondern zusätzlich zentrale Bereiche wie der Nucleus caudatus, der Gyrus parahippocampalis, der entorhinale Kortex und der Thalamus an den Veränderungsprozessen beteiligt sind. Riechtests ergaben, dass die Geruchserkennung und -differenzierung wie bei der Alzheimer-Krankheit signifikant reduziert ist, jedoch das Geruchswiedererkennungsgedächtnis nicht beteiligt ist (Nordin et al. 1995; Bacon Moore et al. 1999). Dies könnte laut einer Mausstudie von Lazic et al. (2007) an Veränderungen wie geringerer Zellmigration, reduzierter Neurogenese oder veränderter Plastizität im primär olfaktorischen Kortex liegen. An einem Mausmodell konnte außerdem gezeigt werden, dass sich im Striatum, dem Globus pallidus und verschiedenen Schichten des Kortex Aggregate anreichern, welche für ein frühes sensorisches Defizit verantwortlich sein können. Arrasate et al. (2004) widersprachen allerdings mit ihren Ergebnissen dieser Hypothese. Die Aggregate wirken sich sogar protektiv auf das Zellüberleben aus, indem freies HTT gebunden und unschädlich gemacht wird. Zusätzlich konnten in Regionen mit früher Pathologie erhöhte Dopaminspiegel gemessen werden, welche die Rolle von Dopamin an der Krankheitsentstehung bekräftigen (Menalled et al. 2003).

1.5 Fragestellungen der Dissertation

Mit dieser Arbeit sollte die Auswirkung von Morbus Huntington bei Ratten verschiedenen Alters auf das vomeronasale Organ (VNO) bzw. das vomeronasale Epithel (VNE) untersucht werden. Als Grundlage für diese Studie diente das BACHD (Bacterial artificial chromosome huntington disease)-Rattenmodell der transgenen Linie 22 (TG22) aus Tübingen. In vorangegangenen Studien an den transgenen Linien 5 und 9 von Yu-Taeger et al. (2012) erwies sich dieses BACHD-

Rattenmodell als geeignetes Modell, um den Pathomechanismus von Morbus Huntington besser zu verstehen. Es wurde eine transgene Gruppe in zwei Altersstufen mit einer Wildtyp-Kohorte des gleichen Alters verglichen. Im Folgenden sind die zentralen Fragen der vorliegenden Dissertation aufgeführt:

- Hat die Erkrankung Morbus Huntington in der TG22 des BACHD-Rattenmodells einen Einfluss auf das VNO?
- Ist die TG22 des BACHD-Rattenmodells olfaktorisch auffällig?
- Ist die TG22 des BACHD-Rattenmodells ein sinnvolles Modell, um die Chemosensorik bei Morbus Huntington weiter zu untersuchen?
- Gibt es einen altersabhängigen Unterschied zwischen den transgenen Tieren und der Kontrollgruppe?
- Sind prämortale Gewichtsunterschiede zwischen kranken und gesunden Tieren messbar?

Hierzu wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Das VNE wurde hinsichtlich neuronaler Eigenschaften, des Zellumsatzes (Proliferation und apoptotischer Aktivität) und Invasion von Makrophagen und untersucht. Die nachfolgenden Fragestellungen zur immunhistochemischen Untersuchung dienten als Grundlage für die durchgeführte Studie:

- Ist die Anzahl reifer vomeronasaler Rezeptorneurone (VRN) in Jungtieren höher als in älteren Tieren?
- Haben kranke Tiere generell weniger reife VRN als gesunde?
- Wie ist das Verhältnis von reifen und unreifen VRN in den beiden Altersgruppen und hat Morbus Huntington einen Einfluss auf die Verteilung?
- Proliferieren die Zellen in einer kranken Population kompensatorisch stärker als in einer gesunden?
- Sinkt die Anzahl an proliferierenden Zellen mit dem Alter?
- Gibt es apoptotische Zellen im VNE und wenn ja, gibt es Unterschiede zwischen kranken und gesunden und jungen und alten Tieren?
- Gibt es Makrophagenaktivität im VNE und wenn ja, gibt es Unterschiede zwischen kranken und gesunden und jungen und alten Tieren?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für diese Studie wurde die transgene Linie 22 (TG22) des von Yu-Taeger et al. (2012) beschriebenen transgenen BACHD (Bacterial artificial chromosome huntington disease)-Rattenmodells verwendet, die von Prof. Olaf Rieß aus dem Institut für medizinische Genetik der Universitätsmedizin Tübingen zur Verfügung gestellt wurde. Die bacterial artificial Chromosomen wurden in die Oozyten von Sprague Dawley Ratten injiziert. Dieses Modell enthält das humane Huntingtin (HTT)-Gen in voller Länge mit 97 CAG/CAA-Wiederholungen sowie alle regulatorischen Elemente. Das zur Generierung verwendete 240 kb RP11-866L6 bacterial artificial chromosome wurde durch Ersetzung des HTT Exon 1 durch mutiertes HTT Exon 1 (mHTT) mit 97 CAA/CAG-Trinukleotid-Wiederholungen und durch das Einfügen zweier Exon 1 flankierender loxP-Sequenzmotive modifiziert (Gray et al. 2008; Yu-Taeger et al. 2012) (s. Abbildung 11, S. 19 und Abbildung 12, S. 20).

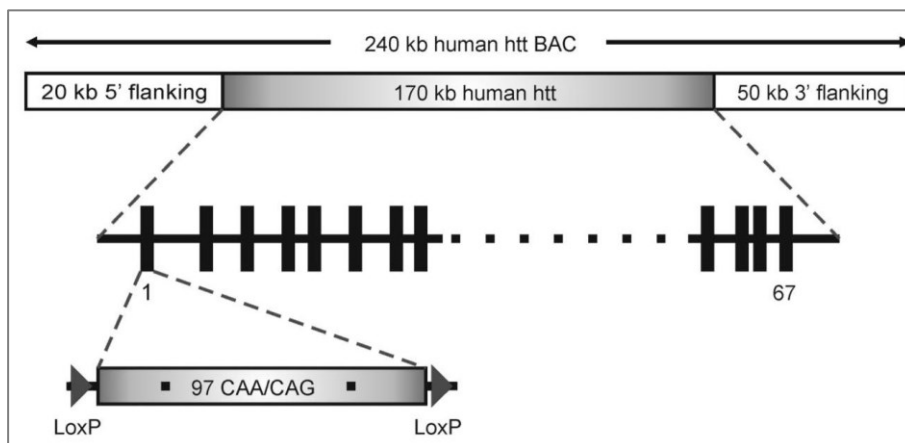


Abbildung 11: Der molekulare Aufbau der BACHD-Ratten. Das bacterial artificial chromosome (BAC) besteht aus 170 kb von dem HTT Locus mit 20 kb upstream und 50 kb downstream flanking Sequenzen. Das mutierte HTT Exon 1 enthält 97 CAA/CAG-Trinukleotide und wird von zwei loxP eingegrenzt (Yu-Taeger et al. 2012).

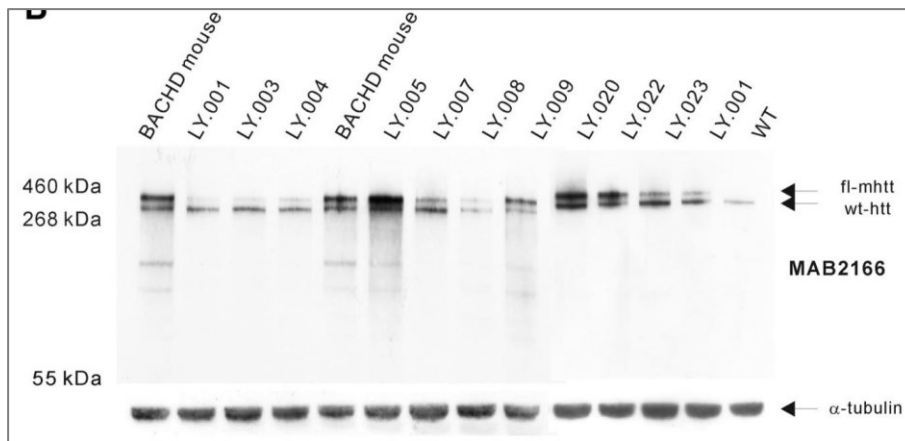


Abbildung 12: Vergleich der mHTT-Expression von verschiedenen Ratten Linien mit der BACHD-Maus im Westernblot. Die transgene Linie 22 (LY-022) weist eine leicht stärkere fl-mHTT-Expression als die BACHD-Maus auf (Yu-Taeger et al. 2012).

Im Vergleich zu den bekannten BACHD-Mausmodellen (Gray et al. 2008; Abada et al. 2013), zeigten Ratten eine höhere Auffassungsgabe und Lernbereitschaft. Dadurch wurden bei den Rattenmodellen kleinere kognitive Defizite besser sichtbar. Außerdem haben Ratten eine größere Hirnmasse als Mäuse, wodurch die Präparation einfacher ist und die Strukturen zur Auswertung größer sind. Die Rattenmodelle zeigten eine robuste sowie früh einsetzende und fortschreitende Form von Morbus Huntington und sind deswegen sehr gut geeignet, um den Mechanismus der Krankheit besser zu verstehen (Yu-Taeger et al. 2012).

Für die Versuchsreihe wurden jeweils sechs männliche Wildtyp-Ratten ($HD^{-/-}$) im postnatalen Alter von drei Tagen mit sechs transgenen männlichen Ratten ($HD^{+/-}$) derselben Anzahl und desselben Alters verglichen. Für die sechs Monate alten Ratten sind ebenfalls sechs männliche Wildtypen mit sechs männlichen BACHD-Ratten verglichen worden (s. Tabelle 1, S. 20). In diesem Forschungsprojekt wurden nur männliche Tiere eingeschlossen, da sie phänotypisch stärker ausgeprägt sind (Yu-Taeger et al. 2012).

Tabelle 1: Anzahl der Versuchstiere: $HD^{-/-}$ = Wildtyp; $HD^{+/-}$ = transgene Ratte

	3 Tage	6 Monate	Gesamtanzahl
$HD^{-/-}$	6	6	12
$HD^{+/-}$	6	6	12

2.2 Tierhaltung

Die Herkunft der Tiere ist in 2.1, S. 19 beschrieben. Die Paarung von einem Wildtyp ($^{-/-}$) Weibchen erfolgte mit einem transgenen ($^{+/-}$) Männchen. Die Tiere wurden in Käfigen Typ III erhöhter Ausführung von Ehret (Maße: 265 x 180 x 420 mm) am Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock gehalten und dort später aufbereitet. Bei einer Umgebungstemperatur von 22 ± 2 °C wurde ein Tag-/Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden eingestellt. Trinkwasser stand den Tieren unbegrenzt zur Verfügung. Im 24-Stunden-Rhythmus sind die Ratten mit pulverisiertem Pelletfutter Ssniff der Firma Soest ernährt worden. Die Jungtiere wurden nach 21 Tagen von ihrer Mutter getrennt und nach Geschlechtern und Versuchsgruppen separiert. Für diese Versuchsreihe wurden aus den in 2.1, S. 19 aufgeführten Gründen nur männliche Ratten verwendet. Am gleichen Tag erfolgte auch die Genotypisierung mit einer Biopsie aus der Schwanzspitze durch einen Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Genetik der Universitätsmedizin Rostock. Die Versuchsgruppen setzten sich dann aus jeweils sechs homozygoten Kontrolltieren ($HD^{-/-}$) pro Altersgruppe und sechs heterozygoten Tieren ($HD^{+/-}$) zusammen. Zur Bestimmung der Proliferation erfolgte zwei Stunden vor der Tötung der Tiere die intraperitoneale Injektion von 0,05 mg pro Gramm Körpergewicht 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU).

Alle Experimente sind nach den gültigen gesetzlichen Richtlinien durchgeführt worden. Die Genehmigung des zuständigen Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern trägt die Nummer: 7221.3-1-047/14.

2.3 Bestimmung des Körpergewichts

Um den Einfluss von Morbus Huntington auf das Körpergewicht zu untersuchen, wurden alle Versuchstiere am letzten Lebenstag gewogen.

2.4 Präparation und Gewebeaufbereitung

Die Tötung der Ratten erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zwölf Tiere (sechs Wildtypen und sechs transgene Tiere) wurden nach drei postnatalen Tagen (P3) und zwölf Tiere nach sechs postnatalen Monaten (6Mo) getötet. Den P3-Tieren wurde mittels scharfer Schere der Kopf abgetrennt. Anschließend erfolgte die Entfernung des Unterkiefers und der Zähne, mit folgender vorsichtiger Ablösung der Haut und Unterhaut vom Schädel. Zur Fixation wurden die Nativpräparate mindestens eine Woche in 3,7 % Paraformaldehyd (PFA, 0,1 M PBS, pH 7,4) überführt und zur Entkalkung ein bis zwei Wochen bei 37 °C in 1 % EDTA-Lösung im Brutschrank gelagert. Die älteren Tiere wurden mit Ether narkotisiert und bekamen anschließend

einen 1 ml/100 g Körpergewicht „Mausmix“ (Ketamin[®] und Rompun[®]) intraperitoneal injiziert. Danach erfolgte die Eröffnung des Brustkorbes und der Bauchhöhle und die Spülung der linken Herzkammer mit 4 °C kalter 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung. Anschließend wurde das Corpus zu Fixierung mit 4 °C kaltem 3,7%igem PFA perfundiert. Als nächstes wurden die Tiere dekapitiert, der Unterkiefer mit den Zähnen entfernt und die Haut mit Unterhaut vom Kopf abpräpariert. Die restlichen Körperteile fanden für diese Studie keine Verwendung. Nach Abschluss der Präparation des Schädels wurden alle Gewebeproben weitere drei bis vier Tage in 3,7%igem PFA nachfixiert und einen Monat lang bei 37 °C in 1%iger EDTA-Lösung im Brutschrank entkalkt. Nach der Entkalkung sind die Gewebeproben in Paraffin eingebettet worden. Hierzu erfolgte die Dehydratation der Präparate in der Histokinette in aufsteigender Alkoholreihe bis zum Xylol und die anschließende Einbettung in Paraffin.

2.5 Präparateauswahl

Aus den Paraffinblöcken wurden am Mikrotom 10 µm dicke Frontalschnitte des Gesichtsschädels angefertigt. Anschließend erhielten die ersten zehn Objektträger jeweils ein Präparat. Die nächsten zehn Schnitte wurden an zweiter Stelle der jeweiligen Objektträger positioniert. Diese Durchführung erfolgte so lange, bis vier Paraffinschnitte auf einem Objektträger waren. Dementsprechend hatten die Präparate auf einem Objektträger einen Abstand von 100 µm (s. Abbildung 13, S. 23). Der erste Objektträger einer Zehnerreihe wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Festlegung des Startpunktes für die Immunhistochemie des VNO erfolgte anhand der Nativpräparate unter dem Mikroskop. Ein Startpunkt wurde festgelegt, wo vergleichbare, kleine Volumina des VNO sichtbar waren. Bei den Dreitagestieren wurde im Abstand von 250 µm ein Schnitt immunhistochemisch markiert, insgesamt sieben. Die Proben der Sechsmonatstiere sind aufgrund der größeren Volumina im Abstand von 750 µm immunhistochemisch behandelt worden. Die Gesamtzahl der Schnitte betrug sieben. Die Immunhistochemie erfolgte auf einem gesamten Objektträger, auf dem das auszuwertende Präparat lag. Die Reihenfolge von Antikörper gegen das Olfactory marker protein (OMP), Antikörpern gegen das 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU), Antikörpern gegen das Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) und Antikörpern gegen das Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) war in allem Tieren die selbige. Die Immunreaktion mit Antikörpern gegen die aktivierte Caspase-3 (akt. Caspase-3) stellte eine Sonderrolle dar. Diese wurde aus technischen Gründen nur bei den älteren Tieren durchgeführt. Aufgrund der zu erwartenden geringen Zellzahl, erfolgte zur besseren Auswertung für jedes Tier alle 500 µm eine Immunreaktion von einem Schnitt – insgesamt zehn Proben. Pro Tier und Marker wurde ein Schnitt auf dem Objektträger zur Negativkontrolle belassen.

Schneideprotokoll P3-Tier					
Serie	Anzahl Präparate				Färbung/Antikörper
1.1	10	110	210	310	Hämatoxylin-Eosin
1.2	20	120	220	320	Anti-OMP
1.3	30	130	230	330	Anti-BrdU
1.4	40	140	240	340	Anti-PGP 9.5
1.5	50	150	250	350	Anti-Iba1
1.6	60	160	260	360	
1.7	70	170	270	370	Anti-OMP
1.8	80	180	280	380	Anti-BrdU
1.9	90	190	290	390	Anti-PGP 9.5
1.10	100	200	300	400	Anti-Iba1

Abbildung 13: *Schneideprotokoll P3-Tier.* Exemplarische Darstellung der Präparateauswahl bei einem P3-Tier im 250 μm Abstand. Die in Rot dargestellten Schnitte wurden für die Auswertung verwendet.

2.6 Histologische und immunhistochemische Verfahren

2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zunächst wurde mit dem jeweils ersten Objektträger einer Zehnerreihe wie in 2.5, S. 22 beschrieben zur morphologischen Übersicht eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Protokoll s. 9.1, S. 91) durchgeführt. Hämatoxylin bildet im Zusammenspiel mit Luft und wässriger Lösung stark basische Chelate von blauer Farbe. Diese werden von azidophilen Zellstrukturen wie DNA oder RNA gebunden. Eosin ist ein saurer, rötlicher Farbstoff und wird von basophilen Plasmaproteinen gebunden. Dadurch wird ein guter Farbkontrast zwischen Zellkern (blau) sowie Zytoplasma und Intrazellulärsubstanz (rot) erzeugt (Psyhyrembel und Arnold 2012; Sauermost und Freudig 1999).

2.6.2 Immunhistochemische Verfahren

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einem Epitop als Antigen-Antikörper-Reaktion. Diese Antikörper sind meist mit einem Detektionssystem gekoppelt, um sein Vorhandensein sichtbar zu machen. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein mono- oder polyklonaler Primärantikörper verwendet. In einer zweiten Stufe erfolgte die Zugabe eines artfremden Sekundärantikörpers, welcher gegen die Fc-Fragmente des ersten Antikörpers gerichtet war. Durch dieses mehrstufige Verfahren wird der Nachweis sensitiver. Anschließend wurde der Sekundärantikörper mit Biotin, dem Vitamin H, markiert. Biotin besitzt eine sehr starke Affinität zu Avidin, welches ein Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß ist.

Durch diese große Anzahl von Markern, die an das Epitop des Antigens binden, wird die Sensitivität weiter erhöht (s. Abbildung 14, S. 24). Durch eine hinzugefügte Peroxidase war es möglich, das Chromogen 3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid (= Diaminobenzidin (DAB)) in ein braunes Farbprodukt umzusetzen. Es ist ein wasserunlösliches Präzipitat, das in normalem Licht detektiert werden kann. Um eine Hintergrundfärbung aufgrund von endogenem Biotin, Nekrosen o. ä. möglichst zu vermeiden, wurden verschiedene Techniken angewandt. Normalserum ist zur Verringerung der hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen verwendet worden. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch Substratzugabe kompetitiv gehemmt. Als nächstes erfolgte die Demaskierung der Präparate durch Mikrowellenhitze. Damit konnten die Antigene für die Antikörper zugänglich gemacht werden. Die Permeabilität wurde gesteigert (Lang 2006).

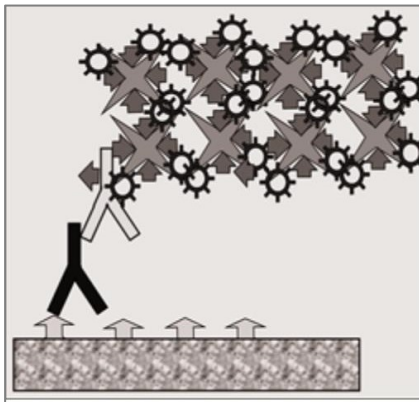


Abbildung 14: *Avidin-Biotin-Komplex.* Der primäre Antikörper (schwarz) bindet an ein Epitop (Pfeile, basal). An dem primären Antikörper bindet wiederum ein Sekundärantikörper (weiß), an welchen viele Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe binden (Lang 2006).

Im Folgenden wird der konkrete Ablauf der durchgeführten Immunhistochemie beschrieben. Die für die immunhistochemischen Reaktionen benötigten Gebrauchslösungen, Zitratpuffer und die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) sind in Anhang unter 9.4, S. 96 detailliert aufgeführt. In Anlehnung an den Bericht von Kawagishi et al. (2015) wurden die Abstände, wie in 2.5, S. 22 beschrieben, ausgewählt. Ein immunhistochemischer Durchgang beinhaltete den Zeitraum von zwei Tagen (Protokolle s. 9.2, S. 91).

Die Entparaffinierung erfolgte in Xylol und in absteigender Alkoholreihe bis zum Aqua dest.. Danach wurden die Schnitte mit Zitratpuffer umgeben und je nach Antikörper unterschiedlich lang in der Mikrowelle vorbehandelt (s. Tabelle 2, S. 25).

Tabelle 2: Verwendete Antikörper nach Gruppenalter

Alter der Ratte	1. Antikörper (hergestellt in)	MAK/PAK	Hersteller	Verdünnung	2. Antikörper	Vorbehandlung mittels Mikrowelle
P3	OMP (rabbit)	PAK	Sigma-Aldrich, Code No. 07889	1 : 6000	Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) 1 : 200 Vector Laboratories BA-1000	5 Min. bei 850 W + 5 Min. bei 340 W
P3	BrdU (rat)	MAK	AbD Serotec, Code No. MCA2060	1 : 1000	Biotinylated Anti-Rat IgG (H+L) 1 : 200 Vector Laboratories Code No. BA-9400	5 Min. bei 680 W
P3	PGP 9.5 (rabbit)	PAK	Merck KGaA, Code No. AB1761	1 : 1000	Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) 1 : 200 Vector Laboratories BA-1000	5 Min. bei 850 W + 5 Min. bei 340 W
P3	Iba1 (rat)	PAK	Wako Pure Chemical Industries, Code No. 019-19741	1 : 1000	Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) 1 : 200 Vector Laboratories BA-1000	2 Min. bei 850 W
6Mo	OMP (rabbit)	PAK	Sigma-Aldrich, Code No. 07889	1 : 6000	Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) 1 : 200 Vector Laboratories BA-1000	5 Min. bei 850 W + 5 Min. bei 340 W
6Mo	BrdU (rat)	MAK	AbD Serotec Code No. MCA2060	1 : 2000	Biotinylated Anti-Rat IgG (H+L) 1 : 200 Vector Laboratories Code No. BA-9400	5 Min. bei 680 W
6Mo	Cleaved Caspase-3 (rabbit)	PAK	Cell Signaling Technology, Code No. 9661S	1 : 500	Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) 1 : 200 Vector Laboratories BA-1000	5 Min. bei 680 W
6Mo	PGP 9.5 (rabbit)	PAK	Merck KGaA, Code No. AB1761-I	1 : 1000	Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) 1 : 200 Vector Laboratories BA-1000	5 Min. bei 850 W + 5 Min. bei 340 W
6Mo	Iba1 (rabbit)	PAK	Wako Pure Chemical Industries, Code No. 019-19741	1 : 1000	Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) 1 : 200 Vector Laboratories BA-1000	2 Min. bei 850 W

Nach der Denaturierung in der Mikrowelle wurden die abgekühlten Objektträger einzeln in einer Feuchtkammer aufgereiht und die vier Schnitte auf einem OT einzeln mit einem PAP-Pen umrandet. Danach erfolgte die Peroxidase-Hemmung mit 3%iger Salzsäure für 30 Minuten in der Feuchtkammer. Nach einem 15-minütigen Waschvorgang in PBS fand das Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit Normal goat Serum für eine Stunde in der Feuchtkammer statt. Danach wurden die Objektträger einmal kurz mittels Pipette und PBS abgespült und der Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung (s. Tabelle 2, S. 25) mit einer Stammlösung aufgetragen. Auf die Negativkontrollen ist nur die Stammlösung ohne Primärantikörper aufgetragen worden. Zur Inkubation wurde die Feuchtkammer mit den Objektträgern und dem aufgetragenen Primärantikörper über Nacht im Kühlschrank positioniert. Die restlichen vorhergegangenen und folgenden Inkubationen fanden bei Raumtemperatur statt. Am nächsten Morgen erfolgte eine erneute Waschung von drei mal fünf Minuten mit PBS. Nun wurde der Sekundärantikörper anti-rabbit bzw. anti-rat auf die Schnitte pipettiert und nach Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer mit PBS abgespült. Als nächstes ist der Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex) aufgetragen worden, welcher zuvor 30 Minuten auf einem Rührschüttler inkubierte. Nach einer Stunde Inkubation und Waschvorgang mit PBS wurden die Präparate unter dem Abzug für zwei bzw. vier Minuten mit DAB benetzt. Abschließend erfolgte die Waschung mit Aqua dest..

Pro Tier wurde, je nach Reaktivität des Markers, eine unterschiedliche Anzahl von Präparaten mit Hämatoxylin gegengefärbt. Bei einer hohen Zelldichte erschwerte die Gegenfärbung die stereologische Auswertung am Mikroskop, sodass teilweise darauf verzichtet wurde. Zur Gegenfärbung konnten die Objektträger nach der Waschung mit Aqua dest. in die hergestellte Hämatoxylin-Lösung (Protokoll s. 9.1, S. 91) eingetaucht werden und danach unter fließendem Leitungswasser gewaschen werden.

Die Dehydratation erfolgte schrittweise vom Aqua dest. über die aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol. Zum Schluss wurden die Präparate mit Depex und einem Objektgläschen eingedeckelt und damit konserviert.

2.6.2.1 Olfactory marker protein (OMP)

Olfactory marker protein (OMP) ist ein klassischer Marker für reife olfaktorische Neurone. Es verfügt über ein Molekulargewicht von 19 kDa und ist spezifisch für alle reifen olfaktorischen Neurone in verschiedenen Regionen von Wirbeltieren (Keller und Margolis 1975; Monti-Graziadei et al. 1977; Farbman und Margolis 1980; Farbman et al. 1998). Antikörper gegen OMP werden eingesetzt, um das olfaktorische System vom umliegenden und respiratorischen Epithel

zu unterscheiden. OMP spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von olfaktorischen Neuronen (Hartman und Margolis 1975; Menco 1989; Weiler et al. 1999a; Dibattista und Reisert 2016). Die OMP-Expression ist bei vomeronasalen Rezeptorneuronen in Säugetieren schon lange bestätigt (Farbman und Margolis 1980) und seit kurzem im vorderen Septumbereich beim Menschen als Hinweis für ein akzessorisches olfaktorisches System postuliert (Gebhart et al. 2019). Laut Bock et al. (2009) ist es jedoch wahrscheinlich, dass OMP unabhängig vom Reifegrad der Neurone noch weitere Funktionen aufweist. In neueren Publikationen wurde aufgeführt, dass OMP neben dem 19 kDa Monomer noch ein 38 kDa Dimer zeigte. Weiterhin ist das als zytoplasmatisch geltende Protein ebenfalls im Nukleus detektiert worden. Die abschließende Funktion des OMP an der olfaktorischen Signaltransduktionskaskade ist noch nicht geklärt (Koo et al. 2004). Studien bewiesen das Vorkommen von OMP-positiven Zellen auch im zentralen Nervensystem, dem Hypothalamus und in nicht olfaktorisch aktivem Gewebe wie dem Herzen, der Blase und der Schilddrüse von Mäusen. Dies lässt auf eine Verbindung zwischen nervalem und endokrinem System schließen (Baker et al. 1989; Koo et al. 2005; Kang et al. 2015).

2.6.2.2 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)

Seit Mitte der 70er Jahre ist es möglich, mittels verschiedener Antikörper gegen 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) proliferierende Zellen immunhistochemisch zu detektieren (Gratzner et al. 1975). Zuvor erfolgte über Jahre eine Autoradiographie mit dem Isotop ^3H -Thymidin (Sirlin 1958). BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird während der Synthese-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Die gängige Methode zur Untersuchung der neuronalen Zellmauserung wurde gleichermaßen in dieser Arbeit verwendet. BrdU ist kurz vor der Tötung intraperitoneal injiziert worden (Gratzner et al. 1975; Magaud et al. 1989; Weiler et al. 1999b; Giacobini et al. 2000). BrdU wird im Riechepithel (main olfactory epithelium, MOE) verwendet, um proliferierende Basalzellen darzustellen (Ohta und Ichimura 2001; Carter et al. 2004; Bock et al. 2009).

2.6.2.3 Caspase-3 und aktivierte (akt.) Caspase-3

Caspase-3 (CPP-32, Apopain, Yama, SCA-1) ist ein Protein mit 32 kDa Größe und gehört zur Familie der Cystein-Proteasen. Es besteht aus zwei Untereinheiten und bildet dadurch einen Komplex. Eine hohe Expression findet sich in Lymphozyten. Durch die Proteaseaktivität, welche besonders in Immunzellen zu finden ist, wird eine apoptotische Signalkaskade ausgelöst. Es konnte gezeigt werden, dass CPP-32 ein spezifisches interleukin-1 β -converting Enzym ist,

welches bei Säugetieren eine zentrale Rolle beim Zelltod spielt. Eine Überexpression von Caspase-3 oder anderen pro-apoptotischen Proteasen kann einen unspezifischen Zelltod auslösen (Fernandes-Alnemri et al. 1994; Nicholson et al. 1995). Der hier verwendete Antikörper detektiert nicht die volle Länge von Caspase-3 oder anderen Caspasen, sondern identifiziert große Fragmente (17/19 kDa) aktivierter Caspase-3, welche aus der Spaltung nahe der Asparaginsäure 175 (Asp175) entstehen (Cell Signaling Technology 2019a). Caspase-3, als Effektor-Caspase, wird selbst durch Spaltung von Initiator-Caspasen wie Caspase-9, -8 und -10 aktiviert. Durch Proteolyse spielt Caspase-3 eine wichtige Rolle in der Apoptosekaskade (Cell Signaling Technology 2019c). In der vorliegenden Arbeit wird die aktivierte Caspase-3 vereinfacht als akt. Caspase-3 bezeichnet.

