

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

**Einfluss von VDAC1 auf das Calpain-System als mögliche  
therapeutische Option für Morbus Huntington**

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

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

**vorgelegt von**

**Kloock, Simon Johannes**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. H. Rieß  
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Lerche

Tag der Disputation: 03. September 2020

Meiner Familie.

# **VDAC1 and the calpain system, a possible therapeutic approach for Huntington Disease**

## **Introduction**

Huntington disease (HD) is a fatal neurodegenerative disorder which is caused by a CAG repeat expansion in the *HTT* gene coding for the huntingtin protein (HTT). This mutation is translated into an expanded polyglutamine tract in the mutant HTT (mHTT) protein, leading to deleterious alterations of its normal function. An important characteristic of HD is the proteolytic cleavage of mHTT. Different studies showed that calpains, a calcium-activated class of cysteine proteases, are involved in this processing. Since calcium dyshomeostasis and mitochondrial dysfunction is a further characteristic of HD, calcium alterations may lead to more calpain-mediated mHTT fragmentation as well. The calcium-permeable mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) could play an important role in this vicious circle and influencing this target protein could be a promising therapeutic approach to a treatment for HD.

## **Material and Methods**

Brain samples of six-month-old HD knock-in mice were analysed for calpain activation and expression of proteins involved in calcium homeostasis. Calpain overactivation in HD context was achieved by esiRNA-mediated knock-down of the endogenous calpain inhibitor calpastatin in HEK293T cells overexpressing wildtype (15Q) HTT and polyglutamine-expanded (128Q) mHTT. VDAC1 was influenced genetically and pharmacologically in HTT 15Q/128Q overexpressing HEK293T cells. All protein samples were analysed via western blotting followed by immunodetections. Aggregates of mHTT were analysed via Filter-Retardation-Assay or Immunocytochemistry.

## **Results**

We observed that the calpain system is overactivated significantly in the striatum of six-month old HD knock-in mice and that VDAC1 is downregulated in this specific brain region. Furthermore, a cell-based activity induction of calpains led to an increased mHTT cleavage and accelerated mHTT aggregation. The different approaches to influence VDAC1 expression and function did only have minor effects on the markers of