2.6.2.4 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)

Das protein gene product 9.5 (PGP 9.5) ist ein zytoplasmatisches Protein, das von einer großen Anzahl an Neuronen im peripheren und zentralen Nervensystem und im neuroendokrinen System exprimiert wird. Es verfügt über ein Gewicht von 27 kDa und macht 1 – 2 % der löslichen Hirnproteine aus (Thompson et al. 1983). PGP 9.5 gehört zur Familie der ubiquitin C-terminalen Hydrolasen (Wilkinson et al. 1989). Neben Neuronen wird sein Vorkommen in dem juxtaglomerulären Apparat der Niere, im Hoden und im Corpus luteum beschrieben. Es wird als eines der frühesten Neuron-spezifischen Gene, die während der Entwicklung des Nervensystems exprimiert werden, bezeichnet. Somit ist PGP 9.5 ein Marker für unreife und reife Neurone (Wilson et al. 1988; Schofield et al. 1995; Trowern et al. 1996).

2.6.2.5 Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1)

Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) ist ein Protein mit dem Gewicht von 17 kDa. Iba1 gehört als Protein zur EF-Hand-Familie, einer Proteinfamilie, die Kalzium bindet (Imai et al. 1996; Cell Signaling Technology 2019b). Es wird als Adaptermolekül, das verschiedene Signalwege beeinflusst, betrachtet. Iba1 wird besonders im Hoden und in der Milz und etwas schwächer in Gehirn, Lunge und Nieren exprimiert. Im Gehirn exprimieren besonders Mikrogliazellen Iba1, aber keine Neurone. Die Expression von Iba1 steigt, wenn Mikrogliazellen oder Makrophagen aktiviert werden (Ito et al. 1998). Außerdem wird Iba1 als MHC-Klasse-III-Protein beschrieben, welches in monoblastischen Zellen exprimiert wird. Daher wird Iba1 als früher Marker der sich differenzieren Zellen aus den Monozyten gesehen, welche besonders Mak-

rophagen und Mikrogliazellen sind (Imai et al. 1996). Durch Aktinverlinkungen hat Iba1 ebenfalls Einwirkungen auf die Ausbildung des Zytoskeletts von Mikoglia/Makrophagen (Ohsawa et al. 2000; Sasaki et al. 2001; Kanazawa et al. 2002).

2.7 Stereologische Auswertung

Zur Vorbereitung der stereologischen Auswertung wurden die immunhistochemisch behandelten Proben verblindet und ihnen Nummern zugeordnet. Alle vorbereiteten Proben der beiden Altersgruppen, bis auf PGP 9.5 der Jungtiere und akt. Caspase-3 bei den Sechsmonatstieren, sind einmal mittels Stereo Investigator 11.02.1 der Firma MBF Bioscience ausgezählt worden. Zur optischen Darstellung der Präparate wurde das Videomikroskop Modell BX51TF von Olympus verwendet.

Die Stereologie wird in der Forschung genutzt, um aus Schnittproben (samples) absolute Anzahlen oder numerische Dichten zu schätzen. Ein Vorteil stellt die effiziente und reproduzierbare Arbeitsweise dar. Außerdem ist diese Methode nicht abhängig von Größe, Aussehen und Verteilung der Zellen. Für diese Arbeit wurde die Zählmethode Optical Fractionator genutzt (Protokoll s. 9.7, S. 98). Es ist eine Methode, um die Gesamtzellzahl (absolute Zellzahl) zu schätzen. Diese Zahl wird berechnet, nachdem die Zellen systematisch, randomisiert und in dreidimensionalen Zählrahmen quantifiziert worden sind.

Zunächst wurden die Schnittdicke (hier 10 μm) und die zu bearbeiteten Proben definiert. Als nächstes erfolgte die Umrandung des auszuwertenden Bereiches (s. Abbildung 15, S. 30). Das vomeronasale Epithel (VNE) wurde beidseits zusammen betrachtet, da in vorherigen Studien an Mäusen (Witt et al. 2018) keine Unterschiede zwischen linkem und rechten VNE aufgezeigt werden konnten. Wegen der teils sehr geringen Zellzahl ergab dieses Vorgehen somit bessere statistische Ergebnisse.

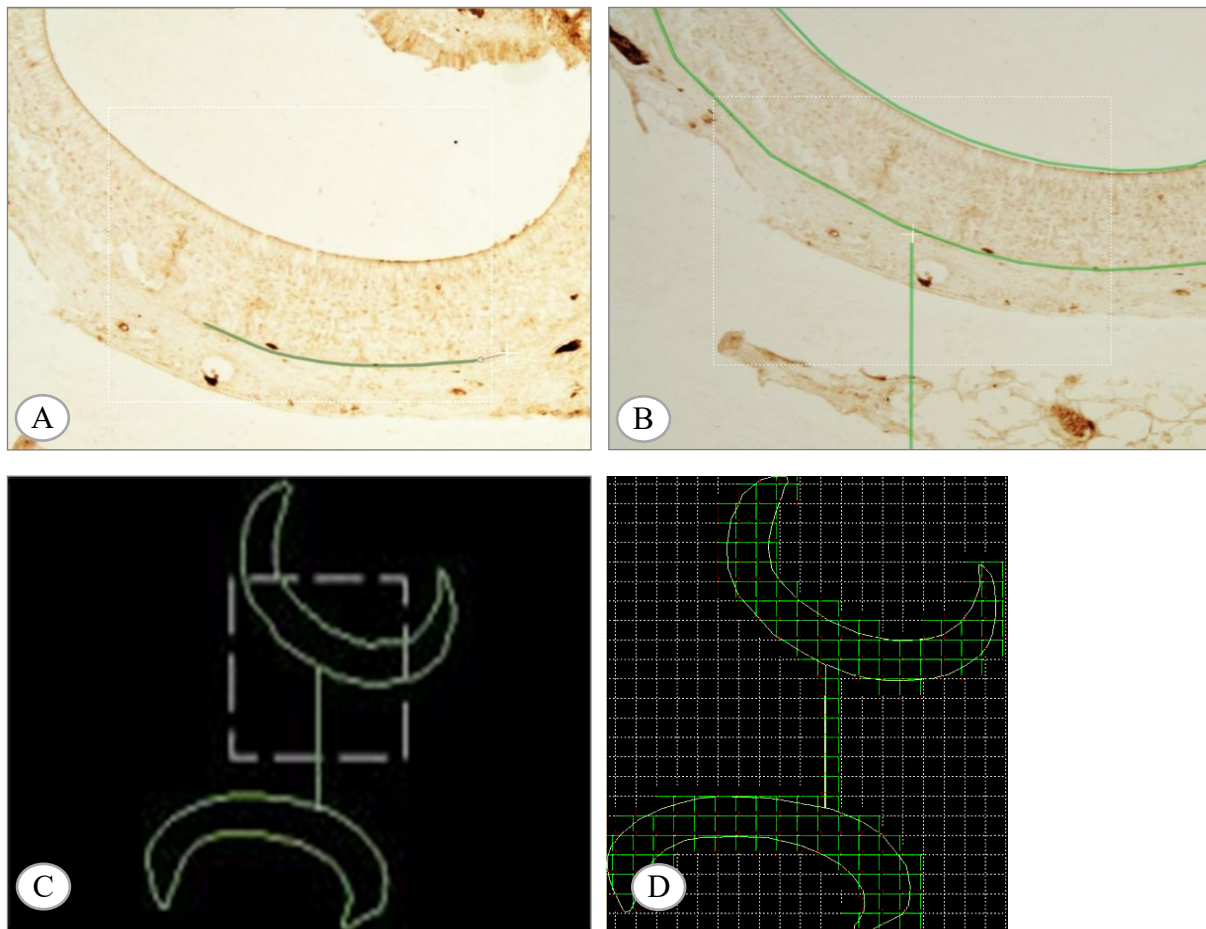


Abbildung 15: Umrandung des vomeronasalen Epithels (grüne Kontur) zu Beginn (A) und zum Abschluss (B), als Übersichtsbild (C) und mit Gitternetzlinien (D) mit der Umrandung von linkem und rechtem VNE zur Auswertung.

Mithilfe dieser geschlossenen Kontur errechnete das Computerprogramm Stereo Investigator den Flächeninhalt bzw. das Volumen in der X- (Länge), Y- (Breite), Z- (Tiefe) Achse und legte über diesen Bereich ein zweidimensionales Gitternetz (s. Abbildung 15 D, S. 30).

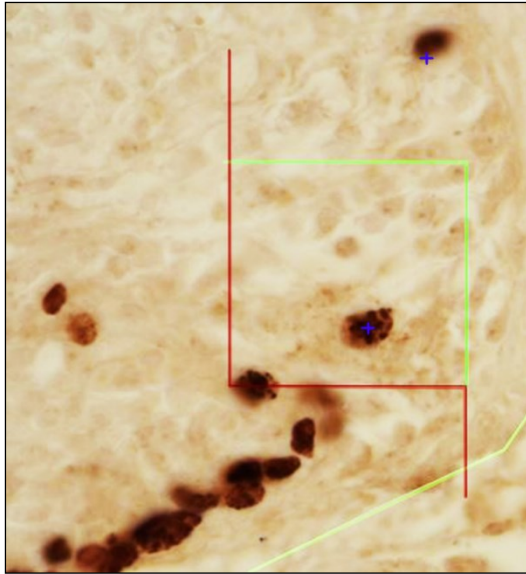


Abbildung 16: Gitternetz mit ROI (Region of Interest) und grüner Einschluss- und roter Ausschlusslinie. Jeweils eine markierte Zelle (blaues Kreuz) im Einschluss- und Ausschlussbereich.

Pro Marker sind hierfür unterschiedliche Abstände und Größen gewählt worden (s. Tabelle 3, S. 31). Die Auszählung fand immer nach demselben Muster mit zwei grünen Einschlusslinien und zwei roten Ausschlusslinien (Forbidden lines) statt. Immunhistochemisch markierte Zellen, welche die grünen Linien berührten, wurden mitgezählt und diejenigen, welche die roten Linien berührten, wurden ausgeschlossen (s. Abbildung 16, S. 31).

Nur immunhistochemisch-positive neuronale Zellen im sensorischen Bereich des VNO wurden gezählt. Stützzellen sind vom restlichen Epithel diskriminiert und nicht in die Zählung eingeschlossen worden. Diese Regeln verhinderten die doppelte Zählung und das Überschätzen der Zellzahl (MBF Bioscience 2019b, 2019c).

Tabelle 3: Counting Frames und Grid Size je nach Marker und Alter

Alter des Tieres	Marker	Counting Frame (μm)	Grid Size (μm)
P3	OMP	50 x 50	60 x 60
P3	BrdU	50 x 50	60 x 60
P3	Iba1	25 x 25	35 x 35
6Mo	OMP	60 x 60	70 x 70
6Mo	BrdU	50 x 50	60 x 60
6Mo	PGP 9.5	60 x 60	90 x 90
6Mo	Iba1	60 x 60	90 x 90

Der Optical fractionator berücksichtigt die numerische Zellzahl, welche mit einem Referenzvolumen multipliziert wird. Mit der folgenden Formel wurde die Gesamtzellzahl (N) errechnet:

$$N = \sum Q^- \cdot \frac{t}{h} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf}$$

Q⁻: gezählte Zellen

t: Schnittdicke

h: Höhe des Zählrahmens

asf: Fläche des Zählrahmens

ssf: Fläche der Schnittregion

Abbildung 17: Formel zur Berechnung der Zellzahl mittels Optical fractionator (MBF Bioscience 2019a)

Zu Beginn der stereologischen Auswertung erfolgte die Durchführung einer Pilotstudie, um die optimalen Zählparameter zu bestimmen. Die Studie war wegen der unterschiedlichen Marker und dessen Verteilung notwendig, da je nach Marker unterschiedlich viele Zellen im VNE reaktiv waren. Hier wurde versucht, den Fehlerkoeffizienten möglichst gering zu halten ($CE < 0,05$; coefficient of error). Deswegen musste beispielsweise bei Iba1, einem Marker bei dem mit wenigen Zählereignissen zu rechnen ist, die Grid Size, also der Abstand zwischen den Zählrahmen, und die Rahmengröße verringert werden. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Altersgruppen waren aufgrund der stereologischen Auswertungstechnik miteinander vergleichbar.

Die Präparate, welche bei den jungen Tieren mit anti-PGP 9.5 markiert wurden, konnten nicht stereologisch ausgewertet werden. Trotz zufriedenstellender Testversuche, war bei den Versuchstieren die Hintergrundfärbung und die Zellzahl so hoch, dass eine Quantifizierung nicht verlässlich war.

Die Schnitte, die akt. Caspase-3-reaktiv waren, wurden aufgrund der zu erwarteten geringen Zellzahl nicht mittels Stereo Investigator ausgewertet (s. Abbildung 18, S. 33). Die Fehlerkoeffizienten wären wegen der vereinzelt Ereignisse zu hoch gewesen. Die Auszählung erfolgte deshalb bei akt. Caspase-3 nur semi-quantitativ. Wegen der besseren Auflösung wurde hierfür ebenfalls das Mikroskop von Olympus Modell BX51TF verwendet. Die Betrachtung des VNE erfolgte durch das Okular mit einer 20-fachen Vergrößerung. In seltenen, nicht eindeutigen Fällen, musste die 40-fache Vergrößerung oder die Fokussierung am Computerbildschirm zu Hilfe genommen werden. Pro detektierte Zelle wurde eine Strichliste geführt und die Verteilung der Zellen im VNE mit Punkten auf Papier dokumentiert.

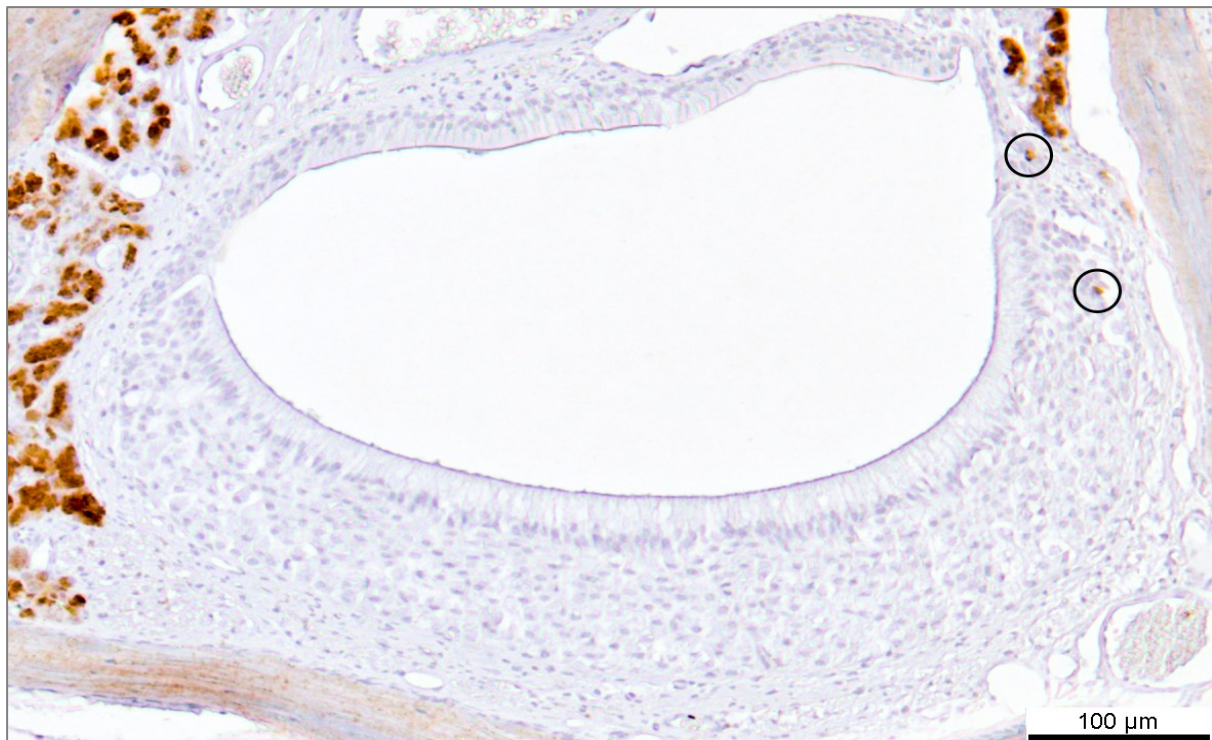


Abbildung 18: VNO mit akt. Caspase-3-Reaktion mit Hämatoxylin-Gegenfärbung. Umrandete Zellen sind akt. Caspase-3-reaktiv. Maßstab: 100 μm

3 Ergebnisse

Die stereologisch ermittelten Daten wurden zunächst auf Normalverteilung getestet. Wegen inkonsistenter Normalverteilung und kleiner Stichprobenanzahl kam für die Auswertung der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Hierfür ist SPSS Version 25 verwendet worden. Die Erstellung der Säulendiagramme fand mit Microsoft Excel (2016) statt. Die Mittelwerte (M) wurden verglichen und die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) graphisch dargestellt.

Gegenübergestellt wurden die Wildtypen (HD^{-/-}) mit den transgenen Tieren (HD^{+/-}) in den Altersgruppen von drei Tagen (P3) bzw. sechs Monaten (6Mo). Eine Signifikanz ergab sich bei einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ und wurde im Diagramm mit einem * für signifikant und „ns“ für nicht signifikant dargestellt. Die Rohdaten finden sich im Anhang unter 9.8, S. 99. Die Auswertung der akt. Caspase-3-Reaktivität erfolgte semi-quantitativ. Alle immunhistochemischen Ergebnisse beinhalteten die Summe aus rechtem und linken vomeronasalen Epithel (VNE).

3.1 Körpergewicht

Um die Frage zu klären, ob die genetische Mutation das Körpergewicht der Versuchstiere beeinflusst, wurden die Tiere prä mortal mittels Präzisionswaage gewogen. Die ermittelten Daten wurden sowohl innerhalb der Altersgruppen als auch zwischen den Gruppen verglichen.

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied des Körpergewichts bei den Jungtieren ($p = 0,485$). Der Mittelwert der Wildtypen (HD^{-/-}) war 10 g ($\pm 0,52$) und HD^{+/-} wies einen Mittelwert von 9,5 g ($\pm 0,43$) auf (s. Abbildung 19, S. 36).

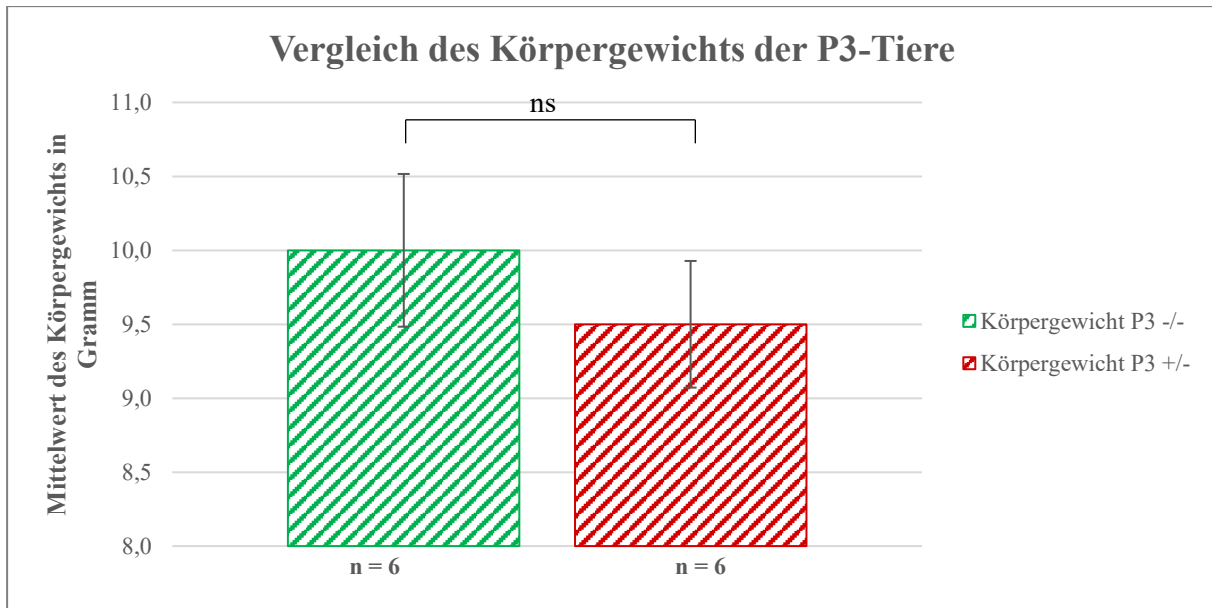


Abbildung 19: Körpergewicht im Vergleich P3 $HD^{-/-}$ und $HD^{+/-}$. Kein signifikanter Unterschied ($p = 0,485$). $n = 6 HD^{-/-}$, $n = 6 HD^{+/-}$

Der Vergleich der 6-Monatsratten zeigte bei dem Körpergewicht keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,132$). Die Wildtypen hatten im Mittel ein Gewicht von 549 g ($\pm 17,75$) und die transgenen Tiere ein Gewicht von 489,2 g ($\pm 27,12$) (s. Abbildung 20, S. 36).

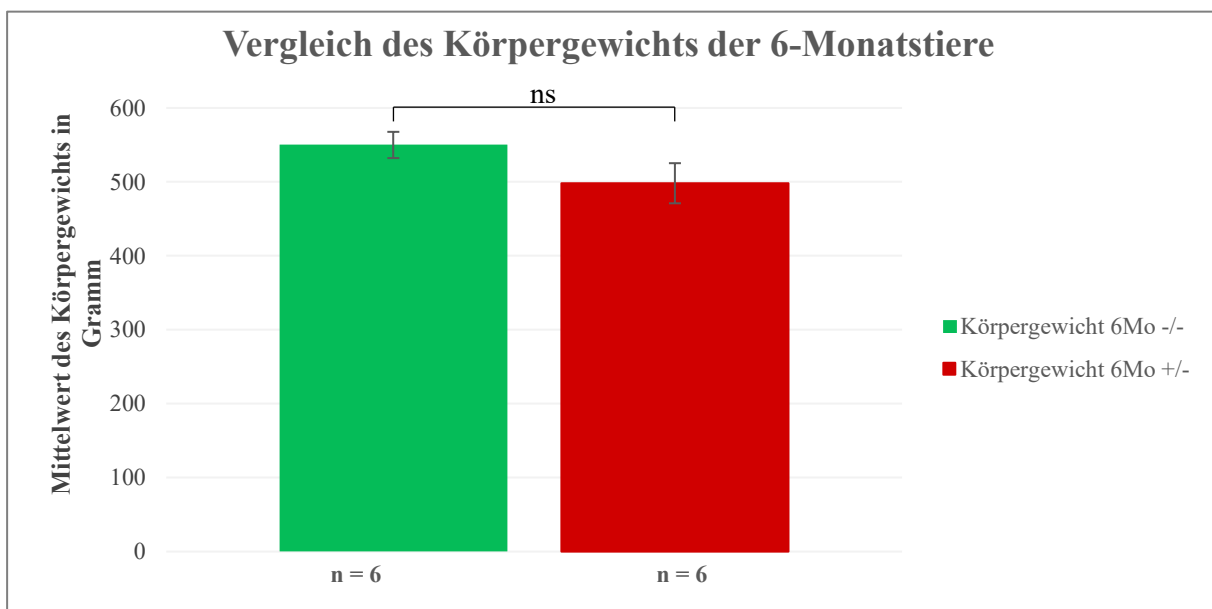


Abbildung 20: Vergleich des Körpergewichts der 6-Monatstiere zwischen $HD^{-/-}$ und $HD^{+/-}$. Kein signifikanter Unterschied ($p = 0,132$). $n = 6$ pro Kohorte

Der Vergleich des Körpergewichts ergab in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Bei den transgenen Tieren ist eine leichte Tendenz zu niedrigerem Körpergewicht anzunehmen.

Bei einer Stichprobenanzahl von sechs pro Gruppe kann dieses Phänomen möglicherweise zufallsbedingt sein.

Der Vergleich des Körpergewichts zwischen den verschiedenen Altersgruppen zeigte bei der Auswertung der Wildtypen und beim Vergleich der HD^{+/-}-Ratten eine Signifikanz von $p = 0,002$. Dieser signifikante Unterschied war wachstumsbedingt zu erwarten – er wurde zur Vollständigkeit dennoch aufgeführt (s. Abbildung 21, S. 37).

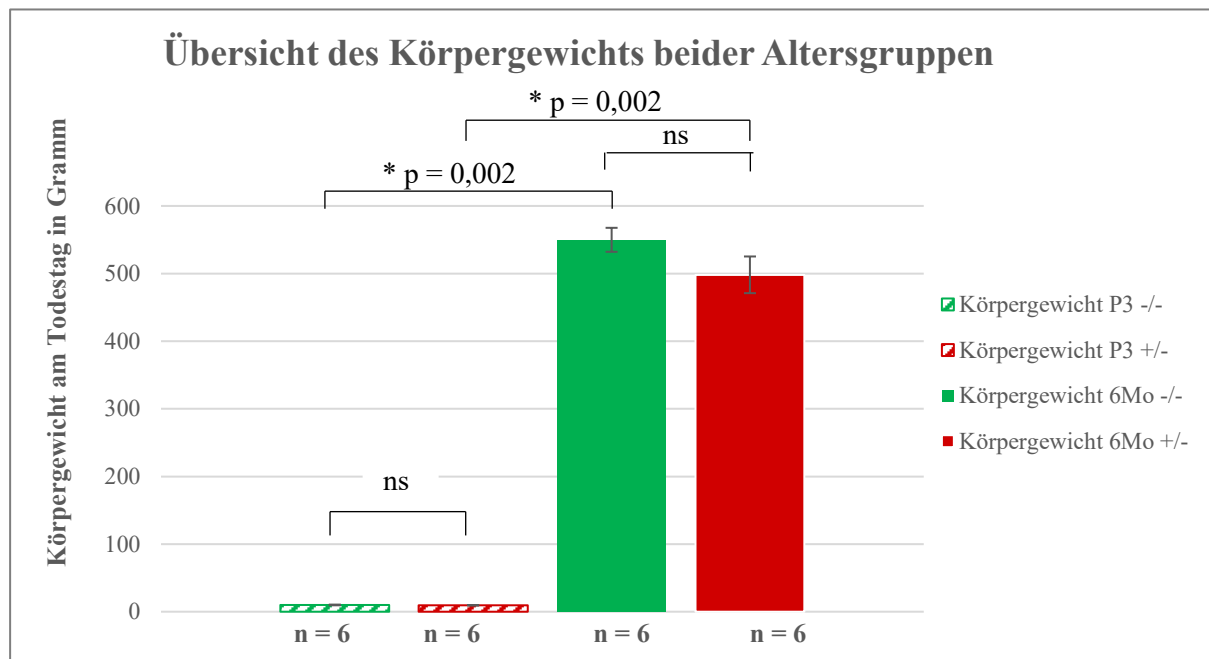


Abbildung 21: Übersicht des Körpergewichts: P3- und 6-Monatstiere mit Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwertes und Signifikanzen.

3.2 Histologische und immunhistochemische Verfahren

3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde als Übersichtsfärbung an Schnitten in 400 μm Abständen pro Tier durchgeführt. Es zeigte sich kein Unterschied in der Kernmorphologie zwischen den HD^{-/-} und HD^{+/-}-Ratten, kein altersabhängiger Unterschied sowie keine Apoptose- oder Nekrosezeichen (s. Abbildung 22, S. 38).

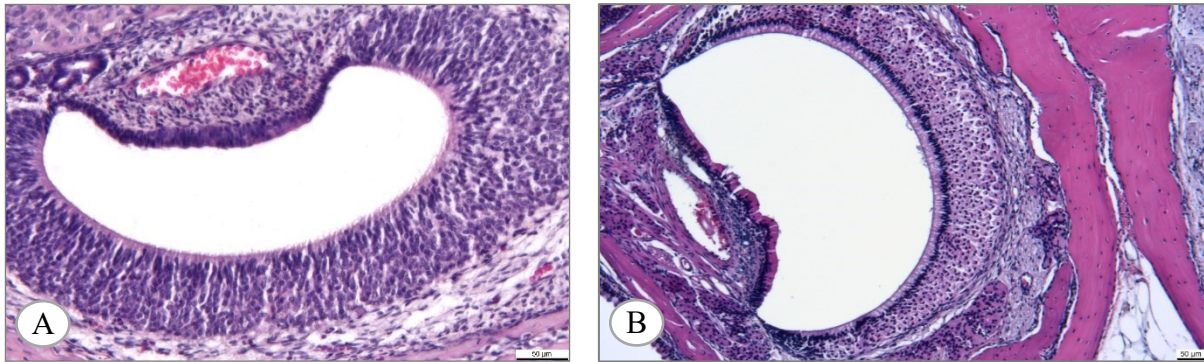


Abbildung 22: Das VNO beim $HD^{+/-}$ P3-Tier (A) und beim $HD^{+/-}$ 6-Monatstier (B). Keine Unterschiede in Kernmorphologie, keine Nekrose- oder Apoptosezeichen. Hämatoxylin-Eosin, Maßstab 50 μ m.

3.2.2 Immunhistochemische Reaktionen

3.2.2.1 Olfactory marker protein (OMP)

Die Anzahl und das Verteilungsmuster der mit anti-OMP markierten Zellen wurde ausgewertet. OMP ist ein spezifischer Marker für reife olfaktorische bzw. vomeronasale Rezeptorneurone (VRN) (vgl. 2.6.2.1, S. 26). Es sollte evaluiert werden, ob es Unterschiede in der Anzahl der reifen VRN gibt und ob ein besonderes Verteilungsmuster der reaktiven Zellen erkennbar ist. Das Verteilungsmuster der OMP-reaktiven Zellen im VNE (s. Abbildung 23, S. 39) ähnelte den Beschreibungen von Farbman und Margolis (1980), Weiler und Benali (2005) und Rodewald et al. (2016). In beiden Altersgruppen war eine nukleäre Reaktion der reifen VRN zu finden. Die Verteilung bei den P3-Tieren war bei weniger Zellen ungeordneter. Besonders bei den 6-Monatstieren fiel die typische Markierung der Dendriten nach apikal auf. Hier ließen sich OMP-positive Mikrovilli darstellen. Weiterhin war die fehlende Anreicherung von OMP in der lateralen Proliferationszone am Übergang zum nicht-sensorischen Epithel zu beobachten. Dort befanden sich unreife Neurone und folglich keine OMP-Anreicherung. Nach medial schloss sich eine Zone, in der sich junge, aber reife Neurone befinden, an. In dem Bild der 6-Monatstiere (s. Abbildung 23 D, S. 39) ist dieses sichtbar zu verzeichnen. Einen qualitativen Unterschied zwischen $HD^{-/-}$ und $HD^{+/-}$ gab es nicht.

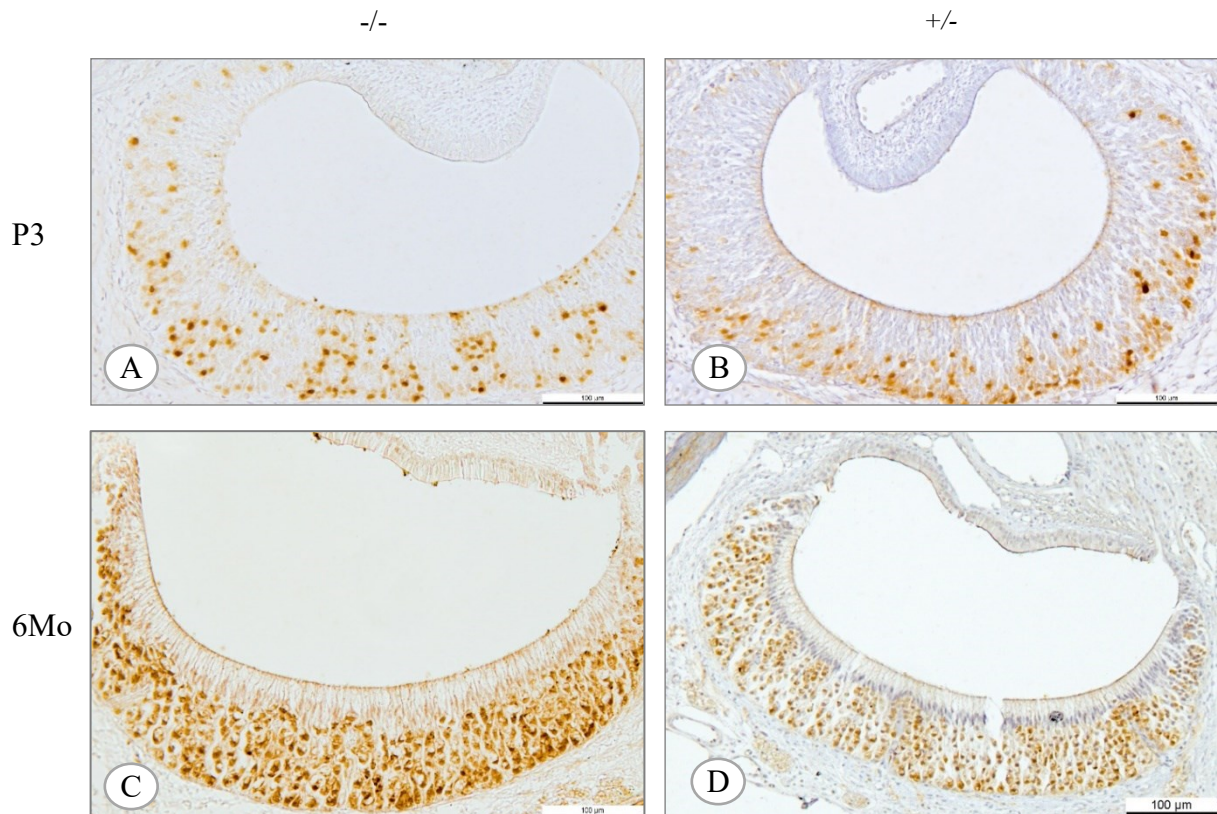


Abbildung 23: Frontalschnitt durch das VNO. OMP-Nachweis. **A:** P3 $HD^{-/-}$ mit Hämatoxylin-Gegenfärbung. **B:** P3 $HD^{+/-}$ mit Hämatoxylin-Gegenfärbung. **C:** 6Mo $HD^{-/-}$. **D:** 6Mo $HD^{+/-}$ mit Hämatoxylin-Gegenfärbung. 20-fache Vergrößerung bei A-D. Maßstab: 100µm

Die stereologische Auswertung ergab folgende Ergebnisse für OMP:

Die Anzahl der reifen VRN der Dreitagestiere im VNE betrug im Mittel bei $HD^{-/-}$ = 214.335 Zellen/mm³ (\pm 23.405) und bei $HD^{+/-}$ = 206.533 Zellen/mm³ (\pm 34.426). Der Unterschied in den Vergleichsgruppen war nicht signifikant ($p = 0,94$) (s. Abbildung 24, S. 40).

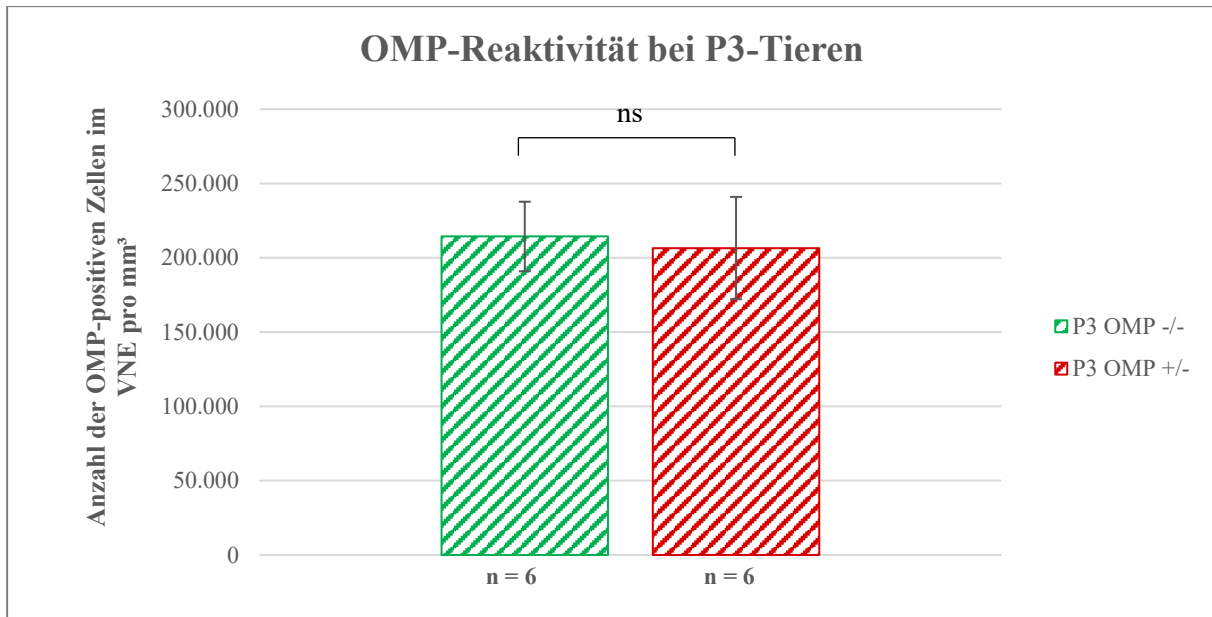


Abbildung 24: Vergleich OMP-positive Zellen im VNE zwischen P3 $HD^{-/-}$ und P3 $HD^{+/-}$. Kein signifikanter Unterschied ($p = 0,94$). $n = 6$ pro Gruppe

Für die Wildtypen ergab sich bei dem Vergleich der älteren Tiere ein Mittelwert von 3.791.308 Zellen/mm³ ($\pm 1.814.059$) und für die transgenen Ratten ein Mittelwert von 5.886.366 Zellen/mm³ ($\pm 3.680.765$). In einer Stichprobenanzahl von sechs Tieren pro Gruppe war dieser Unterschied mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,937$ nicht signifikant (s. Abbildung 25, S. 40).

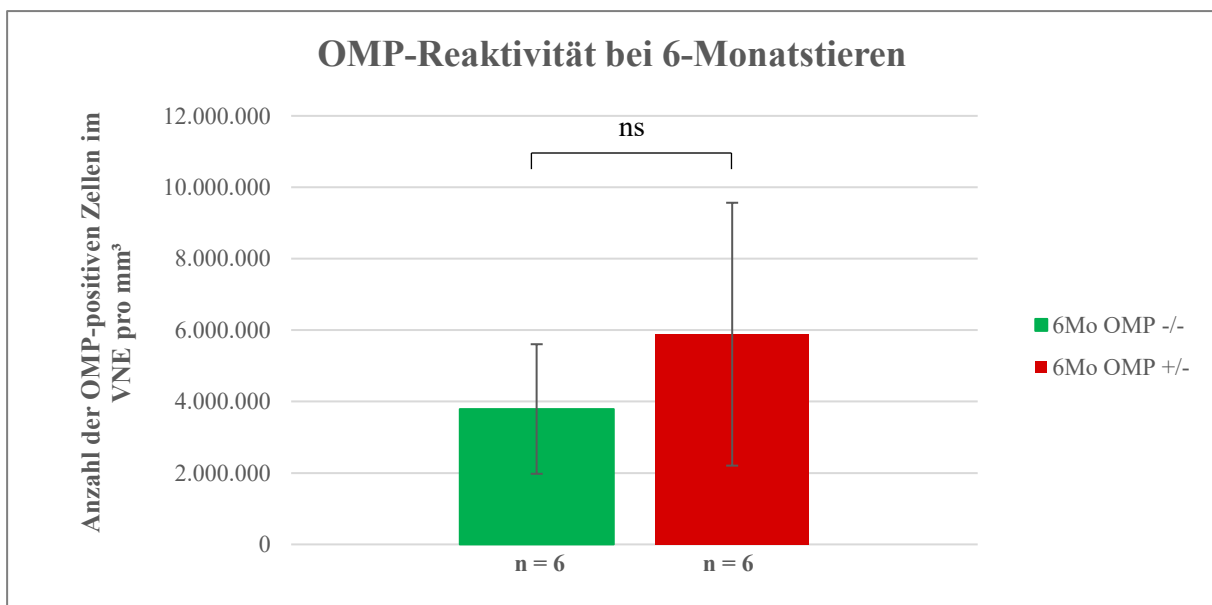


Abbildung 25: Vergleich OMP-positiver Zellen im VNE zwischen 6Mo $HD^{-/-}$ und 6Mo $HD^{+/-}$. Kein signifikanter Unterschied ($p = 0,937$). $n = 6$ pro Gruppe

Vergleicht man die Wildtypen untereinander, so waren die Unterschiede in dieser Kohorte, mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,002$, signifikant. Gleiches galt für den Vergleich der Huntington-Ratten untereinander (s. Abbildung 26, S. 41).

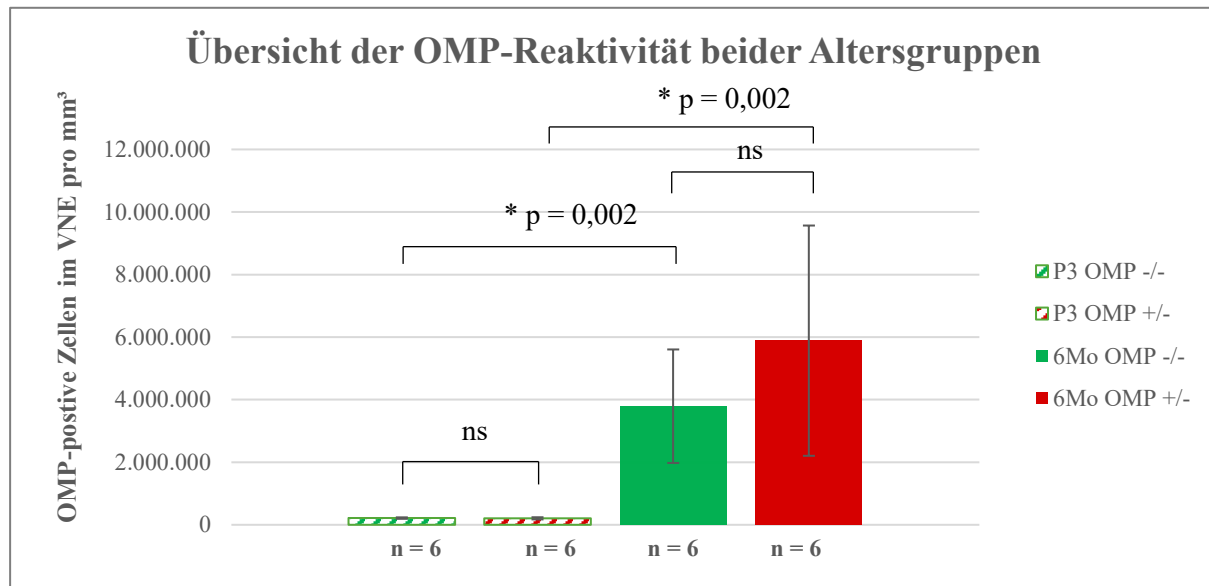


Abbildung 26: Übersicht OMP: P3- und 6-Monatsiere mit Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwertes und Signifikanzen.

3.2.2.2 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)

Proliferierende Zellen können mit BrdU gut visualisiert werden (vgl. 2.6.2.2, S. 27). Das Verteilungsmuster der BrdU-reaktiven Zellen unterschied sich in den beiden Altersgruppen. Während die Jungtiere eine gleichmäßige Verteilung basal und apikal über das ganze VNE besaßen, existierte bei den erwachsenen Tieren eine auffällige Anhäufung im lateralen Kompartiment, der Proliferationszone, mit einer Migration von basal nach apikal (s. Abbildung 27 E, S. 42). Bei allen Tieren war eine Reaktivität im nicht-sensorischen Epithel erkennbar. Bei den P3-Tieren zeigten sich auch vereinzelt Zellen in der Stützzellschicht, welche aber in dieser Studie nicht ausgewertet wurden. Zwischen den Wildtypen und den transgenen Ratten war kein Unterschied im Verteilungsmuster festzustellen.

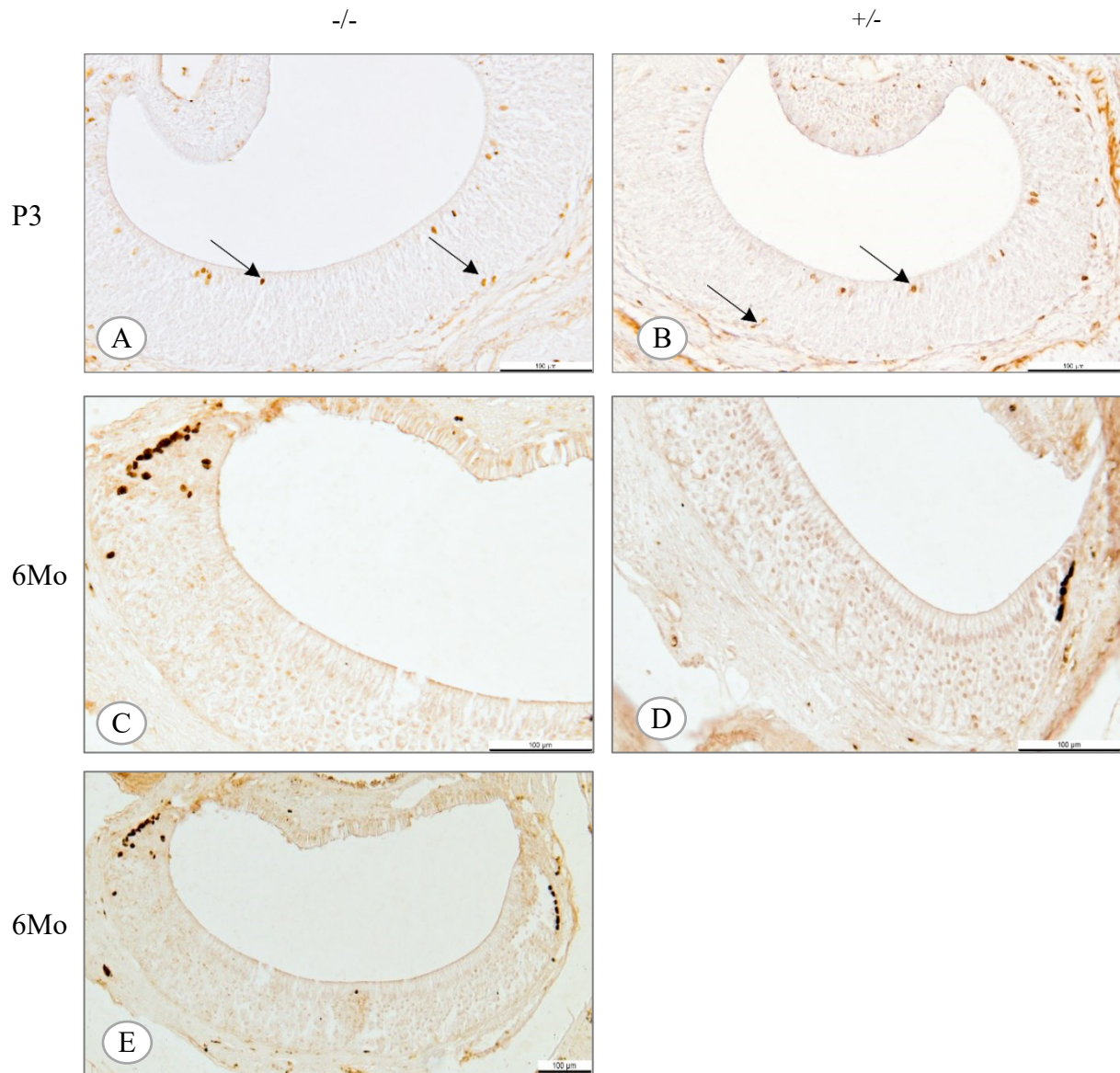


Abbildung 27: Frontalschnitt durch das VNO. BrdU-Nachweis. A: P3 $HD^{-/-}$, BrdU-positive Zellen sind exemplarisch jeweils mit einem Pfeil markiert. **B:** P3 $HD^{+/-}$, BrdU-positive Zellen sind exemplarisch jeweils mit einem Pfeil markiert. **C:** 6Mo $HD^{-/-}$. **D:** 6Mo $HD^{+/-}$. Alle Bilder mit Hämatoxylin-Gegenfärbung und 20-facher Vergrößerung. **E:** Übersichtsbild bei 6Mo $HD^{-/-}$ mit BrdU-reaktiven Zellen im lateralen Kompartiment. 10-fache Vergrößerung und Hämatoxylin-Gegenfärbung. Maßstab: 100µm

Die BrdU-positiven Zellen im VNE von den Dreitagestieren zeigen keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,485$). Für die Kontrollgruppe konnte ein Mittelwert von 149.775 Zellen/mm³ (± 9.850) ermittelt werden. Die $HD^{+/-}$ -Ratten hatten hier mit $M = 135.556$ Zellen/mm³ (± 9.166) ähnliche Ergebnisse (s. Abbildung 28, S. 43).

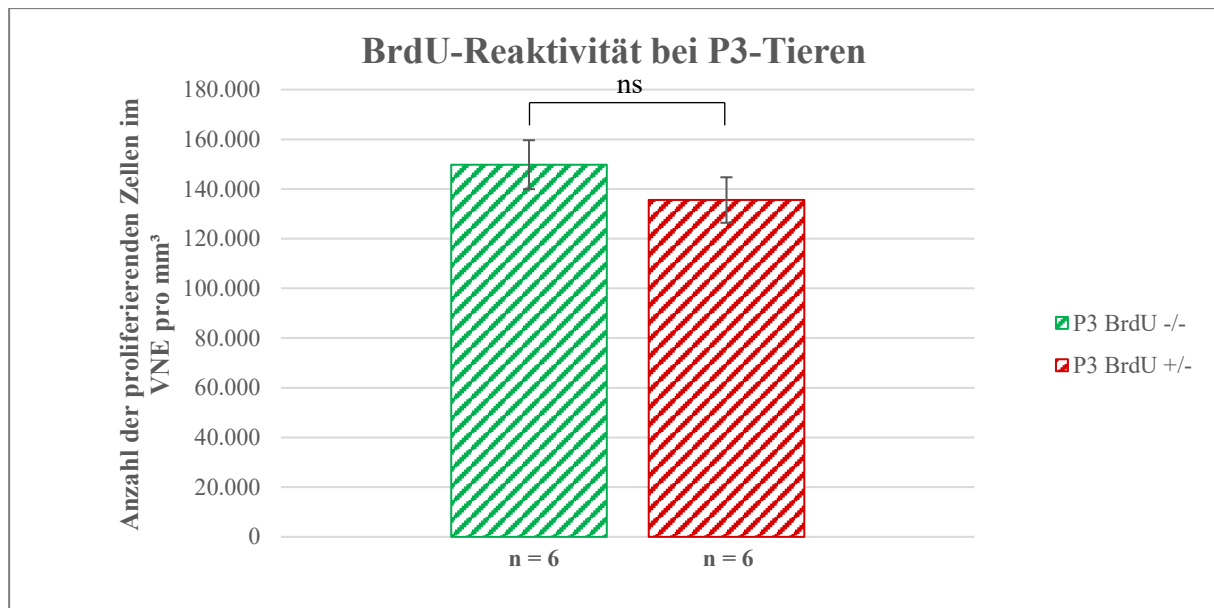


Abbildung 28: Vergleich der BrdU-positiven Zellen im VNE zwischen P3 $HD^{-/-}$ und P3 $HD^{+/-}$. Kein signifikanter Unterschied ($p = 0,485$). $n = 6$ je Kohorte.

Bei einem Tier in der 6-Monatswildtypgruppe war keine BrdU-positive Zelle in die stereologischen Zählrahmen eingeschlossen, sodass eine statistische Auswertung nicht möglich war. Dieses Tier wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Der Mittelwert der 6-Monatswildtypen betrug, bei einer Stichprobenanzahl von fünf, 170.748 Zellen/mm³ (± 91.266). Die $HD^{+/-}$ -Tiere hatten im Mittel 97.772 Zellen/mm³ (± 53.528). Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich bei einem $p = 0,662$ jedoch kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate (s. Abbildung 29, S. 43).

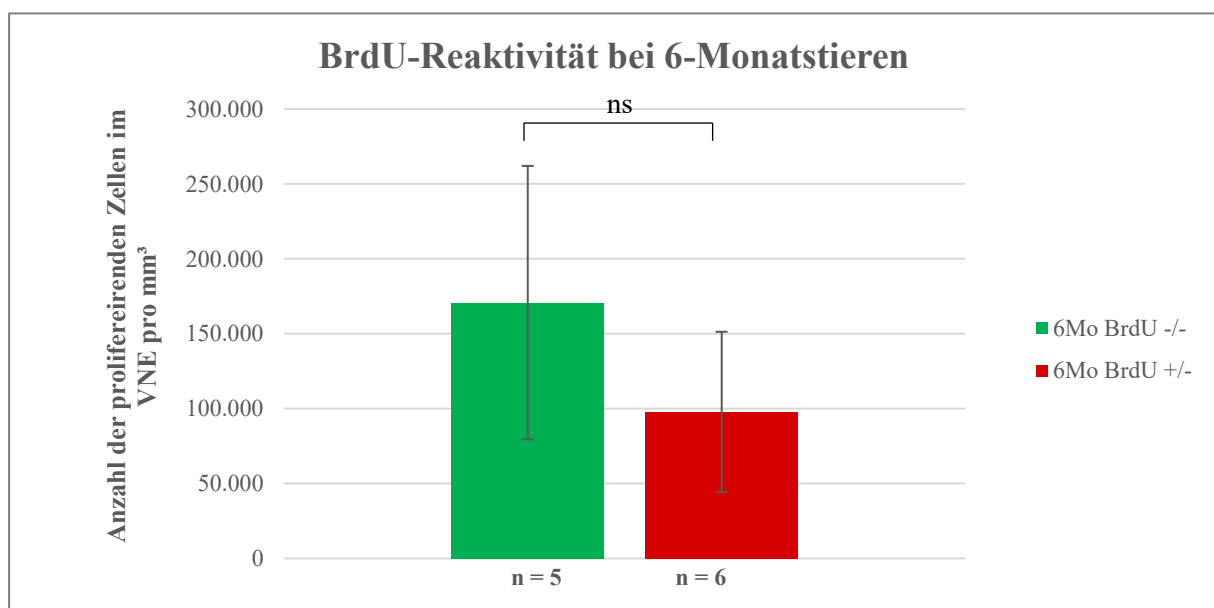


Abbildung 29: Vergleich der BrdU-positiven Zellen im VNE der 6-Monatstiere zwischen $HD^{-/-}$ und $HD^{+/-}$. Kein signifikanter Unterschied ($p = 0,662$). $n (HD^{-/-}) = 5$; $n (HD^{+/-}) = 6$

Für alle Kohorten war der Vergleich der Genotypen nicht signifikant. Das Signifikanzniveau der Kontrollgruppen lag bei $p = 0,662$, wohingegen für die transgenen Ratten der p-Wert von $0,065$ knapp über dem Signifikanzniveau lag (s. Abbildung 30, S. 44).

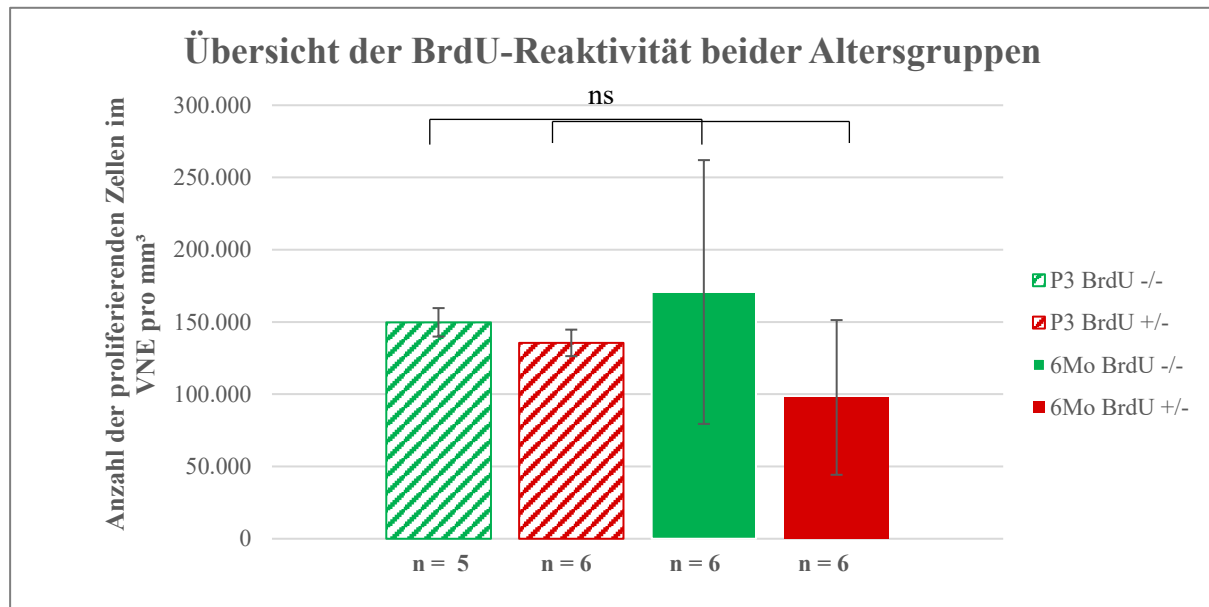


Abbildung 30: Übersicht BrdU: P3- und 6-Monatstiere mit Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwertes und Signifikanzen

3.2.2.3 Aktivierte Caspase-3 (akt. Caspase-3)

Mit der Immunhistochemie von akt. Caspase-3 als Apoptosemarker sollte untersucht werden, ob es zu vermehrtem Zelluntergang bei genotypischen Veränderungen kommt. Es wurden nur die älteren Tiere betrachtet, da eine ergänzende Immunhistochemie bei den Jungtieren im Nachhinein nicht mehr möglich war.

Das Muster der wenigen akt. Caspase-3-Zellen im VNE unterschied sich bei den Huntington-Ratten nicht von den Wildtypen (s. Abbildung 31, S. 45). Bei beiden Kohorten schien es so, als ob die Zellen von lateral nach medial migrieren. Der größte Anteil der apoptotischen Zellen war immer im lateralen Segment, am Übergang zum nicht-sensorischen Epithel, zu erkennen.

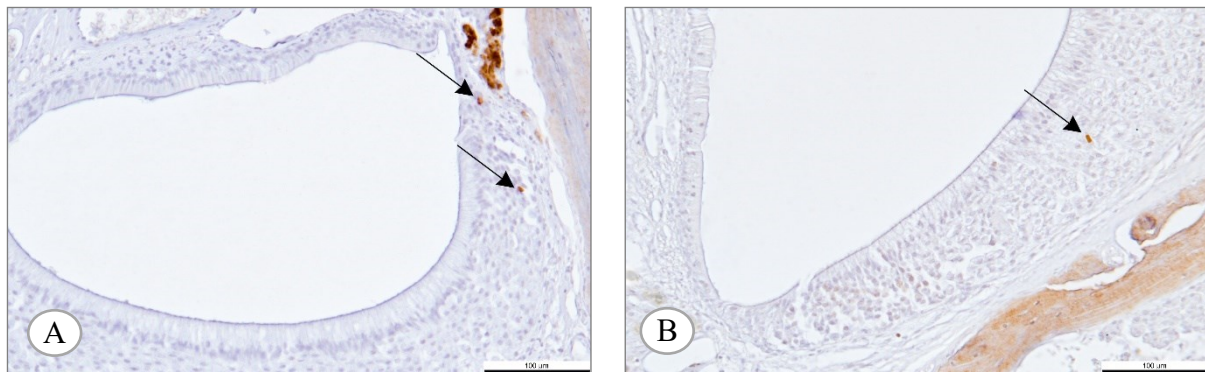


Abbildung 31: Frontalschnitt durch das VNO. akt. Caspase-3-Nachweis. **A:** 6Mo HD^{-/-}. **B:** 6Mo HD^{+/-}. akt. Caspase-3 reaktive Zellen sind jeweils mit einem Pfeil markiert. Mit Hämatoxylin-Gegenfärbung und 20-facher Vergrößerung. Maßstab: 100 µm

Die Summenanalyse der Apoptosezellen im VNE ergab zwischen den HD^{-/-} und HD^{+/-}-Ratten ($p = 0,937$) keinen signifikanten Unterschied. Der Mittelwert für die Wildtypen der 6-Monatstiere betrug 25 Zellen pro Tier (± 5). Höhere Werte ergaben sich bei den transgenen Tieren mit einem Durchschnitt von 32,5 Zellen/Tier (± 12) (s. Abbildung 32, S. 45). Die hohe SEM begründete sich durch ein transgenes Tier, welches mit einer Gesamtzahl von 92 gezählten Zellen einen Ausreißer darstellte. Um die Stichprobenanzahl identisch zu halten, wurde das Tier in der Auswertung belassen.

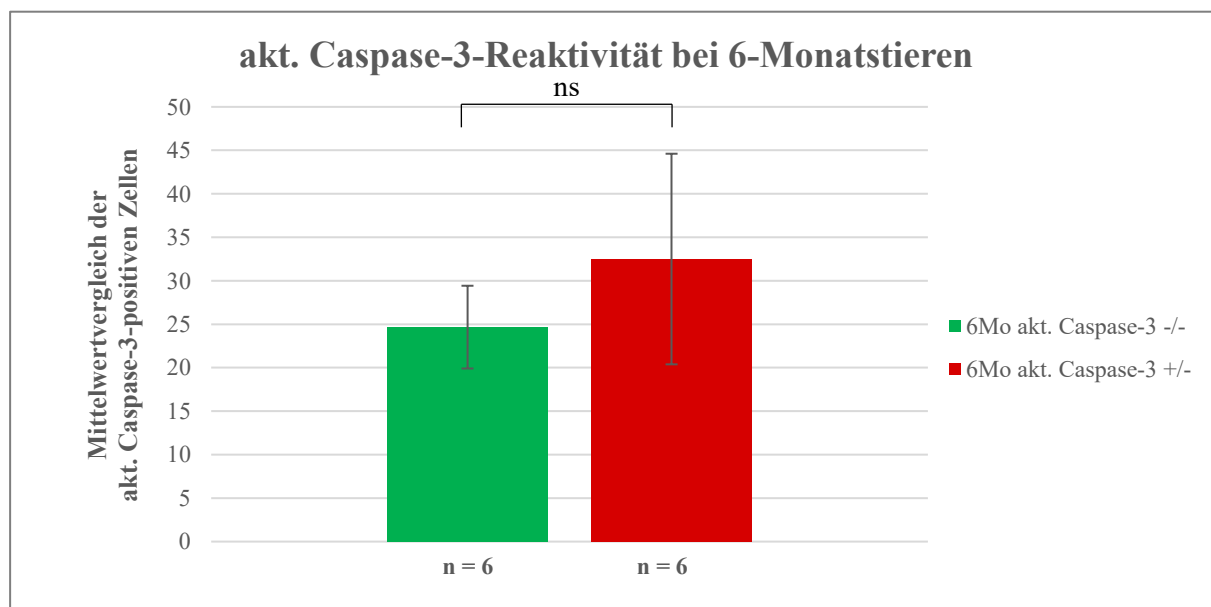


Abbildung 32: Vergleich der Mittelwerte von akt. Caspase-3 im VNE der 6-Monatstiere zwischen HD^{-/-} und HD^{+/-}. Kein signifikanter Unterschied $p = 0,937$. $n = 6$ pro Kohorte.

3.2.2.4 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)

Die PGP 9.5-Reaktivität stellt die Gesamtzahl der Neurone in verschiedenen Reifegraden dar (vgl. 2.6.2.4, S. 28). Ausgewertet wurden nur die 6-Monatstiere, wie in 2.7, S. 29 beschrieben. In Abbildung 33, S. 46 sind beide Altersgruppen dargestellt. Die Abbildung 33 A und B verdeutlichen das schwammige Bild der PGP 9.5 reaktiven Zellen, welche eine stereologische Quantifizierung der P3-Tiere unmöglich machte. Eine vermehrte Reaktion der Dendriten bis zum Lumen war erkennbar.

Die Verteilung der PGP 9.5-markierten Zellen veränderte sich von rostral nach okzipital. Die Neurone proliferierten in den ersten Anschnitten hauptsächlich aus dem lateralen Segment horizontal Richtung Mitte (s. Abbildung 33 C, S. 46). Mit wachsender Distanz zum primären Schnitt wurde die Verteilung der Zellen mit der Beteiligung beider Segmente im Epithel homogener (s. Abbildung 33 D, S. 46). Bei fast jedem Tier waren ergänzend vereinzelt PGP 9.5-positive Zellen in der Stützzellschicht zu finden. Ein qualitativer Unterschied zwischen den Genotypen war nicht festzustellen.

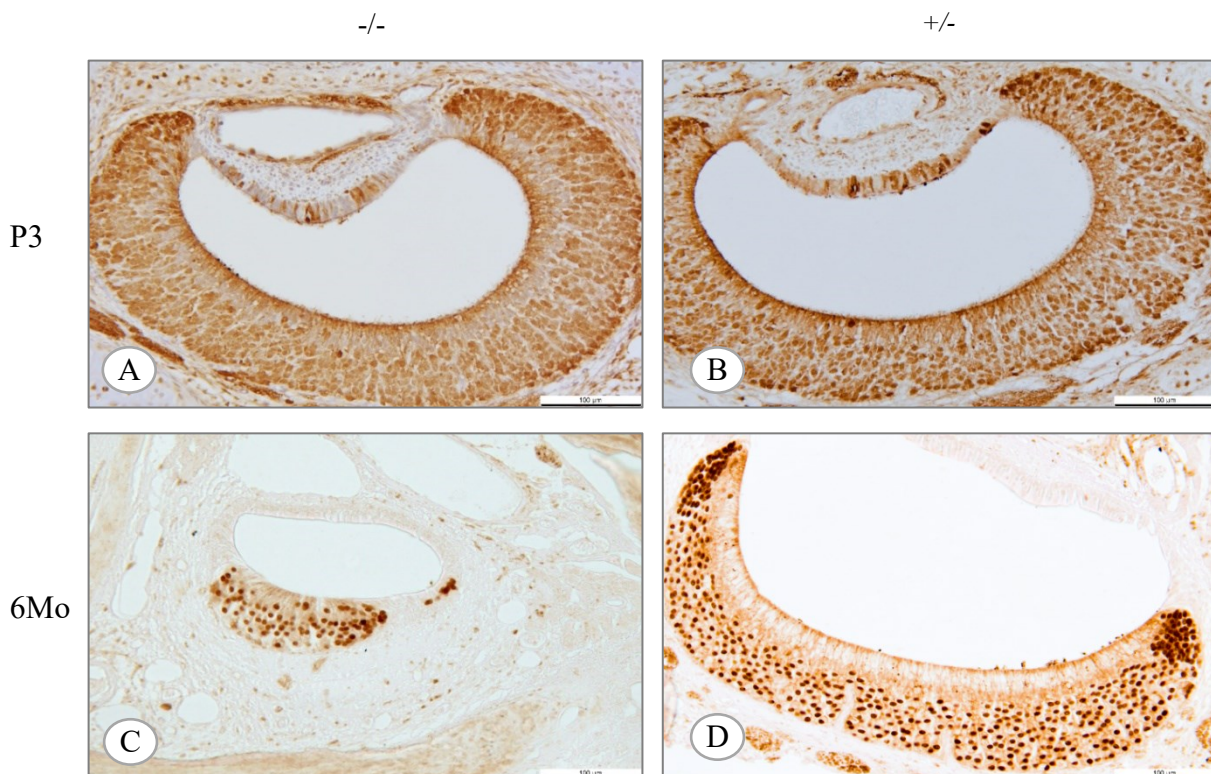


Abbildung 33: Frontalschnitt durch das VNO. PGP 9.5-Nachweis. **A:** P3 $HD^{-/-}$. **B:** P3 $HD^{+/-}$. **C:** 6Mo $HD^{-/-}$. **D:** 6Mo $HD^{+/-}$. Alle Bilder ohne HE- Gegenfärbung und in 20-facher Vergrößerung. Maßstab: 100 μm

Im Vergleich der Mittelwerte zeigte der Wildtyp eine deutlich geringere Zellzahl an PGP 9.5-positiven Zellen mit 6.887.526 Zellen/mm³ (\pm 4.200.952). Im Gegensatz dazu wurden bei den transgenen Ratten 12.412.336 Zellen/mm³ (\pm 7.436.885) ausgezählt. Die älteren Tiere wiesen, trotz der erhöhten Zellzahl, keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Jungtieren auf ($p = 0,485$) (s. Abbildung 34, S. 47).

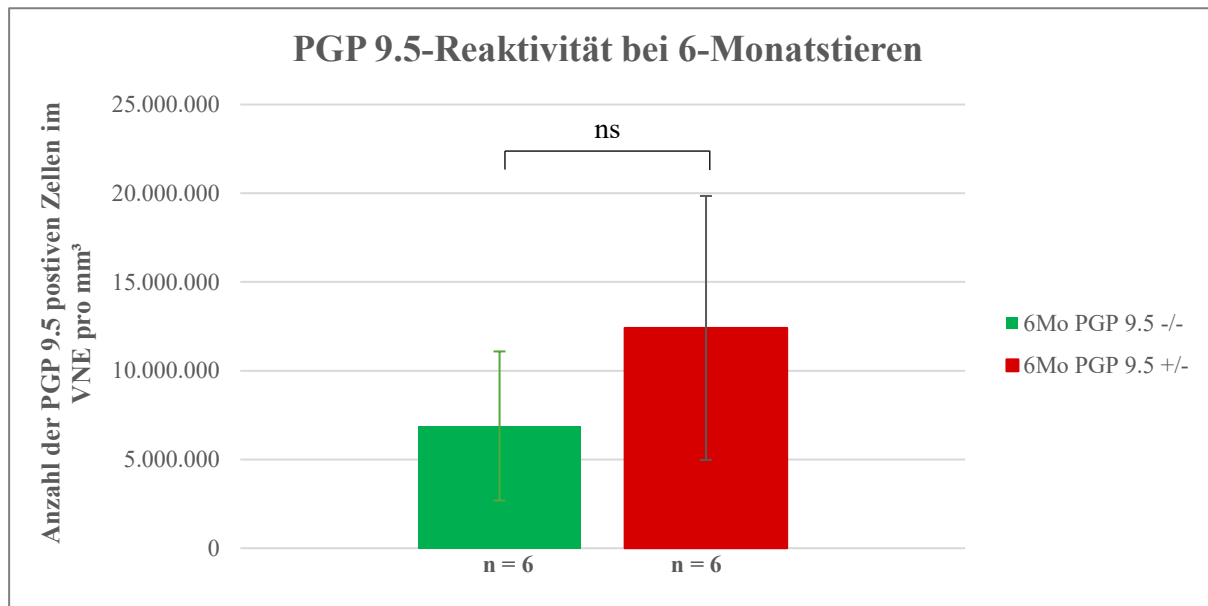


Abbildung 34: Vergleich der PGP 9.5-positiven Zellen im VNE der 6-Monatstiere zwischen $HD^{-/-}$ und $HD^{+/-}$. Kein signifikanter Unterschied ($p = 0,485$). $n = 6$ pro Gruppe

3.2.2.5 Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1)

Die Immunhistochemie mit anti-Iba1 stellt im Allgemeinen Makrophagen/Mikroglia dar (vgl. 2.6.2.5, S. 28). In diesen Versuchen sollte ermittelt werden, ob Iba1-positive Zellen im VNE nachgewiesen werden können und wie sich die Mutation der BACHD-Ratten und das unterschiedliche Alter auf die Zellzahl auswirkt.

In den beiden Altersgruppen waren die wenigen Iba1-reaktiven Zellen über das gesamte VNE verteilt. Man konnte die Migration der Zellen von basal nach apikal und die Dendriten der Zellen durch die Gegenfärbung gut erkennen. Außerdem ließ sich die Stützzellschicht gut abgrenzen. Ein qualitativer Unterschied zwischen $HD^{-/-}$ - und $HD^{+/-}$ -Tieren war nicht zu erkennen.

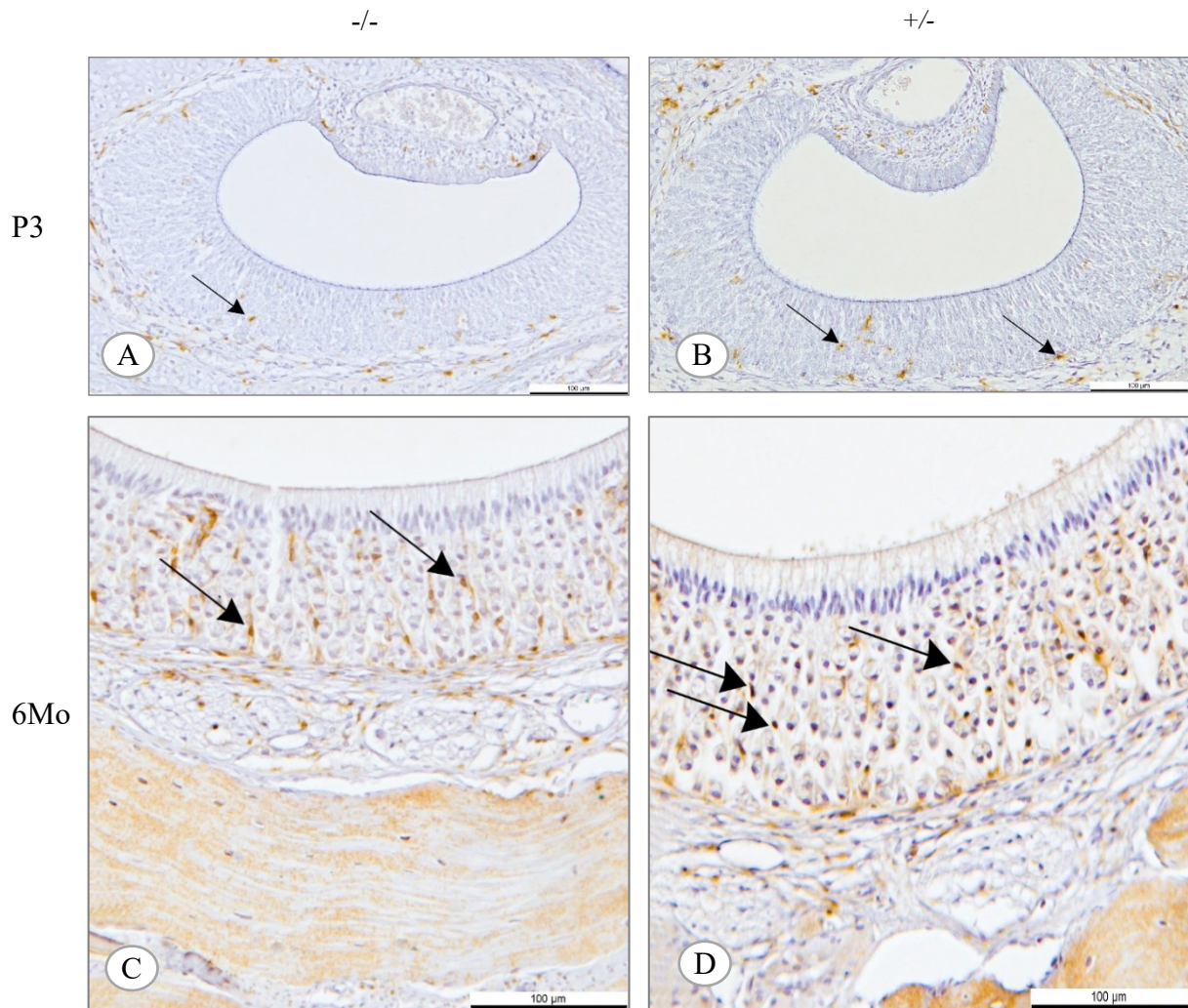


Abbildung 35: Frontalschnitt durch das VNO. Iba1-Nachweis. **A:** P3 HD^{-/-}. **B:** P3 HD^{+/-}. **C:** 6Mo HD^{-/-}. **D:** 6Mo HD^{+/-}. Iba1-reaktive Zellen sind exemplarisch jeweils mit einem Pfeil markiert. Alle Bilder mit Hämatoxylin-Gegenfärbung und 20-facher Vergrößerung. Maßstab: 100 μm

Durch die stereologische Auswertung konnte bei den Jungtieren ein signifikanter Unterschied ($p = 0,026$) gezeigt werden. Die HD^{-/-}-Ratten hatten im Durchschnitt 121.842 (± 6.253) Zellen pro mm³ VNE. Bei den HD^{+/-}-Tieren waren es nur 99.689 Zellen/mm³ (± 4.667) (s. Abbildung 36, S. 49).

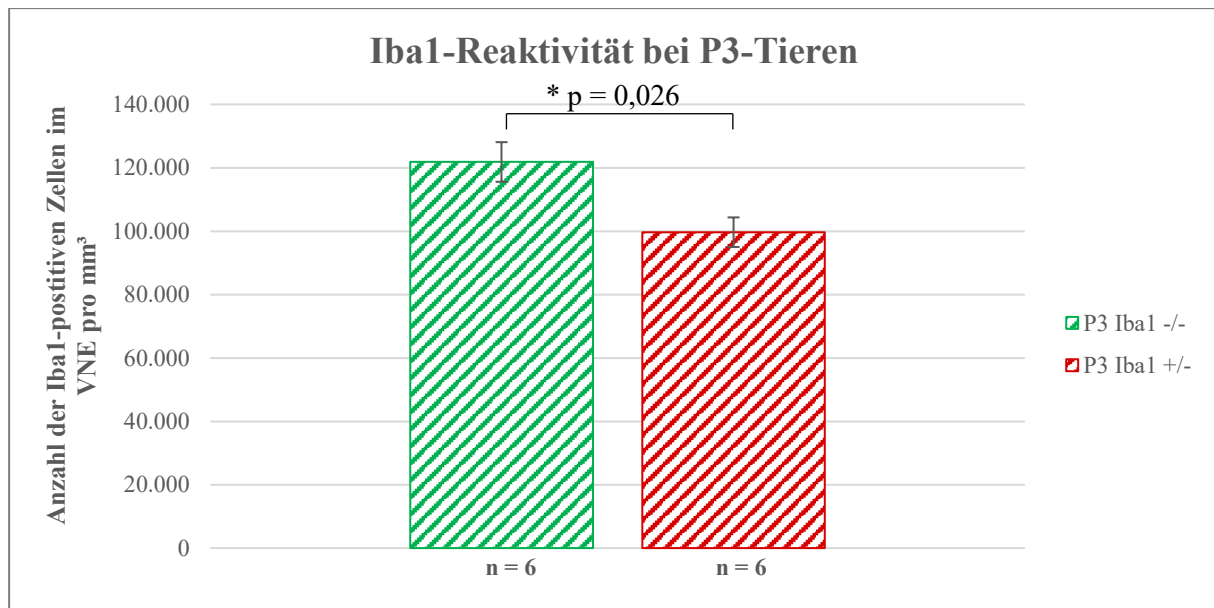


Abbildung 36: Vergleich der Iba1-positiven Zellen im VNE zwischen P3 HD^{-/-} und HD^{+/-}. Signifikanter Unterschied ($p = 0,026$). $n = 6$ pro Gruppe

Beim Wildtyp der 6-Monatsiere lag der Mittelwert bei 1.398.783 Zellen/mm³ (± 785.786), wohingegen die transgenen Tiere einen Mittelwert von 719.521 n/mm³ (± 348.271) präsentierten. Dieser Unterschied war laut Mann-Whitney-U-Test mit einem $p = 0,937$ nicht signifikant (s. Abbildung 37, S. 49).

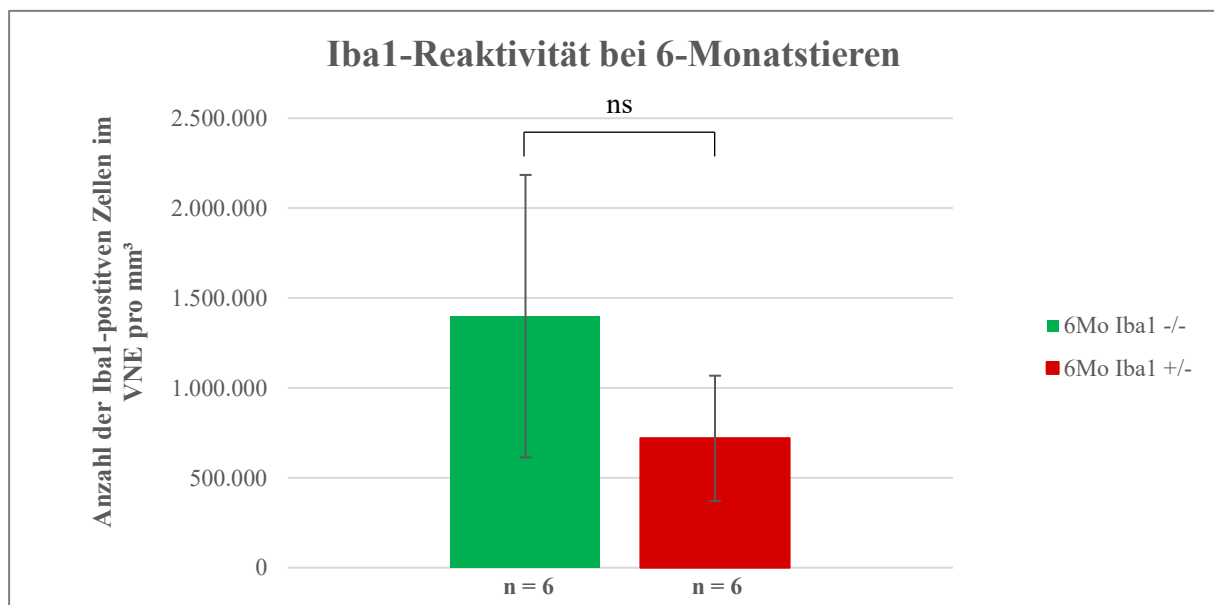


Abbildung 37: Vergleich der Iba1-positiven Zellen im VNE der 6-Monatsiere zwischen HD^{-/-} und HD^{+/-}. Kein signifikanter Unterschied $p = 0,937$. $n = 6$ pro Gruppe

Die unterschiedliche Expression von Makrophagen zwischen den Altersgruppen konnte in der Betrachtung aller Wildtypen ($p = 1,00$) und aller transgenen Tiere ($p = 0,093$) als nicht signifikant bewertet werden (s. Abbildung 38, S. 50).

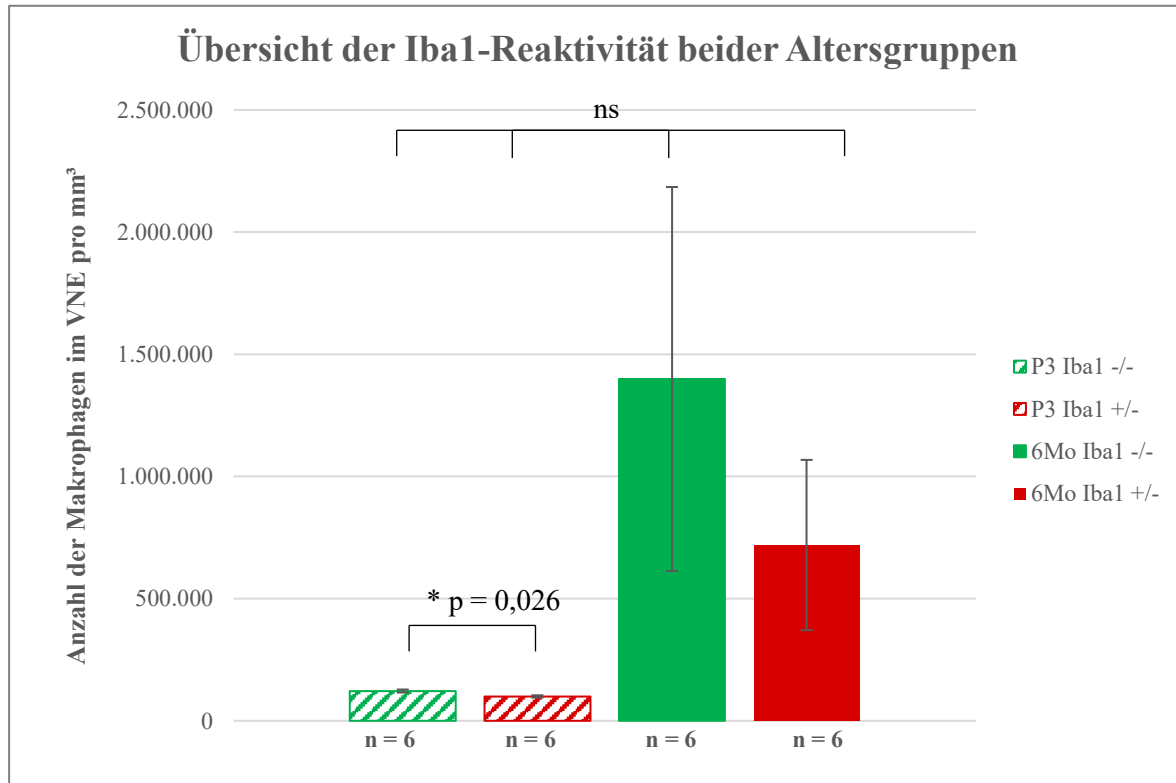


Abbildung 38: Übersicht Iba1: P3- und 6-Monatsiere mit Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwertes und Signifikanzen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurden die Auswirkungen von Morbus Huntington auf das vomeronasale Organ (VNO) untersucht. Hierfür wurden bacterial artificial chromosome huntington disease (BACHD)-Ratten der transgenen Linie 22 (TG22) verwendet und mit Wildtypen verglichen. Neben dem Vergleich des Körpergewichts erfolgte eine immunhistochemische Analyse des vomeronasalen Epithels (VNE). Die Reaktivität von Antikörper gegen das Olfactory marker protein (OMP), Antikörpern gegen das 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU), Antikörpern gegen die aktivierte Caspase-3 (akt. Caspase-3), Antikörpern gegen das Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) und Antikörpern gegen das Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) wurde anhand von Dreitagestieren (P3) und Sechsmonatstieren (6Mo) analysiert. Bei OMP konnten zwischen den Altersgruppen und bei Iba1 innerhalb der Jungtiergruppe signifikante Unterschiede festgestellt werden. Im Folgenden werden das Tiermodell, das Körpergewicht und die Ergebnisse der immunhistochemischen Reaktionen diskutiert.

4.1 Tiermodell

Morbus Huntington weist eine Prävalenz von 5,7 – 13,7 pro 100.000 Einwohner auf und ist bis heute eine unheilbare Erbkrankheit. Ursächlich ist eine CAG-Trinukleotid-repeat-Expansion im Huntingtin (HTT)-Gen auf Chromosom 4. Obwohl es in den letzten Jahren viele Fortschritte zum Verständnis der Krankheit gab, ist es bis heute nicht gelungen, einen verlässlichen kurativen Ansatz für diese Erkrankung zu finden (Pringsheim et al. 2012; McColgan und Tabrizi 2018).

Aus diesem Grund sind weitere Tierversuche notwendig, um den Pathomechanismus genauer zu verstehen und Heilungsmethoden zu entwickeln. Ratten werden schon seit vielen Jahrzehnten zur Erforschung verschiedener Krankheiten eingesetzt. Sie haben im Gegensatz zu Mäusen den Vorteil, dass sie robuster sind. Mit Ratten sind u. a. komplexere Verhaltenstests und ein Neuroimaging durchführbar (Hammer et al. 1990; von Hörsten et al. 2003; Liu et al. 2008). von Hörsten et al. entwickelten 2003 das erste Rattenmodell, welches die häufigste adulte, spät manifeste und langsam voranschreitende Form der Huntington-Krankheit am besten darstellt. Die Mausmodelle hatten den Nachteil, dass sie nur die juvenile, schnell progressive Form der Krankheit darstellten und mit ihnen keine Bildgebung durchgeführt werden konnte. Das Rattenmodell von von Hörsten et al. (2003) wurde von Yu-Taeger et al. (2012) weiterentwickelt. Im Gegensatz zu den 51 CAG-repeats konnten 97 CAG/CAA-repeats mit allen regulatorischen Elementen generiert werden. Damit stellen die BACHD-Ratten eine Spezies mit der vollen

Länge des mutierten Huntingtin (fl-mHTT) dar (vgl. 2.1, S. 19). Sie ermöglichen auf der molekularen und anatomischen Ebene und in den Verhaltensbereichen eine bessere Darstellung des humanen Krankheitsbildes. In der Literatur sind Versuchsreihen mit BACHD-Mäusen (Abada et al. 2013; Gray et al. 2008) und BACHD-Ratten der transgenen Linie 5 (TG5) (Clemensson et al. 2017; Manfré et al. 2016; Novati et al. 2018; Yu-Taeger et al. 2012; Yu-Taeger et al. 2017; Novati et al. 2020) und der transgenen Linie 9 (TG9) (Yu-Taeger et al. 2017; Lessard-Beaudoin et al. 2019) beschrieben. Sie werden hauptsächlich genutzt, da sie in der Western-Blot-Analyse hohe mRNA-Expression für mutiertes HTT aufweisen (vgl. Abbildung 12, S. 20). Die mHTT-Expression der TG22 ist laut Abbildung 12, S. 20 vergleichbar zur TG9 und wurde der Universitätsmedizin Rostock in Kooperation mit der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. In der Versuchsreihe von Yu-Taeger et al. (2012) wurde die Expression von mHTT im Bulbus olfactorius illustriert. Sie ist bei der Linie TG5 reduziert und bei TG9 erhöht. Das vomeronasale Organ ist nicht untersucht worden. Weiterhin gibt es zur TG22 der BACHD-Ratten bis jetzt noch keine Publikationen. Plotkin und Surmeier (2015) kritisierten, dass das BACHD-Modell keine frühe hyperkinetische Phase zeigt. Da diese Phase ein sensitiver Prädiktor beim Menschen ist, würden schneller fortschreitende Modelle wie CAG140 die menschliche Krankheitsentwicklung besser abbilden. Trotzdem ist das BACHD-Ratten- oder Mausmodell ein gängiges Modell, welches auch in aktuellen Studien als Grundlage dient (Nance 2017; Chang et al. 2015; Chakroborty et al. 2020; Novati et al. 2020). Chakroborty et al. (2020) postlierten in ihren Untersuchungen an der TG5 des BACHD-Rattenmodells, dass Phosphodiesterase-9A-Inhibitoren ein möglicher therapeutischer Ansatz sind, um die striatale Funktion wiederherzustellen und damit die motorischen und kognitiven Symptome zu lindern. Dies zeigt, dass das BACHD-Rattenmodell auch genutzt werden kann, um therapeutische Ansätze zu erforschen. Kurat et al. (2021) untersuchten erstmalig homozygote männliche und weibliche BACHD-Ratten. Obwohl weibliche homozygote BACHD-Ratten einen starken Phänotyp aufwiesen, wird von der weiteren experimentellen Verwendung abgeraten, da der Bruterfolg sehr gering ist. Die Ergebnisse der homozygoten Männchen waren ähnlich zu den hemizygoten Männchen. In der vorliegenden Studie und der zitierten Literatur zum BACHD-Rattenmodell wurden jeweils hemizygoten Männchen verwendet.

Zusammenfassend ist das BACHD-Rattenmodell nach heutigem Stand der Forschung ein gutes Tiermodell, um die Auswirkungen der Huntington-Krankheit auf den Menschen zu beurteilen. Weiterhin kann dieses Modell auch genutzt werden, um therapeutische Interventionen zu erforschen (Chakroborty et al. 2020). Jedoch gibt es unterschiedliche Ausprägungen und Formen der Krankheit, sodass eine direkte Übertragbarkeit auf alle betroffenen Menschen nicht möglich

ist (von Hörsten et al. 2003; McColgan und Tabrizi 2018). Die TG22 der BACHD-Ratten besitzt anhand der in Abschnitt 3 geschilderten Ergebnisse bei vorhandener Mutation keinen olfaktorischen Phänotyp. Zur Vergleichbarkeit der Linie wären Untersuchungen am Bulbus olfactorius aufschlussreich.

4.2 Körpergewicht

Mit dem Vergleich des Körpergewichts der Ratten sollte ein möglicher Unterschied zwischen Wildtyp ($HD^{-/-}$) und transgenen ($HD^{+/-}$) Ratten detektiert werden. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt. Diese Resultate decken sich mit den Erkenntnissen von Yu-Taeger et al. (2012), die in Tübingen alle 18 Rattenlinien (inklusive TG22) getestet hatten. Es konnte in keiner der in Tübingen getesteten Rattenlinien ein erhöhtes oder erniedrigtes Körpergewicht im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Bei den mutierten Ratten war aber ein erhöhter Körperfettanteil festgestellt worden. Die genaueren Untersuchungen an Linie TG5 ergaben ein reduziertes Organgewicht, welches keinen Einfluss auf das Gesamtgewicht besaß. Auffällig war, dass in vorangegangenen BACHD-Mausstudien die Mäuse an Körpergewicht zunahmten, was zum einen auf erhöhte Level an mHTT und zum anderen auf erhöhte Plasma IGF-1 Spiegel zurückgeführt wurde. Dabei sei das erhöhte Körpergewicht nicht mit einer erhöhten Nahrungszufuhr zu begründen. Es wird eine Zunahme des totalen Fettes und eine Zunahme der fettfreien Masse beschrieben (van Raamsdonk et al. 2006; Pouladi et al. 2012).

von Hörsten et al. (2003) stellten in ihren Versuchen ein um 20 % vermindertes Körpergewicht der transgenen Ratten im Vergleich zu ihren Wildtypartgenossen fest. Im Alter von 24 Monaten starben die transgenen Ratten oft an Muskelatrophie und Abmagerung. Diese Ergebnisse sind nur eingeschränkt auf die Ratten in den durchgeführten Versuchen übertragbar, da sie nur Fragmente des mHTT enthielten und kein fl-mHTT.

Jansson et al. (2014) stellten einen fettleibigen Phänotyp bei den transgenen BACHD-Ratten der TG5 fest. Interessanterweise war das Körpergewicht vergleichsweise ähnlich zu dem der Wildtypen. Dies wurde auf Entwicklungsrückstände wie reduzierte Körpergröße und verringerte Muskelmasse zurückgeführt. Außerdem persistierte der Phänotyp bei den mutierten Tieren, obwohl sie generell weniger Futter im Vergleich zu den Wildtypen konsumierten. Clemensson et al. (2017) äußerten in der Nachfolgestudie Bedenken an dem BACHD-Rattenmodell, da der metabolische Phänotyp der TG5 auch eine generell verminderte Motivation an der Bewältigung von Verhaltens-/Fütterungstests hervorrufen könnte. Durch mangelnde Motivation, erhöhte Leptinspiegel oder durch kognitive Einschränkungen, wie zum Beispiel Apathie

könnten die Ergebnisse beeinflusst werden. Clemensson et al. (2017) beobachteten, dass es bei Tieren im Alter von 17 – 19 Monaten keine Unterschiede im Körpergewicht, aber in der Körperzusammensetzung gab. Die Autoren beschrieben hohe Leptinspiegel und eine reduzierte Muskelmasse. Lamirault et al. (2020) stellten in ihren Untersuchungen einen altersabhängigen Effekt fest. Sie beobachteten bei den 18 Monate alten BACHD-Ratten der TG5 im Gegensatz zu den 4 und 12 Monate alten Ratten eine verminderte Nahrungsaufnahme. Als Grund führten sie ebenfalls die mangelnde Motivation, die Apathie oder auch die zunehmenden motorischen Einschränkungen an. Das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung wurden nicht untersucht. Eine genaue Erklärung für unterschiedliches Essverhalten und Motivationen ist weiterhin offen.

Für die Diskussion des Körpergewichts der Ratten ist abschließend festzuhalten, dass sich die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit der Literatur über BACHD-Ratten mit fl-mHTT decken. Es gibt keinen Unterschied im Körpergewicht zwischen der BACHD-Ratte und dem Wildtyp. Jedoch wird in Publikationen oft die unterschiedliche Körperzusammensetzung mit erhöhtem Körperfett erwähnt. Dazu kann an dieser Stelle keine Aussage getätigt werden, da nur das gesamte Körpergewicht und nicht die anteilige Zusammensetzung am Todestag bestimmt wurde.

4.3 Immunhistochemische Reaktionen im VNO

4.3.1 Olfactory marker protein (OMP)

Im vomeronasalen Epithel (VNE) wichen die Mittelwerte der untersuchten OMP-reaktiven Zellen innerhalb der beiden Altersgruppen nicht signifikant voneinander ab. Ein deutlicher Unterschied existierte allerdings zwischen den Altersgruppen (vgl. Abbildung 26, S. 41). Dies kann zum einen am natürlichen Wachstumsprozess liegen, zum anderen an einer neuroprotektiven Funktion. Der Reifungsprozess ist eine Erklärung die zunächst geringere Zellzahl bei den Jungtieren. Viele Neurone müssen erst reifen, um die volle Ausprägung, wie bei den 6-Monatstieren, zu erhalten. Auch in anderen Untersuchungen mit Ratten oder bei anderen Spezies wie z. B. Primaten ist das VNO schon von Geburt an vorhanden und es sind OMP-Reaktionen nachweisbar. Dort konnte bei einigen Arten festgestellt werden, dass die Markerexpression mit dem Alter steigt (Dennis et al. 2004; Kawagishi et al. 2014; Dennis et al. 2020). Dies korreliert mit den vorliegenden Resultaten. Eine andere Interpretation für die Zunahme der reifen Neurone ist die vermutete neuroprotektive Funktion des OMP (Weiler und Benali 2005). Die jungen reifen Neurone konkurrieren mit den älteren. Durch das steigende Alter und die Konfrontation mit der

Umwelt sind ebenso in dieser Studie erhöhte Zellzahlen zu finden. Farbman und Margolis (1980) zeigten in ihren Untersuchungen, dass bei Ratten die OMP-Expression am postnatalen Tag 4 (P4) beginnt und dann zunimmt. In der durchgeführten Studie war schon ein OMP-Nachweis am postnatalen Tag 3 (P3) sichtbar. Möglicherweise ist eine generelle Abnahme der OMP-Expression nachweisbar, wenn P4-Tiere mit 6-Monatstieren verglichen werden würden. Dieser Unterschied wäre dann auf degenerative Prozesse zurückzuführen.

In der Literatur wurde OMP schon vor 49 Jahren als Protein, welches von Perikaryen der neuronalen Chemorezeptoren synthetisiert wird und über axonalen Transport bis in den Bulbus olfactorius reicht, beschrieben (Margolis 1972). Im Tierversuch konnte festgestellt werden, dass OMP-null Mäuse olfaktorische Stimuli nicht oder nicht ausreichend verarbeiten können. Somit übernimmt OMP eine Rolle bei der Geruchserkennung (Buiakova et al. 1996; Albeanu et al. 2018). Wenn bei Morbus Huntington eine chemosensorische Störung vorliegt, würde man davon ausgehen, dass sich u. a. die Anzahl der reifen vomeronasalen Rezeptorneurone (VRN) reduziert. In den vorliegenden Ergebnissen war kein signifikanter Unterschied in der Neuronenzahl zwischen HD^{-/-} und HD^{+/-} feststellbar. Das bekräftigt die These, dass die TG22 der BACHD-Ratten keinen auffälligen olfaktorischen Phänotyp besitzt und sich deswegen kein Unterschied in der Zellzahl ergibt.

Interessanterweise konnten ergänzend im nicht-sensorischen Epithel der transgenen Tiere OMP-reaktive Zellen nachgewiesen werden. Wie in 2.6.2.1, S. 26 dargelegt, ist OMP nicht nur im olfaktorischen System zu finden. Rodewald et al. (2016) untersuchten das nicht-sensorische Epithel (NSE) im VNO. Das NSE besteht aus einer heterogenen Gruppe von Zellen. Vermutet wird eine zweite Art sensorischer Zellen. Die Annahme, dass andere sensorische Neurone, Flimmerepithelzellen und exokrine Zellen OMP exprimieren, kann auch hier eine Erklärung für die vereinzelte Anreicherung von OMP im NSE sein.

Vergleicht man die Ergebnisse mit dem rudimentären VNO des Menschen, galt das VNO beim Menschen bisher als OMP-negativ. Dies deutet darauf hin, dass das menschliche VNO im Gegensatz zu dem von Nagern oder anderen Säugetieren keine olfaktorische Ausprägung aufweist (Weiler et al. 1999a; Witt et al. 2002; Dennis et al. 2004; Weiler und Benali 2005; Witt und Hummel 2006). Aktuelle Studienergebnisse konnten OMP-Aktivität in Epithelzellen im unteren Bereich des Septum nasi bei Erwachsenen nachweisen. Die genaue Funktion bleibt damit weiter unklar, bekräftigt jedoch die Idee der möglichen intrinsischen OMP-Expression der Nasenschleimhaut (Gebhart et al. 2019).

4.3.2 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)

Die Anzahl der proliferierenden Zellen im VNE zwischen HD^{-/-} und HD^{+/-} war nicht different. Beide Altersgruppen wiesen ähnliche Zellzahlen auf, sodass die Proliferationsrate mit dem Alter nicht abnahm und die Transgenität keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der vomeronasalen Rezeptorneurone besaß. Im lateralen Kompartiment des VNE befindet sich die Proliferationszone, weswegen sich dort besonders viele BrdU-positive Zellen befinden (Barber und Raisman 1978a; Weiler et al. 1999b; Weiler und Benali 2005). Vergleicht man das Verteilungsmuster der P3-Tiere mit den 6-Monatstieren (s. Abbildung 27 E, S. 42) fällt auf, dass bei den Jungtieren die Zellen basal und apikal über das ganze VNE verteilt waren. In der Entwicklung des VNE sind Neurone in der apikalen und der basalen Zone zu finden. Diese Beobachtung wird durch verschiedene Forschungsergebnisse bekräftigt (Cuschieri und Bannister 1975; Weiler et al. 1999b). Die 6-Monatstiere wiesen fast ausschließlich Zellen am Übergang zum NSE auf. Weiler et al. (1999b) kamen bei ihren Untersuchungen zu denselben Erkenntnissen und sahen die vereinzelt Zellen im medialen/zentralen Teil des VNE als Ersatzpool. Anders als in den hier durchgeführten Tierversuchen konnten sie ab der Geburt der Ratten eine abnehmende Neuronendichte beobachten, welche bei erwachsenen Tieren (ab dem zweiten Lebensmonat) konstant blieb. Als eine mögliche Begründung wird der Nachweis von apoptotischen Zellen gesehen, die zum Schutz der bestehenden Neurone bei unreifen Neuronen den Zelltod einleiten (Weiler et al. 1999b). Die Auswertung der Zellzahlen ist aber nur bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation vergleichbar, da die Daten von Weiler et al. (1999b) nicht stereologisch ausgewertet wurden. Jeder Zellkern wurde dort einzeln unter dem Mikroskop gezählt. Dieses Vorgehen macht die Methode fehleranfälliger. Es sind verschiedene Erklärungen für die konstante Neuronendichte möglich. Eine Theorie wäre, dass die Neuronenexpression über die Entwicklungsphasen des VNO konstant bleibt. Dieser Theorie widersprechen die Erkenntnisse aus Publikationen, in denen meist von einer reduzierten Proliferationsrate in erwachsenen Tieren die Rede ist (Weiler et al. 1999b; Honda et al. 2009). Das VNE verfügt im Gegensatz zum main olfactory epithelium (MOE) über einen geringeren zellulären Turnover (Barber und Raisman 1978b). Witt et al. (2018) fanden jedoch in einem Tiermodell für eine Lipidspeichererkrankung (Niemann-Pick-Erkrankung Typ C1, NPC1) eine Erhöhung der BrdU-Expression im VNE im Vergleich zum Wildtyp um über 200 %. Das VNO wurde in der durchgeführten Dissertation als ein Organ mit hohem Zellturnover und Regenerationspotential gesehen. Die Frage ist, ob die BrdU-positiven Zellen immer reifende Neurone darstellen oder ob sie im lateralen Kompartiment als pluripotente Vorläuferzellen betrachtet werden können,

aus denen sich ebenfalls (epitheliale) Stützzellen entwickeln (Barber und Raisman 1978b; Weiler et al. 1999b). Ein erhöhter Anteil an Stützzellen wäre eine Ursache für eine sinkende Anzahl der Neuronen mit fortschreitendem Alter. Diese sinkende Neuronenanzahl liegt allerdings im MOE nicht vor. Zusätzlich reduziert sich der Anteil an Stützzellen postnatal (Weiler und Farbman 1998b, 1998a). Weiler und Farbman (1998a) schilderten eine altersabhängige Reduktion der Basalzellen und Stützzellen. Grund hierfür ist das Wachstum des Epithels bei konstanter Zellzahl. Als Erklärung wird von einer längeren Lebensdauer der sensorischen Neurone bei erwachsenen Tieren ausgegangen, sodass insgesamt weniger neue Zellen produziert werden müssen und somit weniger proliferierende Zellen notwendig sind. Weiler et al. (1999b) benannten einen weiteren interessanten Aspekt. In dem lateralen Kompartiment findet verstärkt Apoptose statt, sodass von den unreifen Neuronen nur wenige ausreifen. Die Ergebnisse der vorliegenden Forschungsarbeit bestätigen eine erhöhte Apoptoserate am Übergang zum NSE (vgl. 3.2.2.3, S. 44). Wenn man die BrdU-Immunreaktivität mit der OMP-Reaktivität (Verhältnis unreifer zu reifen Neuronen) vergleicht, findet sich bei den 6-Monatstieren eine erhöhte Anzahl an reifen VRN. Dies könnte die These widerlegen, dass mit steigendem Alter verstärkt unreife Neurone abgebaut werden. Jedoch ist festzuhalten, dass sich aus BrdU-reaktiven Progenitorzellen auch epitheliale Stützzellen entwickeln, die bei der BrdU-Markierung nicht getrennt erfasst wurden. Um den Sachverhalt abschließend zu klären, sind weitere Untersuchungen mit erhöhter Stichprobenanzahl essenziell. Publikationen, die den Einfluss von Morbus Huntington auf das VNO beleuchten, sind bisher nicht veröffentlicht. In dieser Studie konnte zwischen den BrdU-immunreaktiven Zellen der Wildtypen und der transgenen Tiere kein Unterschied festgestellt werden.

4.3.3 Aktivierte Caspase-3 (akt. Caspase-3)

Ein signifikanter Unterschied in der akt. Caspase-3-Expression im VNE von HD^{-/-} und HD^{+/-} 6-Monatstieren wurde in dieser Studie nicht festgestellt. Die vorliegenden Experimente beleuchteten zum ersten Mal die akt. Caspase-3-Reaktion im VNE bei Ratten. In den durchgeführten Untersuchungen sind absolute Zellzahlen miteinander verglichen worden. Diese Zellzahlen belegen akt. Caspase-3-Aktivität im VNE bei HD^{-/-} und HD^{+/-}-Tieren. Eine Korrelation zwischen mutiertem Huntingtin und gesteigerter Apoptoserate wurde nicht aufgezeigt. Die Hypothese, dass die TG22 keinen olfaktorischen Phänotyp besitzt, kann auch hier eine Erklärung für die Ergebnisse sein. Es ist bekannt, dass Caspasen einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung und -entwicklung von Morbus Huntington haben. Das Huntingtin ist ein spezifisches Substrat von Caspase-3 und durch eine Spaltung wird wahrscheinlich seine anti-apoptotischen Funktionen

deaktiviert und/oder es entstehen toxische Produkte. Es kommt zur stärkeren phänotypischen Ausprägung der Krankheit (Goldberg et al. 1996). Das Huntingtin beinhaltet mehrere Prädiaktionsstellen am N-Terminus für eine Caspase-3 bedingte Kürzung (Wellington et al. 1998; Wellington et al. 2000; Wellington et al. 2002). Morbus Huntington ist nicht die einzige neurodegenerative Krankheit, bei der Caspase-3 am Pathomechanismus beteiligt ist. Bei sechs anderen Erkrankungen, die durch eine CAG-Expansion ausgelöst werden, wie z. B. das Ataxin-3 der spinocerebellären Ataxie, konnten *in vitro* Caspase-Substrate nachgewiesen werden (Wellington et al. 1998). Darüber hinaus wurde bei Niemann-Pick Typ C1 von Meyer et al. (2018) eine erhöhte akt. Caspase-3-Aktivität bei den erkrankten Tieren im Bulbus olfactorius aufgezeigt. Eine experimentelle Untersuchung aus Tübingen von Lessard-Beaudoin et al. (2019) an BACHD-Ratten der TG5 und TG9 im Alter von drei bis zwölf Monaten charakterisierte eine erhöhte Caspase-3-Aktivität im Bulbus olfactorius. Einige mRNA und protein level waren inkonsistent, jedoch sahen die Autoren in den Ergebnissen eine Bestätigung für die Beteiligung von Caspasen an der olfaktorischen Dysfunktion bei Morbus Huntington. Da in dieser Forschungsarbeit nur wenige akt. Caspase-3-positive Zellen im VNE gefunden wurden, kann man davon ausgehen, dass akt. Caspase-3 in dem verwendeten Tiermodell in diesem Bereich des VNO keine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Morbus Huntington spielt. In unveröffentlichten Untersuchungen unserer Forschungsgruppe konnte akt. Caspase-3 in der Riechschleimhaut der hier verwendeten Tiere detektiert werden. Es war dort eine Tendenz, jedoch kein signifikanter Unterschied, mit vermehrter Zellzahl zugunsten der transgenen Tiere darstellbar.

Interessanterweise ergaben *in vivo* Untersuchungen am transgenetischen Yeast artificial chromosome (YAC)-Mausmodell für Morbus Huntington an menschlichen HD-Gehirnproben von Wellington et al. (2002), dass auch bei Wildtypen Caspase-3-Aktivität nachgewiesen wurde. Dies führte zur Annahme, dass Caspase-Spaltungsprozesse zum normalen katabolen Stoffwechsel gehören. Das deckt sich mit den vorliegenden Resultaten, die gleichermaßen eine akt. Caspase-3-Aktivität bei den Wildtypratten belegen. Bei Lessard-Beaudoin et al. (2019) ergaben sich im zusätzlich untersuchten Gewicht des Bulbus olfactorius Unterschiede zwischen der TG5 und der TG9 der BACHD-Ratten. Das ist ein Hinweis dafür, dass sich die transgenen Linien unterschiedlich verhalten. Daraus kann geschlossen werden, dass entweder die TG22 oder der untersuchte Bereich im VNE eine Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse sein können, die der gängigen Forschungsmeinung widersprechen.

Der Therapieansatz der Inhibierung der Caspase-3-Aktivität, wie in anderen Studien beschrieben (Wellington et al. 1998; Wellington et al. 2000; Hermel et al. 2004), scheint anhand der vorliegenden Daten nicht sinnvoll, da akt. Caspase-3 eine zu geringe Ausprägung aufweist.

4.3.4 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)

Die PGP 9.5-Reaktivität im VNE kann aufgrund von der in 3.2.2.4, S. 46 beschriebenen Probleme der Immunhistochemie nur bei den 6-Monatstieren statistisch beurteilt werden. Die transgenen älteren Tiere präsentierten im VNE nur tendenziell doppelt so viele PGP 9.5-positive Zellen wie der Wildtyp. Ein Grund für die fehlende Signifikanz kann die geringe Stichprobenanzahl sein. PGP 9.5 ist ein früher Marker für unreife und reife Neurone (Wilson et al. 1988; Schofield et al. 1995; Trowern et al. 1996). Der Anteil der reifen Neuronen an der Gesamtzahl lässt sich daraus nicht bestimmen. Somit besaßen die HD^{+/-}-Ratten tendenziell eine höhere Dichte an VRN. Anhand der Daten muss davon ausgegangen werden, dass Wildtypen und transgene Tiere eine gleich hohe Neuronendichte im VNE aufweisen. Das führt zu dem Schluss, dass es bei manifester Ausprägung von Morbus Huntington im Alter von sechs Monaten in dieser TG22 keine signifikante Erhöhung der Neuronendichte gibt und damit wahrscheinlich keine veränderte olfaktorische Aktivität. Die Literaturrecherche ergab folgende Schlussfolgerung: zu dem PGP 9.5-Verhalten im VNO bei Ratten gibt es aktuell noch keine Vergleichsstudien. Andere Spezies wurden allerdings in den vergangenen Jahren untersucht. Forschungen am VNO von verschiedenen Primaten ergaben, abhängig von der Primaten-Art, unterschiedliche Verteilungsmuster von PGP 9.5 im VNO. Tendenziell wurden die Zellkerne im basalen Kompartiment beobachtet, aber es konnten zudem Zellkerne in der Stützzellschicht dargestellt werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den hier dargestellten Ergebnissen. Im Vergleich zu OMP konnte PGP 9.5 auch bei neonatalen Primaten nachgewiesen werden (Dennis et al. 2004). Daraus kann geschlossen werden, dass bei Jungtieren noch vermehrt unreife Neurone vorhanden sind. PGP 9.5 ist mit Ubiquitin Teil des Zellmetabolismus. Das genaue Expressionsmuster ist jedoch unbekannt, da PGP 9.5 während der gesamten Lebenszeit eines Tieres exprimiert wird. Deswegen ist es schwierig, von der PGP 9.5-Reaktivität Informationen über die Zellentwicklung abzuleiten (Dennis et al. 2004). PGP 9.5 wird in verschiedenen Publikationen als pan-neuronaler Marker definiert (Thompson et al. 1983; Weiler und Benali 2005). Wie von Weiler und Benali (2005) bereits geschildert, können auch bei den hier verwendeten Ratten die Dendriten im VNE bis zur Oberfläche verfolgt werden (vgl. Abbildung 33 A und B, S. 46). Weiler und Benali (2005) illustrierten eine zytoplasmatische Reaktion der apikalen Neurone im Vergleich zu der nukleären Reaktion der basalen Neurone. Bei den untersuchten P3-Tieren war

dies in gleicher Weise zu beobachten. Die erhöhte Zelldichte im lateralen Kompartiment erklärt sich durch die Proliferationszonen im VNE und ist ein Zeichen für unreife Neurone (Weiler et al. 1999b). Wie schon in anderen Tierversuchen bestätigt, verteilt sich das PGP 9.5-Muster über alle Epithelschichten (Oikawa et al. 2001; Dennis et al. 2004; Weiler und Benali 2005).

In der durchgeführten Versuchsreihe konnten vereinzelt in jedem Tier PGP 9.5-reaktive Zellen in der Stützzellschicht des VNE nachgewiesen werden. Es könnte sich um migrierende Neurone oder tatsächlich um PGP 9.5-positive Stützzellen handeln. Eine solche Reaktivität ist bis jetzt im VNE nicht beobachtet worden (Dennis et al. 2004; Weiler und Benali 2005).

Beim Menschen konnte PGP 9.5 in unterschiedlichen Teilen des respiratorischen Epithels aufgezeigt werden (Johnson et al. 1997). Im VNE wurde in wenigen Proben beim Embryo eine PGP 9.5-Immunreaktivität belegt (Witt et al. 2002). Beim Erwachsenen konnte in späteren Untersuchungen vereinzelt eine PGP 9.5-Reaktivität in bipolaren Zellen dargestellt werden, die aber den respiratorischen Epithelzellen ähnelten. Daraus konnte eine neuroendokrine Funktion abgeleitet werden, jedoch ist eine chemosensorische Funktion, wie sie bei Ratten nachgewiesen werden kann, unwahrscheinlich (Witt und Hummel 2006).

4.3.5 Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1)

Aktivierte Mikroglia/Makrophagen, welche durch Iba1 angezeigt werden, sind bekannt dafür, auf Umwelteinflüsse zu reagieren. Diese Reaktion kann in Form von Reparaturprozessen oder als Teil der Pathogenese von neurologischen Krankheiten geschehen (McGeer et al. 1988; Haga et al. 1989; Morioka et al. 1992; Ito et al. 1998). Doty (2008) stellt eine ‚Olfactory vector‘ Hypothese auf, bei der Xenobiotika (Viren, Bakterien, Toxine, etc.) über die olfaktorische Leitungsbahn zum zentralen Nervensystem gelangen und dort neurodegenerative Krankheiten auslösen, die klinisch mit einer Anosmie korrelieren. Smithson und Kawaja (2010) wiesen in ihren Versuchen Iba1-immunreaktive Zellen in der Riechschleimhaut bei Ratten nach. Zusätzlich identifizierte man bei Ratten mit unilateraler Bulbektomie eine Hypertrophie der Zellen, als Zeichen einer Reaktion auf Verletzungen. In einer früheren Studie wurde ein Anstieg der Iba1-Expression im Nucleus n. facialis nach Axotomie des N. facialis bei Ratten bis zum siebten postinterventionellen Tag nachgewiesen (Ito et al. 1998).

Wie in 3.2.2.5, S. 47 aufgeführt, war die Iba1-Reaktivität bei den P3 HD^{+/-}-Ratten signifikant geringer. Dieser Unterschied zeigte sich bei den erwachsenen Tieren nicht mehr. Bei den 6-Monatstieren war die Zellzahl der transgenen Ratten ebenfalls geringer. Der statistische Vergleich dieser beiden Gruppen ergab aber keine Signifikanz. Ein gestörter Abwehrmechanismus

und die damit einhergehende verringerte Expression von Makrophagen bei den HD^{+/-}-Ratten, könnte Ausdruck der Krankheit Morbus Huntington sein oder zu dieser Krankheit führen. Sollte dies der Fall sein, müsste auch ein signifikanter Unterschied bei den erwachsenen Ratten zu finden sein. Möglich wäre ebenso, dass diese Iba1-reaktiven Zellen im VNE keine Makrophagen sind, sondern andere Zellen darstellen. Die Aktivität von Mikroglia/Makrophagen im ZNS ist in zahlreichen Forschungsarbeiten gut beschrieben (Smithson und Kawaja 2010). Ferner konnte die Mikrogliaaktivierung im olfaktorischen Epithel und Bulbus olfactorius in Studien an NPC1-Mäusen als ein Teil der Neurodegeneration nachgewiesen werden (Hovakimyan et al. 2013; Meyer et al. 2018). Unveröffentlichte Daten unserer Forschungsgruppe zeigten ebenfalls eine Iba1-Expression im olfaktorischen Epithel der TG22. Ihr Vorhandensein im VNE wurde mit dieser Arbeit zum ersten Mal belegt. Dementsprechend könnte es sich um periphere Abwehrzellen handeln, die möglicherweise auch reaktive Proteine wie z.B. das Annexin A3 sezernieren. Im olfaktorischen Nerv der Ratte wurde von Smithson und Kawaja (2010) bei der Makrophagen eine Coexpression von Iba1 und Annexin A3 nachgewiesen. Eine Coexpression durch doppelte Kennzeichnung in der Immunhistochemie wurden in den durchgeführten Experimenten nicht untersucht. Es besteht die Möglichkeit, dass bei den Jungtieren der vorliegenden Studie das Immunsystem schon geschwächt ist, sich langsamer entwickelt und deswegen wesentlich weniger Zellen exprimiert werden. Bei den 6-Monatstieren würde dieser Effekt durch das Wachstum und den Reifungsprozess vielleicht ausgeglichen. Die Beteiligung des olfaktorischen Immunsystems an der Pathogenese von Morbus Huntington kann hier nicht abschließend beantwortet werden. Ein interessanter Aspekt wäre auch Inflammationsparameter zu evaluieren. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit, bis auf die Makrophagenaktivität, nicht weiter untersucht. Es sind weiterführende Studien erforderlich, um die genaue Bedeutung der Ergebnisse einordnen zu können.

4.4 Methodenkritik

1. Die verwendeten Präparate verfügten aufgrund der technischen Vorgabe bei dem Optical Fractionator Programm über eine Schnittdicke von 10 μm . Zur besseren Übersicht des Kernprofils, besonders bei OMP und PGP 9.5, ist eine dünnere Schnittdicke von 5 μm wünschenswert. Somit kommt es zu weniger Überlagerungen, wodurch eine differenzierte Abgrenzung der Zellen möglich ist. Jedoch wäre dann keine klassische Stereologie mehr möglich.
2. Der Startpunkt für die ausgewählten Präparate wurde anhand der zur Übersicht gefärbten Hämatoxylin-Eosin-Schnitte und anhand von unbearbeiteten, in Paraffin eingebetteten Präparaten, festgelegt. Dies hatte zur Folge, dass die Startpunkte nicht identisch waren. Durch die Hochrechnung der absoluten Zellzahlen auf die Dichte wurden vergleichbare Werte erstellt. Diese Problematik ließe sich anderweitig nur vermeiden, indem das ganze VNO vom ersten bis zum letzten Paraffinschnitt durchzählt werden würde. Dann wären aber die in 2.7, S. 29 benannten Vorteile der Stereologie, nämlich die Evaluation einer Stichprobe und Hochrechnung auf die Gesamtheit, nicht gegeben.
3. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Optical Fractionator. Das Programm ist darauf ausgelegt, dass ihm eine gewisse Zellzahl pro Kästchen für seine Berechnung und Auswertung zur Verfügung steht. Bei akt. Caspase-3 und Iba1 war die Zelldichte im VNE gering, sodass die Fehlerkoeffizienten hoch waren. akt. Caspase-3 wurde deswegen manuell semi-quantitativ und nicht mittels Optical Fractionator ausgewertet. Diese Methode geht, im Gegensatz zur objektiven Stereologie, mit einer höheren Ungenauigkeit einher. Bei Iba1 wurde aus diesem Grund die Sampling Size und Grid Size möglichst klein gehalten.
4. Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin war für die Auswertung nicht bei allen Markern von Vorteil. Besonders bei hoher Zelldichte kam es durch die verschiedenen Reaktionen zu Überlagerungen, wodurch die stereologische Auswertung erschwert worden ist. Im Gegensatz dazu war bei seltenen Zellereignissen eine Gegenfärbung essenziell, um die Zellstrukturen zu erkennen.
5. Die Unterschiede zwischen den Kohorten waren zum größten Teil nicht signifikant verschieden. Das lag möglicherweise an der geringen Stichprobenanzahl von sechs Tieren pro Gruppe. Bei einer geringen Stichprobenanzahl fallen Ausreißer in der statistischen Auswertung stark ins Gewicht und verändern möglicherweise das Bild. Bei größerer Stichprobenanzahl werden systematische Fehler ausgeräumt und die Endergebnisse aussagekräftiger. Fraglich ist, ob bei vergrößerter Stichprobenanzahl überhaupt eine Signifikanz bestehen würde, da die Tiere der transgenen Linie 22 wahrscheinlich keinen olfaktorischen Phänotyp besitzen.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Morbus Huntington ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, welche über sensorische und kognitive Defizite immer letal endet. Mit einer Prävalenz von 5,7 – 13,7 pro 100.000 Einwohner ist diese Erbkrankheit keine Rarität. Die genaue Pathologie ist bis heute nicht vollständig verstanden. Aus diesem Grund gibt es zur Zeit keine kausale Therapie (Pringsheim et al. 2012; Wyant et al. 2017; McColgan und Tabrizi 2018). Riechstörungen können ein Warnsignal für eine neurodegenerative Erkrankung sein, da sie sich oft vor anderen Symptomen manifestieren (Moberg et al. 1987). In dieser Dissertation wurde erstmalig das vomeronasale Organ bei fl-mHTT Ratten untersucht. Die BACHD-Ratten bieten momentan durch die volle Länge des mHTT ein Modell, welches dem Menschen ähnelt. Daher sollte an der TG22 untersucht werden, ob ein olfaktorischer Phänotyp vorliegt und diese Linie somit auch als brauchbares Modell für weitere Untersuchungen der Huntington-Erkrankungen eingesetzt werden kann. Die Unterschiede zwischen den Kohorten waren überwiegend nicht signifikant. Als eine mögliche Ursache ist die geringe Stichprobenanzahl zu nennen. Weiterhin kann die TG22 im Gegensatz zur TG5 und TG9 auch keinen olfaktorischen Phänotyp besitzen und dementsprechend würde eine erhöhte Stichprobenanzahl keinen Unterschied ergeben. Dennoch sind weitere Studien erforderlich, um diese Endergebnisse besser einordnen zu können. Ein Vergleich zum MOE oder Bulbus olfactorius (OB) in einer durchgängig stereologischen Auswertung wäre wissenschaftlich interessant, um die Resultate mit den besser erforschten Teilen des Riechepithels vergleichen zu können. Aus jenen Forschungsergebnissen könnten Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit zum Menschen geschlossen werden. Die Existenz und die Funktion des VNO bei Menschen wird kontrovers diskutiert. Es ist eine rudimentäre Struktur, dessen Funktion noch nicht abschließend geklärt ist. Fakt ist, dass das VNO bei Tieren weiter entwickelt ist als beim Menschen (Stoyanov et al. 2018). Vielleicht ist bei einem Vergleich der Daten mit dem MOE/OB ein ähnlicher Aspekt, wie bei den NPC1-defizienten Mäusen von Witt et al. (2018), festzustellen. Hier wurde gezeigt, dass sich das VNO und das MOE unterschiedlich verhalten und ein Schutzmechanismus des VNO vermutet wird, der vomeronasale Neurone gegen NPC1 weniger anfällig macht. Ein zusätzlicher Aspekt ist die zeitliche Komponente. Interessant wäre zu beurteilen, ob es nach etwa 1 – 1,5 Jahren Veränderungen in der Neuronen- und Makrophagenanzahl sowie der Apoptoserate gibt. Forscher entdeckten in ihren Experimenten an der TG5 einige Veränderungen im dopaminergen System (Yu-Taeger et al. 2012) und in Verhaltenstest (Lamirault et al. 2020) erst nach 18 Monaten.

Morbus Huntington wird mit seinen vielen Facetten aus Mangel an Alternativen nur symptomatisch behandelt (Wyant et al. 2017). Anhand der durchgeführten Forschungsarbeit kann kein

neuer Therapieansatz abgeleitet werden. Ein Blick in die Literatur demonstriert therapeutische Ansätze bei NPC1-defizienten Mäusen (Meyer et al. 2018). Aufgrund des frühen Auftretens olfaktorischer Defizite können olfaktorische Tests als Biomarker eingesetzt werden und anschließend therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden. Eine entsprechend geeignete Therapie führte im Tierversuch zu einer Verbesserung des Riechvermögens (Meyer et al. 2018) und signalisiert einen hoffnungsvollen Weg für weitere Forschung im olfaktorischen Bereich von Tieren/Patienten mit Morbus Huntington. Die vorliegende Studie ist eine Grundlagenarbeit, die einerseits zum Verständnis des vomeronasalen Organs beiträgt. Andererseits gibt es in der untersuchten transgenen Reihe (TG22) keinen eindeutigen Anhalt für eine eingeschränkte olfaktorische Funktion bei HD^{+/-}-Ratten. Der Zusammenhang sollte an weiteren Linien der BACHD-Ratten untersucht werden.

4.6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beleuchtete die Fragestellung der Auswirkung von Morbus Huntington auf das vomeronasale Organ (VNO) im Tierversuch. Bei vielen neurodegenerativen Krankheiten, wie auch Morbus Huntington, ist ein Einfluss auf das Riechorgan bekannt, der Pathomechanismus aber noch nicht abschließend verstanden (Moberg et al. 1987; Doty 1989). Verglichen wurden Wildtypen (HD^{-/-}) mit transgenen (HD^{+/-}) männlichen Ratten im Alter von drei Tagen (P3) und sechs Monaten (6Mo). Die verwendeten transgenen Ratten waren bacterial artificial chromosome huntington disease (BACHD)-Ratten der transgenen Linie 22 (TG22) mit einer vollen Länge des mutierten Huntingtin. Es sollte ein möglicher Einfluss von Morbus Huntington auf das VNO und eine fragliche Altersdiversität analysiert werden. Als erstes wurde das Körpergewicht der Tiere vor der Tötung verglichen. Danach folgte zur Übersicht die Darstellung der histologischen Integrität des Organs und letztendlich die immunhistochemische Aufarbeitung zur Identifizierung der reifen vomeronasalen Rezeptorneurone (mittels Antikörper gegen Olfactory marker protein, OMP), der Proliferationsrate (5-Brom-2'-desoxyuridin, BrdU), der Apoptoserate (aktivierte Caspase-3, akt. Caspase-3), der Gesamtzahl der Neurone (Protein gene product 9.5, PGP 9.5) und der Makrophagen (Ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1) im vomeronasalen Epithel (VNE). Die anschließende stereologische Auswertung erfolgte mit der Optical Fractionator Methode. Für akt. Caspase-3 wurden die absoluten Zellzahlen für die statistische Auswertung verwendet.

In dem Körpergewicht der BACHD-Ratten war keine signifikante Differenz in den Altersgruppen messbar. Eine mögliche Begründung ist die Körperzusammensetzung, welche sich bei den

transgenen Tieren zugunsten des Fettanteils verschiebt (vgl. 4.2, S. 53). Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ergab für beide Kohorten keine morphologischen Unterschiede zwischen HD^{-/-} und HD^{+/-}. Die immunhistochemische Reaktion mit anti-OMP wies einen signifikanten Unterschied zwischen den Jungtieren und den erwachsenen Tieren auf. Diese Erkenntnis lässt sich entweder auf den natürlichen Wachstumsprozess oder eine neuroprotektive Funktion zurückführen. Die BrdU-Reaktivitäten waren in allen Gruppen nicht signifikant verschieden. Eine mögliche Ursache für die konstanten Zellzahlen kann ein gleichsinniges Proliferationsverhalten oder die Stammzellfunktion der BrdU-positiven Zelle sein. Ein anderer Aspekt wäre die in der Literatur beschriebene verstärkte Apoptose im lateralen Kompartiment des VNE, welche in diesen Versuchen nicht bestätigt werden konnte. Die akt. Caspase-3- und PGP 9.5-Reaktivität wurde nur bei den 6-Monatstieren getestet. Die Reaktivität beider immunhistochemischer Marker unterschied sich in den jeweiligen Gruppen nicht signifikant. Der Informationsgewinn aus PGP 9.5 als pan-neuronaler Marker ist schwierig und nicht eindeutig. Eine akt. Caspase-3-Aktivität wurde erstmalig im VNE aller Tiere nachgewiesen. Ein Unterschied und damit eine eindeutige Beteiligung am Pathomechanismus von Morbus Huntington konnte nicht belegt werden. Abschließend wurde die Iba1-Immunreaktivität beleuchtet. Iba1-reaktive Zellen konnten erstmalig im VNE bei Ratten nachgewiesen werden. Nur bei den transgenen P3-Tieren waren im Vergleich zum Wildtyp signifikant weniger Zellen zu finden. Makrophagen könnten Auslöser oder Ausdruck der Krankheit sein. Weiterhin könnten sie periphere Abwehrzellen darstellen, die möglicherweise auch reaktive Proteine sezernieren.

In der vorliegenden Forschungsarbeit sind erstmals Daten zum VNO der BACHD-Ratten am Beispiel der TG22 erhoben worden. In dieser Studie ist der Großteil der Immunreaktivitäten zwischen und innerhalb der Gruppen nicht signifikant verschieden. Dies kann zum einen daran liegen, dass die hierfür verwendete TG22 keinen olfaktorischen Phänotyp besitzt und damit kein Unterschied in der Ausprägung zum Wildtyp besteht. Zum anderen ist die Stichprobenanzahl mit sechs Tieren pro Kohorte gering, sodass die beobachteten Tendenzen möglicherweise mit steigender Stichprobenanzahl signifikant werden würden. Ein weiterer Punkt ist der Beobachtungszeitraum. In einigen Forschungsarbeiten wurde der Untersuchungszeitraum weiter gefasst und aussagekräftige Ergebnisse erst nach 18 Monaten erfasst (vgl. Yu-Taeger et al. 2012; Lamirault et al. 2020), wobei kognitive Einschränkungen in Verhaltenstests schon nach drei bis vier Monaten detektiert wurden (Stricker-Shaver et al. 2018; Lamirault et al. 2020; Novati et al. 2020). Das vomeronasale Organ ist ein gering erforschtes chemosensorisches Organ, zu dem es wenig vergleichbare Publikationen gibt. Aus diesem Grund sollten die Experimente der vorliegenden Dissertation als Grundstein für weitere Studien dienen.

5 Literaturverzeichnis

- Abada, Y.-s. K.; Schreiber, R.; Ellenbroek, B. (2013): 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.
- Albeanu, D. F.; Provost, A. C.; Agarwal, P.; Soucy, E. R.; Zak, J. D.; Murthy, V. N. (2018): Olfactory marker protein (OMP) regulates formation and refinement of the olfactory glomerular map. In: *Nature communications* 9 (1), S. 5073. DOI: 10.1038/s41467-018-07544-9.
- Anggård, A.; Edwall, L. (1974): The effects of sympathetic nerve stimulation on the tracer disappearance rate and local blood content in the nasal mucosa of the cat. In: *Acta otolaryngologica* 77 (1), S. 131–139. DOI: 10.3109/00016487409124608.
- Anggård, A.; Lundberg, J. M.; Lundblad, L. (1983): Nasal autonomic innervation with special reference to peptidergic nerves. In: *European journal of respiratory diseases. Supplement* 128 (Pt 1), S. 143–149. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6193989/>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- Ansari, K.; Johnson, A. (1975): Olfactory function in patients with Parkinson's disease. In: *undefined*. DOI: 10.1016/0021-9681(75)90058-2.
- 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.
- Aylward, E. H.; Sparks, B. F.; Field, K. M.; Yallapragada, V.; Shpritz, B. D.; Rosenblatt, A. et al. (2004): Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. In: *Neurology* 63 (1), S. 66–72. DOI: 10.1212/01.wnl.0000132965.14653.d1.
- Bacon Moore, A. S.; Paulsen, J. S.; Murphy, C. (1999): A test of odor fluency in patients with Alzheimer's and Huntington's disease. In: *Journal of clinical and experimental neuropsychology* 21 (3), S. 341–351. DOI: 10.1076/jcen.21.3.341.918.
- Baker, H.; Grillo, M.; Margolis, F. L. (1989): Biochemical and immunocytochemical characterization of olfactory marker protein in the rodent central nervous system. In: *The Journal of comparative neurology* 285 (2), S. 246–261. DOI: 10.1002/cne.902850207.
- Bañez-Coronel, M.; Ayhan, F.; Tarabochia, A. D.; Zu, T.; Perez, B. A.; Tusi, S. K. et al. (2015): RAN Translation in Huntington Disease. In: *Neuron* 88 (4), S. 667–677. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.10.038.
- Barber, P. C.; Raisman, G. (1978a): Cell division in the vomeronasal organ of the adult mouse. In: *Brain research* 141 (1), S. 57–66. DOI: 10.1016/0006-8993(78)90616-9.
- Barber, P. C.; Raisman, G. (1978b): Cell division in the vomeronasal organ of the adult mouse. In: *Brain research* 141 (1), S. 57–66. DOI: 10.1016/0006-8993(78)90616-9.

- Barresi, M.; Ciurleo, R.; Giacoppo, S.; Foti Cuzzola, V.; Celi, D.; Bramanti, P.; Marino, S. (2012): Evaluation of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases. In: *Journal of the neurological sciences* 323 (1-2), S. 16–24. DOI: 10.1016/j.jns.2012.08.028.
- Barrios, F. A.; Gonzalez, L.; Favila, R.; Alonso, M. E.; Salgado, P. M.; Diaz, R.; Fernandez-Ruiz, J. (2007): Olfaction and neurodegeneration in HD. In: *Neuroreport* 18 (1), S. 73–76. DOI: 10.1097/WNR.0b013e3280102302.
- Bates, G. P.; Dorsey, R.; Gusella, J. F.; Hayden, M. R.; Kay, C.; Leavitt, B. R. et al. (2015): Huntington disease. In: *Nature reviews. Disease primers* 1, S. 15005. DOI: 10.1038/nrdp.2015.5.
- Bhatnagar, K. P.; Reid, K. H. (1996): The human vomeronasal organ - I: Historical perspectives. A study of Ruysch's (1703) and Jacobson's (1811) report on the vomeronasal organ with comparative comments and English translations. In: *Biomedical Research* 7 (2), S. 219–229.
- Bhatnagar, K. P.; Smith, T. D. (2003): The human vomeronasal organ. V. An interpretation of its discovery by Ruysch, Jacobson, or Kölliker, with an English translation of Kölliker (1877). In: *Anatomical record. Part B, New anatomist* 270 (1), S. 4–15. DOI: 10.1002/ar.b.10001.
- Bock, P.; Rohn, K.; Beineke, A.; Baumgärtner, W.; Wewetzer, K. (2009): Site-specific population dynamics and variable olfactory marker protein expression in the postnatal canine olfactory epithelium. In: *Journal of Anatomy* 215 (5), S. 522–535. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01147.x.
- Brann, J. H.; Firestein, S. (2010): Regeneration of new neurons is preserved in aged vomeronasal epithelia. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (46), S. 15686–15694. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4316-10.2010.
- Buiakova, O. I.; Baker, H.; Scott, J. W.; Farbman, A.; Kream, R.; Grillo, M. et al. (1996): Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18), S. 9858–9863. DOI: 10.1073/pnas.93.18.9858.
- Byrne, L. M.; Rodrigues, F. B.; Blennow, K.; Durr, A.; Leavitt, B. R.; Roos, R. A. C. et al. (2017): Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis. In: *The Lancet Neurology* 16 (8), S. 601–609. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30124-2.
- Carter, L. A.; MacDonald, J. L.; Roskams, A. J. (2004): Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (25), S. 5670–5683. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0330-04.2004.
- Cattaneo, E.; Zuccato, C.; Tartari, M. (2005): Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. In: *Nature reviews. Neuroscience* 6 (12), S. 919–930. DOI: 10.1038/nrn1806.

- Cell Signaling Technology (2019a): Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody #9661. Produktinformation. Online verfügbar unter <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/cleaved-caspase-3-asp175-antibody/9661?site-search-type=Products>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- Cell Signaling Technology (2019b): EF-Hand Protein Domain. Domain Binding and Function. Online verfügbar unter <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protein-domains-and-interactions/efhand-protein-domain>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- Cell Signaling Technology (2019c): Regulation of Apoptosis. Online verfügbar unter <https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-apoptosis/regulation-of-apoptosis-signaling-pathway/pathways-apoptosis-regulation>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- Chakroborty, S.; Manfredsson, F. P.; Dec, A. M.; Campbell, P. W.; Stutzmann, G. E.; Beaumont, V.; West, A. R. (2020): Phosphodiesterase 9A Inhibition Facilitates Corticostriatal Transmission in Wild-Type and Transgenic Rats That Model Huntington's Disease. In: *Frontiers in neuroscience* 14, S. 466. DOI: 10.3389/fnins.2020.00466.
- Chamero, P.; Katsoulidou, V.; Hendrix, P.; Bufe, B.; Roberts, R.; Matsunami, H. et al. (2011): G protein G α is essential for vomeronasal function and aggressive behavior in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (31), S. 12898–12903. DOI: 10.1073/pnas.1107770108.
- Chang, R.; Liu, X.; Li, S.; Li, X.-J. (2015): Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's disease and therapy. In: *Drug design, development and therapy* 9, S. 2179–2188. DOI: 10.2147/DDDT.S58470.
- Clemensson, E. K. H.; Clemensson, L. E.; Fabry, B.; Flunkert, S.; Riess, O.; Wronski, R.; Nguyen, H. P. (2017): 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.
- Cooper, J. G.; Bhatnagar, K. P. (1976): Comparative anatomy of the vomeronasal organ complex in bats. In: *Journal of Anatomy* 122 (Pt 3), S. 571–601. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1231855/>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- Coquelin, A.; Clancy, A. N.; Macrides, F.; Noble, E. P.; Gorski, R. A. (1984): Pheromonally induced release of luteinizing hormone in male mice: involvement of the vomeronasal system. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4 (9), S. 2230–2236. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.04-09-02230.1984.
- Cuschieri, A.; Bannister, L. H. (1975): The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy. In: *Journal of Anatomy* 119 (Pt 2), S. 277–286. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1133096/>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- D'Aniello, B.; Semin, G. R.; Scandurra, A.; Pinelli, C. (2017): The Vomeronasal Organ: A Neglected Organ. In: *Frontiers in neuroanatomy* 11. DOI: 10.3389/fnana.2017.00070.

- Deems, D. A.; Doty, R. L.; Settle, R. G.; Moore-Gillon, V.; Shaman, P.; Mester, A. F. et al. (1991): Smell and taste disorders, a study of 750 patients from the University of Pennsylvania Smell and Taste Center. In: *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117 (5), S. 519–528. DOI: 10.1001/archotol.1991.01870170065015.
- Del Punta, K.; Rothman, A.; Rodriguez, I.; Mombaerts, P. (2000): Sequence diversity and genomic organization of vomeronasal receptor genes in the mouse. In: *Genome research* 10 (12), S. 1958–1967. DOI: 10.1101/gr.10.12.1958.
- Dennis, J. C.; Smith, T. D.; Bhatnagar, K. P.; Bonar, C. J.; Burrows, A. M.; Morrison, E. E. (2004): Expression of neuron-specific markers by the vomeronasal neuroepithelium in six species of primates. In: *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 281A (1), S. 1190–1200. DOI: 10.1002/ar.a.20124.
- Dennis, J. C.; Stilwell, N. K.; Smith, T. D.; Park, T. J.; Bhatnagar, K. P.; Morrison, E. E. (2020): Is the Mole Rat Vomeronasal Organ Functional? In: *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 303 (2), S. 318–329. DOI: 10.1002/ar.24060.
- Deyts, C.; Galan-Rodriguez, B.; Martin, E.; Bouveyron, N.; Roze, E.; Charvin, D. et al. (2009): Dopamine D2 receptor stimulation potentiates PolyQ-Huntingtin-induced mouse striatal neuron dysfunctions via Rho/ROCK-II activation. In: *PloS one* 4 (12), e8287. DOI: 10.1371/journal.pone.0008287.
- Diamond, R.; White, R. F.; Myers, R. H.; Mastromauro, C.; Koroshetz, W. J.; Butters, N. et al. (1992): Evidence of presymptomatic cognitive decline in Huntington's disease. In: *Journal of clinical and experimental neuropsychology* 14 (6), S. 961–975. DOI: 10.1080/01688639208402547.
- Dibattista, M.; Reisert, J. (2016): The Odorant Receptor-Dependent Role of Olfactory Marker Protein in Olfactory Receptor Neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36 (10), S. 2995–3006. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4209-15.2016.
- Doty, R. L. (1989): Influence of age and age-related diseases on olfactory function. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 561, S. 76–86. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1989.tb20971.x.
- Doty, R. L. (2008): The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? In: *Annals of neurology* 63 (1), S. 7–15. DOI: 10.1002/ana.21327.
- Doty, R. L.; Shaman, P.; Dann, M. (1984): Development of the university of pennsylvania smell identification test: A standardized microencapsulated test of olfactory function. In: *Physiology & Behavior* 32 (3), S. 489–502. DOI: 10.1016/0031-9384(84)90269-5.
- Døving, K. B.; Trotier, D. (1998): Structure and function of the vomeronasal organ. In: *The Journal of Experimental Biology* 201 (21), S. 2913. Online verfügbar unter https://www.researchgate.net/publication/10640938_The_human_vomeronasal_organ_V_An_interpretation_of_its_discovery_by_Ruysch_Jacobson_or_Kolliker_with_an_English_translation_of_Kolliker_1877, zuletzt geprüft am 01.05.2021.

- Duff, K.; Paulsen, J.; Mills, J.; Beglinger, L. J.; Moser, D. J.; Smith, M. M. et al. (2010): Mild cognitive impairment in prediagnosed Huntington disease. In: *Neurology* 75 (6), S. 500–507. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181eccfa2.
- Dulac, C.; Axel, R. (1995): A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. In: *Cell* 83 (2), S. 195–206. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90161-2.
- Dursy, E. (1869): Zur Entwicklungsgeschichte des Kopfes des Menschen und der höheren Wirbelthiere. 2. Aufl. Tübingen: Laupp (an oversize atlas).
- Farbman, A. I.; Buchholz, J. A.; Walters, E.; Margolis, F. L. (1998): Does Olfactory Marker Protein Participate in Olfactory Neurogenesis? In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 855 (1), S. 248–251. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10576.x.
- Farbman, A. I.; Margolis, F. L. (1980): Olfactory marker protein during ontogeny: Immunohistochemical localization. In: *Developmental Biology* 74 (1), S. 205–215. DOI: 10.1016/0012-1606(80)90062-7.
- Fernandes-Alnemri, T.; Litwack, G.; Alnemri, E. S. (1994): CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (49), S. 30761–30764. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7983002/>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- Gebhart, V. M.; Rodewald, A.; Wollbaum, E.; Hertel, K.; Bitter, T.; Jirikowski, G. F. (2019): Evidence for accessory chemosensory cells in the adult human nasal cavity. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 104, S. 101732. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2019.101732.
- Giacobini, P.; Benedetto, A.; Tirindelli, R.; Fasolo, A. (2000): Proliferation and migration of receptor neurons in the vomeronasal organ of the adult mouse. In: *Brain research. Developmental brain research* 123 (1), S. 33–40. DOI: 10.1016/S0165-3806(00)00080-8.
- Goldberg, Y. P.; Nicholson, D. W.; Rasper, D. M.; Kalchman, M. A.; Koide, H. B.; Graham, R. K. et al. (1996): Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. In: *Nat Genet* 13 (4), S. 442–449. DOI: 10.1038/ng0896-442.
- Gratiolet, L.-P. (1845): Recherches sur l'organe de Jacobson. In: *Thèse pour le Doctoral Médecine*, S. 64.
- Gratzner, H. G.; Leif, R. C.; Ingram, D. J.; Castro, A. (1975): The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. In: *Experimental cell research* 95 (1), S. 88–94. DOI: 10.1016/0014-4827(75)90612-6.
- 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.

- Haga, S.; Akai, K.; Ishii, T. (1989): Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. An immunohistochemical study using a novel monoclonal antibody. In: *Acta neuropathologica* 77 (6), S. 569–575. DOI: 10.1007/bf00687883.
- Halpern, M. (1987): The organization and function of the vomeronasal system. In: *Annual review of neuroscience* 10, S. 325–362. DOI: 10.1146/annurev.ne.10.030187.001545.
- Halpern, M.; Martínez-Marcos, A. (2003): Structure and function of the vomeronasal system: an update. In: *Progress in Neurobiology* 70 (3), S. 245–318. DOI: 10.1016/S0301-0082(03)00103-5.
- Hammer, R. E.; Maika, S. D.; Richardson, J. A.; Tang, J. P.; Taurog, J. D. (1990): Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. In: *Cell* 63 (5), S. 1099–1112. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90512-d.
- Hartman, B. K.; Margolis, F. L. (1975): Immunofluorescence localization of the olfactory marker protein. In: *Brain research* 96 (1), S. 176–180. DOI: 10.1016/0006-8993(75)90593-4.
- Hermel, E.; Gafni, J.; Propp, S. S.; Leavitt, B. R.; Wellington, C. L.; Young, J. E. et al. (2004): Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. In: *Cell death and differentiation* 11 (4), S. 424–438. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401358.
- Herrada, G.; Dulac, C. (1997): A Novel Family of Putative Pheromone Receptors in Mammals with a Topographically Organized and Sexually Dimorphic Distribution. In: *Cell* 90 (4), S. 763–773. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80536-X.
- Honda, N.; Sakamoto, H.; Inamura, K.; Kashiwayanagi, M. (2009): Age-Dependent Spatial Distribution of Bromodeoxyuridine-Immunoreactive Cells in the Main Olfactory Bulb. In: *Biol. Pharm. Bull.* 32 (4), S. 627–630. DOI: 10.1248/bpb.32.627.
- Hovakimyan, M.; Meyer, A.; Lukas, J.; Luo, J.; Gudziol, V.; Hummel, T. et al. (2013): Olfactory deficits in Niemann-Pick type C1 (NPC1) disease. In: *PloS one* 8 (12), e82216. DOI: 10.1371/journal.pone.0082216.
- Huntington Study Group (1996): Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 11 (2), S. 136–142. DOI: 10.1002/mds.870110204.
- Imai, Y.; Iбата, I.; Ito, D.; Ohsawa, K.; Kohsaka, S. (1996): A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. In: *Biochemical and biophysical research communications* 224 (3), S. 855–862. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1112.
- Ito, D.; Imai, Y.; Ohsawa, K.; Nakajima, K.; Fukuuchi, Y.; Kohsaka, S. (1998): Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. In: *Brain research. Molecular brain research* 57 (1), S. 1–9. DOI: 10.1016/s0169-328x(98)00040-0.

- Jacobson, L. (1811): Description anatomique d'un organe observé dans le mammiferes. Ein Report von Cuvier über Jacobson's Memoiren. (ins Englische übersetzt von Bhatnagar und Reid, 1996). 18. Aufl. Paris.
- Jacobson, L. (1813): Anatomisk beskrivelse over et nyt organ i huusdyrenes naese. (ins Englische übersetzt von Trotier und Døving, 1998). In: *Veter Salesk Skrift* (2), S. 209–246.
- Jansson, E. K. H.; 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.
- Jia, C.; Halpern, M. (1996): Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (*Gia2* and *Goα*) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. In: *Brain research* 719 (1-2), S. 117–128. DOI: 10.1016/0006-8993(96)00110-2.
- Johns, M. A.; Feder, H. H.; Komisaruk, B. R.; Mayer, A. D. (1978): Urine-induced reflex ovulation in anovulatory rats may be a vomeronasal effect. In: *Nature* 272 (5652), S. 446–448. DOI: 10.1038/272446a0.
- Johnson, E. W.; Eller, P. M.; Jafek, B. W. (1997): Protein gene product 9.5-like and calbindin-like immunoreactivity in the nasal respiratory mucosa of perinatal humans. In: *The Anatomical record* 247 (1), S. 38–45. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199701)247:1<38::AID-AR6>3.0.CO;2-B.
- Kanazawa, H.; Ohsawa, K.; Sasaki, Y.; Kohsaka, S.; Imai, Y. (2002): Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma -dependent pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (22), S. 20026–20032. DOI: 10.1074/jbc.M109218200.
- Kang, N.; Kim, H.; Jae, Y.; Lee, N.; Ku, C. R.; Margolis, F. et al. (2015): Olfactory marker protein expression is an indicator of olfactory receptor-associated events in non-olfactory tissues. In: *PloS one* 10 (1), e0116097. DOI: 10.1371/journal.pone.0116097.
- Karlson, P.; Lüscher, M. (1959): Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. In: *Nature* 183 (4653), S. 55–56. DOI: 10.1038/183055a0.
- Kawagishi, K.; Ando, M.; Yokouchi, K.; Sumitomo, N.; Karasawa, M.; Fukushima, N.; Morizumi, T. (2014): Stereological quantification of olfactory receptor neurons in mice. In: *Neuroscience* 272, S. 29–33. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.050.
- Kawagishi, K.; Ando, M.; Yokouchi, K.; Sumitomo, N.; Karasawa, M.; Fukushima, N.; Morizumi, T. (2015): Stereological Estimation of Olfactory Receptor Neurons in Rats. In: *Chem Senses* 40 (2), S. 89–95. DOI: 10.1093/chemse/bju062.
- Keller, A.; Margolis, F. L. (1975): Immunological studies of the rat olfactory marker protein. In: *Journal of neurochemistry* 24 (6), S. 1101–1106. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1975.tb03883.x.

- Khew-Goodall, Y.; Grillo, M.; Getchell, M. L.; Danho, W.; Getchell, T. V.; Margolis, F. L. (1991): Vomeromodulin, a putative pheromone transporter: cloning, characterization, and cellular localization of a novel glycoprotein of lateral nasal gland. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5 (14), S. 2976–2982. DOI: 10.1096/fasebj.5.14.1752363.
- Kirkwood, S. C.; Siemers, E.; Stout, J. C.; Hodes, M. E.; Conneally, P. M.; Christian, J. C.; Foroud, T. (1999): Longitudinal cognitive and motor changes among presymptomatic Huntington disease gene carriers. In: *Archives of neurology* 56 (5), S. 563–568. DOI: 10.1001/archneur.56.5.563.
- Koo, J. H.; Gill, S.; Pannell, L. K.; Menco, B. P. M.; Margolis, J. W.; Margolis, F. L. (2004): The interaction of Bex and OMP reveals a dimer of OMP with a short half-life. In: *Journal of neurochemistry* 90 (1), S. 102–116. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02463.x.
- Koo, J. H.; Saraswati, M.; Margolis, F. L. (2005): Immunolocalization of Bex protein in the mouse brain and olfactory system. In: *The Journal of comparative neurology* 487 (1), S. 1–14. DOI: 10.1002/cne.20486.
- Krmpotić-Nemanić, J. (1969): Presbycusis, presbystasis and presbyosmia as consequences of the analogous biological process. In: *Acta oto-laryngologica* 67 (2), S. 217–223. DOI: 10.3109/00016486909125446.
- Kurat, S.; Heinrich, P.; Molnar-Kasza, A.; Loeffler, T.; Flunkert, S.; Hutter-Paier, B. (2021): Homozygosity of BACHD rats not only causes strong behavioral deficits in young female rats but also a reduced breeding success. In: *Brain research* 1761, S. 147396. DOI: 10.1016/j.brainres.2021.147396.
- Ladewig, J.; Hart, B. L. (1980): Flehmen and vomeronasal organ function in male goats. In: *Physiology & Behavior* 24 (6), S. 1067–1071. DOI: 10.1016/0031-9384(80)90049-9.
- Lamirault, C.; Nguyen, H. P.; Doyère, V.; El Massioui, N. (2020): Age-related alteration of emotional regulation in the BACHD rat model of Huntington disease. In: *Genes, brain, and behavior* 19 (5), e12633. DOI: 10.1111/gbb.12633.
- Lang, G. (2006): Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Vienna: Springer-Verlag/Wien.
- Langbehn, D. R.; Brinkman, R. R.; Falush, D.; Paulsen, J. S.; Hayden, M. R. (2004): A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. In: *Clinical genetics* 65 (4), S. 267–277. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2004.00241.x.
- Lazic, S. E.; Goodman, A. O. G.; Grote, H. E.; Blakemore, C.; Morton, A. J.; Hannan, A. J. et al. (2007): Olfactory abnormalities in Huntington's disease: decreased plasticity in the primary olfactory cortex of R6/1 transgenic mice and reduced olfactory discrimination in patients. In: *Brain research* 1151, S. 219–226. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.03.018.

- Lessard-Beaudoin, M.; Yu-Taeger, L.; Laroche, M.; Singer, E.; Riess, O.; Nguyen, H. H. P.; Graham, R. K. (2019): Olfactory bulb atrophy and caspase activation observed in the BACHD rat models of Huntington disease. In: *Neurobiology of disease* 125, S. 219–231. DOI: 10.1016/j.nbd.2019.02.002.
- Li, S.-H.; Li, X.-J. (2004): Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. In: *Trends in genetics : TIG* 20 (3), S. 146–154. DOI: 10.1016/j.tig.2004.01.008.
- Li, W.; Serpell, L. C.; Carter, W. J.; Rubinsztein, D. C.; Huntington, J. A. (2006): Expression and characterization of full-length human huntingtin, an elongated HEAT repeat protein. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (23), S. 15916–15922. DOI: 10.1074/jbc.M511007200.
- Liu, L.; Orozco, I. J.; Planel, E.; Wen, Y.; Bretteville, A.; Krishnamurthy, P. et al. (2008): A transgenic rat that develops Alzheimer's disease-like amyloid pathology, deficits in synaptic plasticity and cognitive impairment. In: *Neurobiology of disease* 31 (1), S. 46–57. DOI: 10.1016/j.nbd.2008.03.005.
- Magaud, J. P.; Sargent, I.; Clarke, P. J.; Ffrench, M.; Rimokh, R.; Mason, D. Y. (1989): Double immunocytochemical labeling of cell and tissue samples with monoclonal anti-bromodeoxyuridine. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 37 (10), S. 1517–1527. DOI: 10.1177/37.10.2476478.
- Manfré, G.; Doyère, 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.
- Margolis, F. L. (1972): A Brain Protein Unique to the Olfactory Bulb. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69 (5), S. 1221. DOI: 10.1073/pnas.69.5.1221.
- Marini, M.; Manetti, M.; Sgambati, E. (2019): Immunolocalization of VEGF/VEGFR system in human fetal vomeronasal organ during early development. In: *Acta histochemica* 121 (1), S. 94–100. DOI: 10.1016/j.acthis.2018.11.001.
- Marshall, J.; White, K.; Weaver, M.; Flury Wetherill, L.; Hui, S.; Stout, J. C. et al. (2007): Specific psychiatric manifestations among preclinical Huntington disease mutation carriers. In: *Archives of neurology* 64 (1), S. 116–121. DOI: 10.1001/archneur.64.1.116.
- Martinez-Marcos, A.; Jia, C.; Quan, W.; Halpern, M. (2005): Neurogenesis, migration, and apoptosis in the vomeronasal epithelium of adult mice. In: *Journal of neurobiology* 63 (3), S. 173–187. DOI: 10.1002/neu.20128.
- MBF Bioscience (2019a): Number. Online verfügbar unter <http://www.stereology.info/number/#opticalfractionator>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- MBF Bioscience (2019b): The Most Comprehensive Source of Stereology Information on the Web. Online verfügbar unter <https://www.stereology.info/>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.

- MBF Bioscience (2019c): The Optical Fractionator. Online verfügbar unter <http://www.stereology.info/the-optical-fractionator/>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- McColgan, P.; Tabrizi, S. J. (2018): Huntington's disease: a clinical review. In: *European journal of neurology* 25 (1), S. 24–34. DOI: 10.1111/ene.13413.
- McGann, J. P. (2017): Poor human olfaction is a 19th-century myth. In: *Science (New York, N.Y.)* 356 (6338). DOI: 10.1126/science.aam7263.
- McGeer, P. L.; Itagaki, S.; Boyes, B. E.; McGeer, E. G. (1988): Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. In: *Neurology* 38 (8), S. 1285–1291. DOI: 10.1212/wnl.38.8.1285.
- 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.
- Menco, B. P. (1989): Electron-microscopic demonstration of olfactory-marker protein with protein G-gold in freeze-substituted, Lowicryl K11M-embedded rat olfactory-receptor cells. In: *Cell and tissue research* 256 (2), S. 275–281. DOI: 10.1007/bf00218884.
- Menco, B. P.; Carr, V. M.; Ezeh, P. I.; Liman, E. R.; Yankova, M. P. (2001): Ultrastructural localization of G-proteins and the channel protein TRP2 to microvilli of rat vomeronasal receptor cells. In: *The Journal of comparative neurology* 438 (4), S. 468–489. DOI: 10.1002/cne.1329.
- Mendoza, A. S. (1993): Morphological studies on the rodent main and accessory olfactory systems: The regio olfactoria and vomeronasal organ. In: *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 175 (5), S. 425–446. DOI: 10.1016/S0940-9602(11)80110-X.
- Meredith, M. (2001): Human vomeronasal organ function: a critical review of best and worst cases. In: *Chem Senses* 26 (4), S. 433–445. DOI: 10.1093/chemse/26.4.433.
- Meredith, M.; Marques, D. M.; O'Connell, R. O.; Stern, F. L. (1980): Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior. In: *Science (New York, N.Y.)* 207 (4436), S. 1224–1226. DOI: 10.1126/science.7355286.
- Meyer, A.; Gläser, A.; Bräuer, A. U.; Wree, A.; Strotmann, J.; Rolfs, A.; Witt, M. (2018): Olfactory Performance as an Indicator for Protective Treatment Effects in an Animal Model of Neurodegeneration. In: *Frontiers in Integrative Neuroscience* 12. DOI: 10.3389/fnint.2018.00035.
- Moberg, P. J.; Pearlson, G. D.; Speedie, L. J.; Lipsey, J. R.; Strauss, M. E.; Folstein, S. E. (1987): Olfactory recognition: differential impairments in early and late Huntington's and Alzheimer's diseases. In: *Journal of clinical and experimental neuropsychology* 9 (6), S. 650–664. DOI: 10.1080/01688638708405208.

- Molero, A. E.; Gokhan, S.; Gonzalez, S.; Feig, J. L.; Alexandre, L. C.; Mehler, M. F. (2009): Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (51), S. 21900–21905. DOI: 10.1073/pnas.0912171106.
- Monti-Graziadei, G. A.; Margolis, F. L.; Harding, J. W.; Graziadei, P. P. (1977): Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 25 (12), S. 1311–1316. DOI: 10.1177/25.12.336785.
- Morioka, T.; Kalehua, A. N.; Streit, W. J. (1992): Progressive expression of immunomolecules on microglial cells in rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. In: *Acta neuropathologica* 83 (2), S. 149–157. DOI: 10.1007/bf00308474.
- Moutou, C.; Gardes, N.; Viville, S. (2004): New tools for preimplantation genetic diagnosis of Huntington's disease and their clinical applications. In: *European journal of human genetics : EJHG* 12 (12), S. 1007–1014. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201291.
- Müller, F.; O'Rahilly, R. (2004): Olfactory structures in staged human embryos. In: *Cells, tissues, organs* 178 (2), S. 93–116. DOI: 10.1159/000081720.
- Nakashima, T.; Kimmelman, C. P.; Snow, J. B. (1984): Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium. In: *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill. : 1960)* 110 (10), S. 641–646. DOI: 10.1001/archotol.1984.00800360013003.
- Nance, M. A. (2017): Genetics of Huntington disease. In: *Handbook of clinical neurology* 144, S. 3–14. DOI: 10.1016/B978-0-12-801893-4.00001-8.
- Nehl, C.; Ready, R. E.; Hamilton, J.; Paulsen, J. S. (2001): Effects of depression on working memory in presymptomatic Huntington's disease. In: *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 13 (3), S. 342–346. DOI: 10.1176/jnp.13.3.342.
- Neuwald, A. F.; Hirano, T. (2000): HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. In: *Genome research* 10 (10), S. 1445–1452. DOI: 10.1101/gr.147400.
- Nicholson, D. W.; Ali, A.; Thornberry, N. A.; Vaillancourt, J. P.; Ding, C. K.; Gallant, M. et al. (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. In: *Nature* 376 (6535), S. 37–43. DOI: 10.1038/376037a0.
- Nikaido, M. (2019): Evolution of V1R pheromone receptor genes in vertebrates: diversity and commonality. In: *Genes & genetic systems* 94 (4), S. 141–149. DOI: 10.1266/ggs.19-00009.
- Nordin, S.; Paulsen, J. S.; Murphy, C. (1995): Sensory- and memory-mediated olfactory dysfunction in Huntington's disease. In: *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS* 1 (3), S. 281–290. DOI: 10.1017/s1355617700000278.
- Novati, A.; Manfré, G.; Flunkert, S.; van der Harst, J. E.; Homberg, J. R.; Wronski, R.; Nguyen, H. P. (2020): Validation of behavioral phenotypes in the BACHD rat model. In: *Behavioural brain research* 393, S. 112783. DOI: 10.1016/j.bbr.2020.112783.

- Novati, A.; Yu-Taeger, L.; Gonzalez Menendez, I.; Quintanilla Martinez, L.; Nguyen, H. P. (2018): Sexual behavior and testis morphology in the BACHD rat model. In: *PloS one* 13 (6), e0198338. DOI: 10.1371/journal.pone.0198338.
- Ohsawa, K.; Imai, Y.; Kanazawa, H.; Sasaki, Y.; Kohsaka, S. (2000): Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. In: *Journal of cell science* 113 (Pt 17), S. 3073–3084. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10934045/>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- Ohta, Y.; Ichimura, K. (2001): Globosal basal cells are identified as proliferating cells in mouse olfactory epithelium. In: *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 110 (1), S. 53–55. DOI: 10.1177/000348940111000110.
- Oikawa, T.; Saito, H.; Taniguchi, K. (2001): Immunohistochemical studies on the differential maturation of three types of olfactory organs in the rats. In: *The Journal of veterinary medical science* 63 (7), S. 759–765. DOI: 10.1292/jvms.63.759.
- Pantages, E.; Dulac, C. (2000): A Novel Family of Candidate Pheromone Receptors in Mammals. In: *Neuron* 28 (3), S. 835–845. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)00157-4.
- Paulsen, J. S.; Langbehn, D. R.; Stout, J. C.; Aylward, E.; Ross, C. A.; Nance, M. et al. (2008): Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79 (8), S. 874–880. DOI: 10.1136/jnnp.2007.128728.
- Pérez-Gómez, A.; Stein, B.; Leinders-Zufall, T.; Chamero, P. (2014): Signaling mechanisms and behavioral function of the mouse basal vomeronasal neuroepithelium. In: *Frontiers in neuroanatomy* 8. DOI: 10.3389/fnana.2014.00135.
- Plotkin, J. L.; Surmeier, D. J. (2015): Corticostriatal synaptic adaptations in Huntington's disease. In: *Current opinion in neurobiology* 33, S. 53–62. DOI: 10.1016/j.conb.2015.01.020.
- 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.
- 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.
- Pschyrembel, W.; Arnold, U. (Hg.) (2012): Pschyrembel klinisches Wörterbuch 2013. 264., überarbeitete Auflage. Berlin: De Gruyter.
- Pschyrembel Online (2021): Chorea. Online verfügbar unter <https://www.pschyrembel.de/Chorea/K04VL>, zuletzt aktualisiert am 01.05.2021, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- Rathke, H. (1838): Entwicklungsgeschichte der Natter. Königsberg.

- 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. DOI: 10.1073/pnas.85.15.5733.
- Rodewald, A.; Gisder, D.; Gebhart, V. M.; Oehring, H.; Jirikowski, G. F. (2016): Distribution of olfactory marker protein in the rat vomeronasal organ. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 77, S. 19–23. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2016.04.002.
- Rodriguez, I.; Mombaerts, P. (2002): Novel human vomeronasal receptor-like genes reveal species-specific families. In: *Current Biology* 12 (12), R409–R411. DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00909-0.
- Rosenblatt, A.; Abbott, M. H.; Gourley, L. M.; Troncoso, J. C.; Margolis, R. L.; Brandt, J.; Ross, C. A. (2003): Predictors of neuropathological severity in 100 patients with Huntington's disease. In: *Annals of neurology* 54 (4), S. 488–493. DOI: 10.1002/ana.10691.
- Ross, C. A.; Tabrizi, S. J. (2011): Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. In: *The Lancet Neurology* 10 (1), S. 83–98. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70245-3.
- Ruysch, F. (1703): Thesaurus Anatomicus Tertius. In: *Amstelaedami: Johann Wolters*, 48–49, 70.
- Ryba, N. J.P.; Tirindelli, R. (1997): A New Multigene Family of Putative Pheromone Receptors. In: *Neuron* 19 (2), S. 371–379. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80946-0.
- Saft C. et al. (2017): S2k-Leitlinie Chorea/Morbus Huntington. Hg. v. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Online verfügbar unter <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/030-028.html>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- Sasaki, Y.; Ohsawa, K.; Kanazawa, H.; Kohsaka, S.; Imai, Y. (2001): Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. In: *Biochemical and biophysical research communications* 286 (2), S. 292–297. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5388.
- Sauermost, R.; Freudig, D. (Hg.) (1999): Lexikon der Biologie. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Spektrum Akademischer Verlag. 15 Bände. Heidelberg. Online verfügbar unter <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/haematoxylin-eosin-faerbung/30477>, zuletzt geprüft am 01.05.2021.
- Schofield, J. N.; Day, I. N.; Thompson, R. J.; Edwards, Y. H. (1995): PGP9.5, a ubiquitin C-terminal hydrolase; pattern of mRNA and protein expression during neural development in the mouse. In: *Brain research. Developmental brain research* 85 (2), S. 229–238. DOI: 10.1016/0165-3806(94)00217-n.
- Schwanzel-Fukuda, M. (1999): Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals. In: *Microsc. Res. Tech.* 44 (1), S. 2–10. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19990101)44:1<2::AID-JEMT2>3.0.CO;2-4.

- Segovia, S.; Guillamón, A. (1993): Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. In: *Brain Research Reviews* 18 (1), S. 51–74. DOI: 10.1016/0165-0173(93)90007-M.
- Serby, M.; Larson, P.; Kalkstein, D. (1991): The nature and course of olfactory deficits in Alzheimer's disease. In: *The American journal of psychiatry* 148 (3), S. 357–360. DOI: 10.1176/ajp.148.3.357.
- Shao, J.; Diamond, M. I. (2007): Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. In: *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2, R115-23. DOI: 10.1093/hmg/ddm213.
- Sirlin, J. L. (1958): The labelling of mouse spermatozoa by adenine-8-14C and thymidine-3H. In: *Experimental cell research* 15 (1), S. 250–253. DOI: 10.1016/0014-4827(58)90086-7.
- Smithson, L. J.; Kawaja, M. D. (2010): Microglial/macrophage cells in mammalian olfactory nerve fascicles. In: *Journal of neuroscience research* 88 (4), S. 858–865. DOI: 10.1002/jnr.22254.
- Stoyanov, G. S.; Matev, B. K.; Valchanov, P.; Sapundzhiev, N.; Young, J. R. (2018): The Human Vomeronasal (Jacobson's) Organ: A Short Review of Current Conceptions, With an English Translation of Potiquet's Original Text. In: *Cureus* 10 (5). DOI: 10.7759/cureus.2643.
- Stricker-Shaver, J.; Novati, A.; Yu-Taeger, L.; Nguyen, H. P. (2018): Genetic Rodent Models of Huntington Disease. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1049, S. 29–57. DOI: 10.1007/978-3-319-71779-1_2.
- Tabrizi, S. J.; Langbehn, D. R.; Leavitt, B. R.; Roos, R. A. C.; Durr, A.; Craufurd, D. et al. (2009): Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. In: *The Lancet Neurology* 8 (9), S. 791–801. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70170-X.
- Tabrizi, S. J.; Scahill, R. I.; Durr, A.; Roos, R. A. C.; Leavitt, B. R.; Jones, R. et al. (2011): Biological and clinical changes in premanifest and early stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: the 12-month longitudinal analysis. In: *The Lancet Neurology* 10 (1), S. 31–42. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70276-3.
- 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.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993): A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. In: *Cell* 72 (6), S. 971–983. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90585-e.
- Thompson, R. J.; Doran, J. F.; Jackson, P.; Dhillon, A. P.; Rode, J. (1983): PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. In: *Brain research* 278 (1-2), S. 224–228. DOI: 10.1016/0006-8993(83)90241-x.

- Trotier, D. (2011): Vomeronasal organ and human pheromones. In: *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases* 128 (4), S. 184–190. DOI: 10.1016/j.anorl.2010.11.008.
- Trotier, D.; Døving, K. B. (1998): Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals by Ludvig Jacobson (1813). In: *Chem Senses* 23 (6), S. 743–754. DOI: 10.1093/chemse/23.6.743.
- Trouillet, A.-C.; Keller, M.; Weiss, J.; Leinders-Zufall, T.; Birnbaumer, L.; Zufall, F.; Chamero, P. (2019): Central role of G protein Gai2 and Gai2+ vomeronasal neurons in balancing territorial and infant-directed aggression of male mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (11), S. 5135–5143. DOI: 10.1073/pnas.1821492116.
- Trouillet, A.-C.; Moussu, C.; Poissenot, K.; Keller, M.; Birnbaumer, L.; Leinders-Zufall, T. et al. (2021): Sensory Detection by the Vomeronasal Organ Modulates Experience-Dependent Social Behaviors in Female Mice. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 15, S. 638800. DOI: 10.3389/fncel.2021.638800.
- Trowern, A. R.; Laight, R.; MacLean, N.; Mann, D. A. (1996): Detection of neuron-specific protein gene product (PGP) 9.5 in the rat and zebrafish using anti-human PGP9.5 antibodies. In: *Neuroscience letters* 210 (1), S. 21–24. DOI: 10.1016/0304-3940(96)12640-9.
- van Duijn, E.; Craufurd, D.; Hubers, A. A. M.; Giltay, E. J.; Bonelli, R.; Rickards, H. et al. (2014): Neuropsychiatric symptoms in a European Huntington's disease cohort (REGISTRY). In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 85 (12), S. 1411–1418. DOI: 10.1136/jnnp-2013-307343.
- 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: *Hum Mol Genet* 15 (9), S. 1513–1523. DOI: 10.1093/hmg/ddl072.
- Venstrom, D.; Amooore, J. E. (1968): Olfactory Threshold, in Relation to Age, Sex or Smoking. In: *J. Food Science* (3). DOI: 10.1111/j.1365-2621.1968.tb01364.x.
- von Hörsten, S.; Schmitt, I.; Nguyen, H. P.; Holzmann, C.; Schmidt, T.; Walther, T. et al. (2003): Transgenic rat model of Huntington's disease. In: *Hum Mol Genet* 12 (6), S. 617–624. DOI: 10.1093/hmg/ddg075.
- von Kölliker, A. (1877): Über die Jacobson'schen Organe des Menschen. Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- von Sömmering, S. (1809): Abbildungen des menschlichen Hoerorganes. Abbildungen der menschlichen Organe des Geruches. Vol. 9. Frankfurt am Main.
- Vonsattel, J. P. G.; Difiglia, M. (1998): Huntington Disease. In: *J Neuropathol Exp Neurol* 57 (5), S. 369–384. DOI: 10.1097/00005072-199805000-00001.
- Weiler, E.; Apfelbach, R.; Farbman, A. I. (1999a): The vomeronasal organ of the male ferret. In: *Chem Senses* 24 (2), S. 127–136. DOI: 10.1093/chemse/24.2.127.

- Weiler, E.; Benali, A. (2005): Olfactory epithelia differentially express neuronal markers. In: *Journal of neurocytology* 34 (3-5), S. 217–240. DOI: 10.1007/s11068-005-8355-z.
- Weiler, E.; Farbman, A. I. (1998a): Proliferation Decrease in the Olfactory Epithelium during Postnatal Development. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 855 (1), S. 230–234. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10572.x.
- Weiler, E.; Farbman, A. I. (1998b): Supporting cell proliferation in the olfactory epithelium decreases postnatally. In: *Glia* 22 (4), S. 315–328. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1136(199804)22:4<315::AID-GLIA1>3.0.CO;2-2.
- Weiler, E.; McCulloch, M. A.; Farbman, A. I. (1999b): Proliferation in the vomeronasal organ of the rat during postnatal development. In: *European Journal of Neuroscience* 11 (2), S. 700–711. DOI: 10.1046/j.1460-9568.1999.00476.x.
- Weiss, A.; Träger, U.; Wild, E. J.; Grueninger, S.; Farmer, R.; Landles, C. et al. (2012): Mutant huntingtin fragmentation in immune cells tracks Huntington's disease progression. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (10), S. 3731–3736. DOI: 10.1172/JCI64565.
- Wellington, C. L.; Ellerby, L. M.; Gutekunst, C.-A.; Rogers, D.; Warby, S.; Graham, R. K. et al. (2002): Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (18), S. 7862–7872. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-18-07862.2002.
- Wellington, C. L.; Ellerby, L. M.; Hackam, A. S.; Margolis, R. L.; Trifiro, M. A.; Singaraja, R. et al. (1998): Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (15), S. 9158–9167. DOI: 10.1074/jbc.273.15.9158.
- 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.
- Wessels, Q.; Hoogland, P. V. J. M.; Vorster, W. (2014): Anatomical evidence for an endocrine activity of the vomeronasal organ in humans. In: *Clinical anatomy (New York, N.Y.)* 27 (6), S. 856–860. DOI: 10.1002/ca.22382.
- Wexler, A.; Wild, E. J.; Tabrizi, S. J. (2016): George Huntington: a legacy of inquiry, empathy and hope. In: *Brain : a journal of neurology* 139 (Pt 8), S. 2326–2333. DOI: 10.1093/brain/aww165.
- Wild, E. J.; Boggio, R.; Langbehn, D.; Robertson, N.; Haider, S.; Miller, J. R. C. et al. (2015): Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (5), S. 1979–1986. DOI: 10.1172/JCI80743.

- Wilkinson, K. D.; Lee, K. M.; Deshpande, S.; Duerksen-Hughes, P.; Boss, J. M.; Pohl, J. (1989): The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydro-lase. In: *Science* 246 (4930), S. 670–673. DOI: 10.1126/science.2530630.
- Wilson, K.C.P.; Raisman, G. (1980): Age-related changes in the neurosensory epithelium of the mouse vomeronasal organ: Extended period of post-natal growth in size and evi-dence for rapid cell turnover in the adult. In: *Brain research* 185 (1), S. 103–113. DOI: 10.1016/0006-8993(80)90675-7.
- Wilson, P. O.; Barber, P. C.; Hamid, Q. A.; Power, B. F.; Dhillon, A. P.; Rode, J. et al. (1988): The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. In: *British journal of experimental pathology* 69 (1), S. 91–104. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2964855/>, zu-letzt geprüft am 01.05.2021.
- Witt, M.; Georgiewa, B.; Knecht, M.; Hummel, T. (2002): On the chemosensory nature of the vomeronasal epithelium in adult humans. In: *Histochemistry and cell biology* 117 (6), S. 493–509. DOI: 10.1007/s00418-002-0407-1.
- Witt, M.; Hummel, T. (2006): Vomeronasal Versus Olfactory Epithelium. Is There a Cellular Basis for Human Vomeronasal Perception? In: *International review of cytology* Vol. 248, S. 209–259. DOI: 10.1016/S0074-7696(06)48004-9.
- Witt, M.; Meredith, M. (2014): The Human Vomeronasal System. In: A. Welge-Lüssen und T. Hummel (Hg.): Management of smell and taste disorders. A practical guide for cli-nicians. The Human Vomeronasal System, Bd. 1. 1st ed. Stuttgart: Thieme, S. 39–48.
- Witt, M.; Thiemer, R.; Meyer, A.; Schmitt, O.; Wree, A. (2018): Main Olfactory and Vomer-onasal Epithelium Are Differently Affected in Niemann-Pick Disease Type C1. In: *In-ternational journal of molecular sciences* 19 (11). DOI: 10.3390/ijms19113563.
- Witt, M.; Woźniak, W. (2006): Structure and function of the vomeronasal organ. In: *Advances in oto-rhino-laryngology* 63, S. 70–83. DOI: 10.1159/000093751.
- Wray, S. (2010): From nose to brain: development of gonadotrophin-releasing hormone-1 neurones. In: *Journal of neuroendocrinology* 22 (7), S. 743–753. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2010.02034.x.
- Wyant, K. J.; Ridder, A. J.; Dayalu, P. (2017): Huntington’s Disease—Update on Treatments. In: *Current Neurology and Neuroscience Reports* 17 (4), S. 33. DOI: 10.1007/s11910-017-0739-9.
- Wysocki, C. J. (1979): Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal sys-tem in mammalian reproduction. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 3 (4), S. 301–341. DOI: 10.1016/0149-7634(79)90015-0.
- Yu-Taeger, L.; Bonin, M.; Stricker-Shaver, J.; Riess, O.; Nguyen, H. H. P. (2017): Dysregula-tion of gene expression in the striatum of BACHD rats expressing full-length mutant huntingtin and associated abnormalities on molecular and protein levels. In: *Neu-ropharmacology* 117, S. 260–272. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.029.

- 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.
- Zhang, Z.; Nikaido, M. (2020): Inactivation of ancV1R as a predictive signature for the loss of vomeronasal system in mammals. In: *Genome Biology and Evolution*. DOI: 10.1093/gbe/evaa082.
- Zivadinov, R.; Zorzon, M.; Monti Bragadin, L.; Pagliaro, G.; Cazzato, G. (1999): Olfactory loss in multiple sclerosis. In: *Journal of the neurological sciences* 168 (2), S. 127–130. DOI: 10.1016/s0022-510x(99)00189-6.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die erste Beschreibung des humanen Ductus vomeronasalis (VND) von F. Ruysch (1703).....	2
Abbildung 2:	Frontaler Schnitt durch die Nase der Ratte.....	3
Abbildung 3:	Aufbau des vomeronasalen Organs.....	4
Abbildung 4:	Schichtaufbau des vomeronasalen Epithels (VNE).....	4
Abbildung 5:	Sagittale Darstellung durch den Kopf einer adulten Ratte.....	6
Abbildung 6:	Die zelluläre Migration im VNE.....	7
Abbildung 7:	Endoskopische Sicht auf das humane vomeronasale Organ.....	9
Abbildung 8:	Vereinfachte, schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen des Huntingtin.....	11
Abbildung 9:	Die Auswirkungen von mutiertem Huntingtin (mHTT) auf den Zellmechanismus.....	13
Abbildung 10:	Progression von Morbus Huntington.....	15
Abbildung 11:	Der molekulare Aufbau der BACHD-Ratten.....	19
Abbildung 12:	Vergleich der mHTT-Expression von verschiedenen Ratten Linien mit der BACHD-Maus im Westernblot.....	20
Abbildung 13:	Schneideprotokoll P3-Tier.....	23
Abbildung 14:	Avidin-Biotin-Komplex.....	24
Abbildung 15:	Umrandung des vomeronasalen Epithels.....	30
Abbildung 16:	Gitternetz mit ROI (Region of Interest) und grüner Einschluss- und roter Ausschlusslinie.....	31
Abbildung 17:	Formel zur Berechnung der Zellzahl mittels Optical fractionator.....	32
Abbildung 18:	VNO mit akt. Caspase-3-Reaktion mit Hämatoxylin-Gegenfärbung.....	33
Abbildung 19:	Körpergewicht im Vergleich P3 HD ^{-/-} und HD ^{+/-}	36
Abbildung 20:	Vergleich des Körpergewichts der 6-Monatstiere zwischen HD ^{-/-} und HD ^{+/-}	36
Abbildung 21:	Übersicht des Körpergewichts: P3- und 6-Monatstiere mit Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwertes und Signifikanzen.....	37
Abbildung 22:	Das VNO beim HD ^{+/-} P3-Tier (A) und beim HD ^{+/-} 6-Monatstier (B).....	38
Abbildung 23:	Frontalschnitt durch das VNO. OMP-Nachweis.....	39
Abbildung 24:	Vergleich OMP-positive Zellen im VNE zwischen P3 HD ^{-/-} und P3 HD ^{+/-}	40

Abbildung 25:	Vergleich OMP-positiver Zellen im VNE zwischen 6Mo HD ^{-/-} und 6Mo HD ^{+/-}	40
Abbildung 26:	Übersicht OMP: P3- und 6-Monatstiere mit Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwertes und Signifikanzen.	41
Abbildung 27:	Frontalschnitt durch das VNO. BrdU-Nachweis.	42
Abbildung 28:	Vergleich der BrdU-positiven Zellen im VNE zwischen P3 HD ^{-/-} und P3 HD ^{+/-}	43
Abbildung 29:	Vergleich der BrdU-positiven Zellen im VNE der 6-Monatstiere zwischen HD ^{-/-} und HD ^{+/-}	43
Abbildung 30:	Übersicht BrdU: P3- und 6-Monatstiere mit Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwertes und Signifikanzen	44
Abbildung 31:	Frontalschnitt durch das VNO. akt. Caspase-3-Nachweis	45
Abbildung 32:	Vergleich der Mittelwerte von akt. Caspase-3 im VNE der 6-Monatstiere zwischen HD ^{-/-} und HD ^{+/-}	45
Abbildung 33:	Frontalschnitt durch das VNO. PGP 9.5-Nachweis	46
Abbildung 34:	Vergleich der PGP 9.5-positiven Zellen im VNE der 6-Monatstiere zwischen HD ^{-/-} und HD ^{+/-}	47
Abbildung 35:	Frontalschnitt durch das VNO. Iba1-Nachweis	48
Abbildung 36:	Vergleich der Iba1-positiven Zellen im VNE zwischen P3 HD ^{-/-} und HD ^{+/-}	49
Abbildung 37:	Vergleich der Iba1-positiven Zellen im VNE der 6-Monatstiere zwischen HD ^{-/-} und HD ^{+/-}	49
Abbildung 38:	Übersicht Iba1: P3- und 6-Monatstiere mit Mittelwert, Standardabweichung des Mittelwertes und Signifikanzen.	50

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Anzahl der Versuchstiere	20
Tabelle 2:	Verwendete Antikörper nach Gruppenalter	25
Tabelle 3:	Counting Frames und Grid Size je nach Marker und Alter	31
Tabelle 4:	Gebrauchsmaterialien und Geräte	97
Tabelle 5:	Auswertung des Körpergewichts	99
Tabelle 6:	Auswertung der Immunhistochemie	99
Tabelle 7:	p-Werte aus dem Mann-Whitney-U-Test	100

8 Thesen

1. Morbus Huntington ist eine bis heute unheilbare, autosomal-dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung mit dem Merkmal der erhöhten CAG-Wiederholungen. Sie ist genetisch vorhersehbar.
2. Kognitive und olfaktorische Einschränkungen können bei Morbus Huntington 15 – 20 Jahre vor der manifesten Erkrankung auftreten und können deshalb ein Indikator für die Erkrankung und möglicher therapeutischer Angriffspunkt sein.
3. Das vomeronasale Organ (VNO) nimmt chemosensorische Reize in Form von Pheromonen auf und ist damit am Sozial- und Sexualverhalten von Tieren beteiligt.
4. Die Funktion des VNO beim Menschen wird kontrovers diskutiert.
5. Die Auswirkungen von Morbus Huntington auf das VNO sind bisher nicht bekannt.
6. Das VNO eignet sich als eigenes chemosensorisches und gut quantifizierbares Organ hervorragend dazu, um einen olfaktorischen Phänotyp zu untersuchen.
7. Das bacterial artificial chromosome huntington disease (BACHD)-Rattenmodell der transgenen Linie 22 (TG22) bildet mit der vollen Länge des mutierten Huntingtin (fl-mHTT) ein gutes Tiermodell ab, um die Pathogenese von Morbus Huntington besser zu verstehen.
8. In dieser Studie wurde erstmalig das VNO an BACHD-Ratten der TG22 untersucht. Mit ihr wurde eine weitere transgene Linie auf ihren olfaktorischen Phänotyp untersucht.
9. Die TG22 des BACHD-Rattenmodells eignet sich nach jetzigem Stand nicht, um die olfaktorische Expression bei Morbus Huntington weiter zu untersuchen.

In der TG22 des BACHD-Rattenmodells findet sich Folgendes:

10. Die Anzahl der reifen vomeronasalen Rezeptorneurone (VRN) nimmt mit dem Alter der Ratten in beiden Gruppen zu.
11. Die Transgenität und das Alter haben keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der VRN.
12. Es gibt im Alter von sechs Monaten in der TG22 keine signifikante Erhöhung der Neuroendichte und damit wahrscheinlich auch keine veränderte vomeronasale Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe.
13. Eine Apoptoseaktivität ist erstmalig im VNO nachgewiesen worden. Eine Korrelation zwischen mutiertem Huntingtin und gesteigerter Apoptoserate wurde nicht festgestellt.
14. Makrophagen (Iba1-reaktive Zellen) wurden erstmalig im VNO nachgewiesen. Diese Zellen könnten auch reaktive Proteine freisetzen.

9 Anhang

9.1 Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

1. Entparaffinierung für zweimal zehn Minuten in Xylol mit anschließender Rehydrierung mit absteigender Alkoholreihe (100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %) bis zum Aqua dest. für jeweils drei Minuten
2. Spülung der Präparate mit Aqua dest. für drei Minuten
3. Färbung mit Hämalaun nach Mayer für sieben bis zehn Minuten
4. Kurzes Eintauchen in 1 % HCl-Alkohol-Lösung
5. Anschließend 15 – 30 Minuten unter fließendem Wasser bläuen
6. Spülung mit Aqua dest. für 30 Sekunden zum Stoppen der Reaktion
7. Färbung mit EosinG 1 % für drei Minuten
8. Erneutes Stoppen der Reaktion mit Aqua dest. für 30 Sekunden
9. Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %) für jeweils drei Minuten
10. Paraffinierung in Xylol und anschließendes Eindecken mit DePeX

9.2 Protokolle für die Immunhistochemie

Die Immunhistochemie setzt sich aus zwei Tagen zusammen, die im Folgenden beschrieben werden. Die Mengenangaben beziehen sich auf zehn Objektträgern (OT).

9.2.1 Protokoll für OMP-, akt. Caspase-3-, PGP 9.5-, Iba1-Nachweis

Tag 1 für die Primärantikörper OMP, akt. Caspase-3, PGP 9.5, Iba1

1. Entparaffinierung für dreimal zehn Minuten in Xylol mit anschließender Rehydrierung mit absteigender Alkoholreihe (100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %) bis zum Aqua dest. für jeweils eine Minute
2. Denaturierung der Präparate im Zitratpuffer stehend in der Mikrowelle

OMP und PGP 9.5:	einmal für fünf Minuten bei 850 W und einmal für fünf Minuten bei 340 W
akt. Caspase-3:	fünf Minuten bei 680 W
Iba1:	zwei Minuten bei 850 W
3. Abkühlung der Präparate für einige Minuten in einer Eisschale

4. Umrandung der einzelnen Präparate mit einem PAP-Pen
5. Peroxidase-Hemmung mit 3%igem H₂O₂. Zur Herstellung werden 9,14 ml PBS und 0,86 ml H₂O₂ 35 % verwendet
6. Inkubation für 30 Minuten in einer Feuchtkammer und anschließendes Waschen in PBS für dreimal fünf Minuten
7. Abblockung der unspezifischen Bindungsstellen mit PBS, 3 % BSA, Normal Goat Serum 1 : 67 (ca. 1,5 %) und 0,05 % Triton. Für 10 OT werden folgende Mengen verwendet: 10 ml PBS + 0,3g BSA + 5 µl Triton + 150 µl Normal Goat Serum
8. Inkubation von einer Stunde in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur
9. Kurzes Abspülen der Präparate mit PBS
10. Herstellung der Stammlösung für den Primärantikörper von PBS und 1 % BSA. Hergestellt wird sie aus 12 ml PBS + 120 mg BSA. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt bei

OMP	1 : 6000
akt. Caspase-3	1 : 500
PGP 9.5	1 : 1000
Iba1	1 : 1000

Die benetzten OT werden über Nacht in der Feuchtkammer im Kühlschrank gelagert

Tag 2

1. Die OT dreimal fünf Minuten in PBS waschen
2. Auftragung des Sekundärantikörpers anti-rabbit (Verdünnung 1 : 200). Für 10 OT wird die Lösung wie folgt angesetzt: 10 ml PBS + 100 mg BSA + 5 µl Triton + 50 µl Sekundär-AK anti-rabbit
3. Inkubation in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur für eine Stunde
4. Waschung für dreimal fünf Minuten in PBS
5. Während der Inkubationszeit des Sekundär-AK wird AB-Komplex angesetzt (A und B je 1 : 50, entspricht: 10 ml PBS + 200 µl A + 200 µl B). Dieser inkubiert auf dem Schüttler mindestens 30 Minuten
6. Auftragung des AB-Komplexes auf die Präparate und Inkubation bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer für eine Stunde
7. Waschung der Präparate mit PBS dreimal fünf Minuten
8. Herstellung der DAB-Lösung mit 10 ml PBS + 10 mg DAB + 1 µl H₂O₂ 35 %
9. Inkubation von zwei Minuten unter dem Abzug bei Raumtemperatur und anschließende Waschung in Aqua dest.

10. Gegenfärbung einiger Präparate mit Hämalaun. Zunächst wird das Hämalaun gefiltert, um mögliche Sedimente abzufangen. Danach werden die OT für wenige Sekunden in die Lösung geführt, um dann in einem Behältnis unter laufendem Leitungswasser abgespült zu werden. Die Reaktion wird dadurch gestoppt
11. Aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 % – jeweils ca. eine Minute) bis zum Xylol
12. Eindeckung mit Deckgläschen mittels DePeX

9.2.2 Protokoll für BrdU-Nachweis

Tag 1 für den Primärantikörper BrdU

Tag 1

1. Entparaffinierung für dreimal zehn Minuten in Xylol mit anschließender Rehydrierung mit absteigender Alkoholreihe (100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %) bis zum Aqua dest. für jeweils eine Minute
2. Denaturierung der Präparate im Zitratpuffer stehend in der Mikrowelle
BrdU: einmal fünf Minuten bei 680 W
3. Abkühlung der Präparate für einige Minuten in einer Eisschale
4. Umrandung der einzelnen Präparate mit einem PAP-Pen
5. Peroxidase-Hemmung mit 3%igem H₂O₂. Zur Herstellung werden 9,14 ml PBS und 0,86 ml H₂O₂ 35 % verwendet
6. Inkubation in einer Feuchtkammer für 30 Minuten und anschließendes Waschen in PBS für dreimal fünf Minuten
7. Abblockung der unspezifischen Bindungsstellen mit PBS, Normal Goat Serum (ca. 5 %) und 0,05 % Triton. Für 10 OT werden folgende Mengen verwendet: 10 ml PBS + 5 µl Triton + 500 µl Normal Goat Serum
8. Inkubation von einer Stunde in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur
9. Kurzes Abspülen der Präparate mit PBS
10. Herstellung der Stammlösung für den Primärantikörper von PBS und 3 % Normal Goat Serum. Herstellung aus 10 ml PBS + 300 µl Normal Goat Serum. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt bei BrdU 1 : 2000
Die benetzten OT werden über Nacht in der Feuchtkammer im Kühlschrank gelagert

Tag 2

1. Die OT dreimal fünf Minuten in PBS waschen
2. Auftragung des Sekundärantikörpers anti-rat (Verdünnung 1 : 200). Für 10 OT wird die Lösung wie folgt angesetzt: Stammlösung (PBS + 3 % Normal Goat Serum + 0,05 % Triton): 10 ml PBS + 300 µl Normal Goat Serum + 5 µl Triton + 50 µl Sekundär-AK anti-rat
3. Inkubation in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur für eine Stunde
4. Waschung für dreimal fünf Minuten in PBS
5. Während der Inkubationszeit des Sekundär-AK wird AB-Komplex angesetzt (A und B je 1:50, entspricht: 10 ml PBS + 200 µl A + 200 µl B). Dieser inkubiert auf dem Schüttler mindestens 30 Minuten
6. Auftragung des AB-Komplexes auf die Präparate und eine Stunde Inkubation bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer
7. Waschung der Präparate mit PBS für dreimal fünf Minuten
8. Herstellung der DAB-Lösung mit 10 ml PBS + 10 mg DAB + 1 µl H₂O₂ 35 %.
9. Inkubation von vier Minuten unter dem Abzug bei Raumtemperatur und anschließende Waschung für dreimal fünf Minuten mit PBS
10. Gegenfärbung einiger Präparate mit Hämalaun. Zunächst wird das Hämalaun gefiltert, um mögliche Sedimente abzufangen. Danach werden die OT für wenige Sekunden in die Lösung geführt, um dann in einem Behältnis unter laufendem Leitungswasser abgespült zu werden. Die Reaktion wird dadurch gestoppt
11. Aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 % – jeweils ca. eine Minute) bis zum Xylol
12. Eindeckung mit Deckgläschen mittels DePeX

9.3 Chemikalien und Antikörper

ABC-Kit, Vectastain Elite, PK-6100

Alkohol, N-Propanol 97 %

Aqua dest., hauseigene Anlage

BSA, Albumin Fraktion V biotinfrei, Carl Roth, 0163.2, Lot: u. a. 295231087

Citronensäure Monohydrat, Merck, 1.00244.1000, Lot: K41121244

DAB, 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, Sigma-Aldrich, D5673-10G, Lot: SHBF97794V

DePeX, Serva, 18243.02, Lot: 130349

EDTA, Ethylendiamintetraacetat, Sigma-Aldrich, E4884

Eosin G-Lösung 1 %, wässrig, Carl Roth, 3137.1

Hämalaun nach Mayer, Merck, 1.09249.0500, Lot: HX390929

HCl 37 % EMSURE, Salzsäure, VWR International, 1.00317.1000

H₂O₂ 35 %, Emprove exp, Wasserstoffperoxid, Merck, 1.08600.1000

Ketamin, Bela Pharm, CAS-Nr.: 33643-46-8

NaCl, Natriumchlorid, Carl Roth, Art.-Nr. 3957.1, Charge: 085224050

NaH₂PO₄ x H₂O, Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat, Carl Roth, Art.-Nr. K300.2,
Charge: 092179771

Na₂HPO₄ x 2 H₂O, di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, Carl Roth, Art.-Nr. 4984.1,
Charge: 175226790

NaOH, Natriumhydroxid, Roth, 9356.1

Normal Goat Serum, Vector Laboratories, S-1000, Lot: u. a. ZA0922

PAP-Pen-Liquid Blocker, Abcam, AB2601

Paraformaldehyd, Merck, 1.04005.1000

Primärantikörper:

- akt. Caspase-3: Cleaved Caspase-3 (D175) Rabbit, Cell Signaling Technology, 9661S, Lot: 43
- BrdU: Anti-BrdU monoklonal IgG Rat, AbD Serotec, MCA2060, Lot: 0212 für 6-Monatstiere
- Iba1: Anti Iba1 Rabbit, Wako, 019-19741, Lot: CTP1721 für P3-Tiere, SAQ1935 für 6-Monatstiere
- OMP: Anti-OMP Rabbit, Sigma-Aldrich, O7889, Lot: 017K4829
- PGP 9.5: Anti-protein gene product 9.5 Rabbit, polyclonal, Millipore, AB1761-I, Lot: 2480984, 2581358 für P3-Tiere und 2603261 für 6-Monatstiere

Rompun, Bayer, CAS-Nr.: 7361-61-7

Sekundärantikörper:

- Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L), Vector Laboratories, BA-1000, Lot: u. a. ZA0324
- Biotinylated anti-rat IgG (H+L), Vector Laboratories, BA-9400. Lot: u. a. Y07731

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Carl Roth, Art.-Nr. 3580.3, Charge: 065218348

Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Carl Roth, 4855.2

Triton 0,05 % X-100, Carl Roth, 3051.3

Xylol (Xylene), Dimethylbenzol, CAS-Nr.: 1330-20-7, J.T. Baker, 8118, Lot: u. a.
1720801879

Weitere, eventuell nicht genannte, Grundchemikalien werden durch die Firmen Biogenix, Chemicon, Merck, Carl Roth oder Sigma-Aldrich zur Verfügung gestellt.

9.4 Lösungen

Entkalkung

Für einen Liter Lösung werden 100 g EDTA und 33 g Tris in 1 l Aqua dest. aufgelöst. Der pH-Wert der Lösung wird auf 7,2 eingestellt.

Hämalaunlösung nach Mayer

Für einen Ansatz von 250 ml werden 50 ml Mayers Hämalaun-Konzentrat mit 200 ml Aqua dest. in Lösung gegeben.

Paraformaldehyd-Lösung 3,7 %

Für 2 l Paraformaldehyd-Lösung werden 8 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 16,3 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 1 l Aqua dest. und 74 g Paraformaldehyd vermischt und unter Rühren auf 80 °C erhitzt, bis die Lösung klar ist. Als nächstes erfolgte die Hinzugabe von 500 ml Aqua dest. und der pH wird auf 7,0 (HCl/NaOH) eingestellt. Zuletzt werden erneut 500 ml Aqua dest. hinzugegeben.

PBS

Für 10 Liter 0,1 M PBS-Puffer werden 87,7 g Natriumchlorid, 14,4 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 2,029 g Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat in einen Liter Aqua dest. gelöst. Nach vollständiger Lösung der Salze beträgt die Zusammenstellung des Puffers eine Kombination aus einem Teil hergestelltem Konzentrat und neun Teilen Aqua dest.. Zuletzt wird die Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Zitratpuffer

Für den Zitratpuffer werden zwei Lösungen angesetzt.

Lösung 1 besteht aus 29,41 g Tri-Natriumcitrat Dihydrat, welches in 1 l Aqua dest gelöst wird. Lösung 2 besteht aus 21,01 g Citronensäure Monohydrat und wird ebenfalls in 1 l Aqua dest. gelöst. Im Anschluss wird für 1 l Zitratpuffer 82 ml von Lösung 1, 18 ml Lösung 2 und 900 ml Aqua dest. vermischt. Danach wird die Lösung auf einen pH-Wert von 6.0 kalibriert.

Weitere Lösungen

2 N NaOH-Lösung zum pH einstellen: 80 g NaOH/1 l Aqua dest.

2 N HCl-Lösung zum pH einstellen: 73 ml HCL/1 l Aqua dest.

9.5 Gebrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 4: Gebrauchsmaterialien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bechergläser aus hitzefestem Borosilikatglas in verschiedenen Größen	Simax, Czech Republic
Faltenfilter Ø 240 mm	Schleicher & Schuell GmbH
Feinwaage Excellence E5500S	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage PRJ, 620 3NM	Kern und Sohn GmbH, Deutschland
Feuchtkammer M920- StrainTray	Simport
Hauseigene Aqua dest. Maschine SG euRO 3000	
Laborschüttler-swip	Edmund Bühler GmbH
Leica DM6 B Mikroskop	Leica Microsystems, USA
Magnetrührer „RH Ikamag“	Jahnek & Kunkell IKA Labortechnik, Staufen
Menzel-Gläser 100 Stück 24 x 60 mm	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG
Menzel-Objektträger mit Mattrand 76 x 26 mm	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG
Mikrotom, „RM 2255“	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland
Mikrowelle Wavedom	LG
Pasteurpipetten zum Einmalgebrauch	Thermo Fischer Scientific
Pipettenspitzen: epT.I.P.S. Standard in versch. Größen	Eppendorf, Deutschland
pH-Meter „Expert pro“	Mettler-Toledo, Gießen
Videomikroskop „BX51“	Olympus, Hamburg

Die verwendeten Produkte werden ohne [®] und [™] Zeichen aufgelistet. Auch ohne Kennzeichnung kann es sich um geschützte Produkte handeln. Weitere, hier nicht genannte Laborgeräte entsprechen den üblichen Laborstandards.

9.6 Software

- Citavi 6, Swiss Academic Software GmbH, Schweiz
- LAS X.Ink, Leica Microsystems, USA
- Microsoft Office 2016 (Word, Excel, Power Point), Microsoft, USA
- Photoshop CC 2017, Adobe Systems, USA
- SPSS Statistics 25, IBM, USA
- Stereo Investigator 11.02.1, MBF Bioscience, USA

9.7 Stereo Investigator – Optical Fractionator Workflow

1. Objektivrevolver Stufe 4
2. Stereo Investigator starten
3. Optical Fractionator Workflow auswählen
4. Neues Subjekt starten
5. Set up the subject: Counts eingeben: 7; Section's Cut Thickness: 10 μm ; Section Evaluation Interval: 25 (P3) bzw. 75 (6Mo); Starting Section Number 1
6. Set Microscope to Low Magnification: 10 x 1600
7. Trace your Region of Interest: gewünschten Bereich mit Cursor umfahren
8. Set Microscope to High Magnification: 40 x 1600
9. Measure Mounted Thickness: Refocus to top of section at each grid site; measure the mounted thickness while counting; Measure mounted thickness at sampling sites. Evaluation Interval: measure every 1 site
10. Define the Counting Frame Size: Counting Frame Größe je nach Target festlegen
11. Define SRS Grid Layout: Grid Size je nach Target festlegen
12. Define Disector Options: Top Guard Zone Height 2 μm ; Optical Disector Height 6 μm ; Focus Method: Manual Focus
13. Save Sampling Parameter: Datei-Name festlegen
14. Count Objects: Objekte zählen, Top of the Section und Bottom of the Section mittels Mausklick bestimmen
15. View the Sampling Results: Nach der Zählung aller Sections sich die Ergebnisse anzeigen lassen (Excel) und Datei speichern

9.8 Statistische Auswertung: Mittelwerte, Standardabweichung des Mittelwertes (SEM), p-Werte

Tabelle 5: Auswertung des Körpergewichts

Tier	Mittelwert (Gramm)	SEM
P3^{-/-}	10,0	0,51639778
P3^{+/-}	9,5	0,42817442
6Mo^{-/-}	549,9	17,750313
6Mo^{+/-}	498,2	27,1239951

Tabelle 6: Auswertung der Immunhistochemie

Tier	Mittelwert (Zellen/mm ³)	SEM
P3 OMP^{-/-}	214335,00	23404,6841
P3 OMP^{+/-}	206532,79	34425,852
6Mo OMP^{-/-}	3791308,90	1814058,97
6Mo OMP^{+/-}	5886366,10	3680764,77
P3 BrdU^{-/-}	149775,72	9849,71
P3 BrdU^{+/-}	135556,11	9165,78954
6Mo BrdU^{-/-}	170748,70	91266,1974
6Mo BrdU^{+/-}	97772,67	53528,0381
6Mo akt. Caspase-3^{-/-}	24,6666667	4,75861791
6Mo akt. Caspase-3^{+/-}	32,5	12,1126655
6Mo PGP 9.5^{-/-}	6887526,63	4200951,8
6Mo PGP 9.5^{+/-}	12412336,09	7436884,61
P3 Iba1^{-/-}	121842,35	6252,76403
P3 Iba1^{+/-}	99689,46	4667,03538
6Mo Iba1^{-/-}	1398783,02	785786,345
6Mo Iba1^{+/-}	719521,65	348270,948

Tabelle 7: *p*-Werte aus dem Mann-Whitney-U-Test

	Mann-Whitney-U-Test
Target	p-Wert (exakte Signifikanz)
Körpergewicht P3 HD ^{-/-} vs. P3 HD ^{+/-}	0,419
Körpergewicht 6Mo HD ^{-/-} vs. 6Mo HD ^{+/-}	0,132
Körpergewicht P3 HD ^{-/-} vs. 6Mo HD ^{-/-}	0,002
Körpergewicht P3 HD ^{+/-} vs. 6Mo HD ^{+/-}	0,002
OMP P3 HD ^{-/-} vs. P3 HD ^{+/-}	0,937
OMP 6Mo HD ^{-/-} vs. 6Mo HD ^{+/-}	0,937
OMP P3 HD ^{-/-} vs. 6Mo HD ^{-/-}	0,002
OMP P3 HD ^{+/-} vs. 6Mo HD ^{+/-}	0,002
BrdU P3 HD ^{-/-} vs. P3 HD ^{+/-}	0,485
BrdU 6Mo HD ^{-/-} vs. 6Mo HD ^{+/-}	0,682
BrdU P3 HD ^{-/-} vs. 6Mo HD ^{-/-}	0,662
BrdU P3 HD ^{+/-} vs. 6Mo HD ^{+/-}	0,065
akt. Caspase-3 6Mo HD ^{-/-} vs. HD ^{+/-}	0,937
PGP 9.5 6Mo HD ^{-/-} vs. 6Mo HD ^{+/-}	0,485
Iba1 P3 HD ^{-/-} vs. P3 HD ^{+/-}	0,026
Iba1 6Mo HD ^{-/-} vs. 6Mo HD ^{+/-}	0,937
Iba1 P3 HD ^{-/-} vs. 6Mo HD ^{-/-}	1
Iba1 P3 HD ^{+/-} vs. 6Mo HD ^{+/-}	0,093

10 Selbstständigkeitserklärung

11 Danksagung

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lina-Marielle Krysewski
Geburtsjahr und -ort: 1993 in Göttingen

Studium

10/2012 – 10/2014 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
Abschluss: 1. Staatsexamen

10/2014 – 10/2017 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
Abschluss: 2. Staatsexamen

2015 Beginn der Promotion an der Universitätsmedizin Rostock
(Institut für Anatomie, Arbeitsgruppe Chemosensory Systems bei Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martin Witt)

10/2017 – 05/2018 Promotionssemester an der Universität Rostock
(Institut für Anatomie)

05/2018 – 06/2019 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
Abschluss: 3. Staatsexamen

06/2019 Approbation als Ärztin

07/2019 – 02/2022 Promotionsstudentin an der Universität Rostock
(Institut für Anatomie)

Beruflicher Werdegang

11/2019 – 09/2020 Assistenzärztin in der Klinik für Neurochirurgie am
Städtischen Klinikum Braunschweig

10/2020 – 03/2021 Assistenzärztin in der Klinik für Hals-, Nasen-,
Ohrenheilkunde am Helios Klinikum Gifhorn

Seit 04/2021 Assistenzärztin in der Klinik für Hals-, Nasen-,
Ohrenheilkunde am Städtischen Klinikum Braunschweig

Publikation zur Dissertation

Differential Cellular Balance of Olfactory and Vomeronasal Epithelia in a Transgenic BACHD Rat Model of Huntington's Disease

L.-M. Krysewski†, N. Power Guerra†, A. Glatzel, C. Holzmann, V. Antipova, O. Schmitt, L. Yu-Taeger, H. P. Nguyen, A. Wree and M. Witt

† These authors contributed equally to this work.

Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(14), 7625; <https://doi.org/10.3390/ijms23147625>, Published: 10 July 2022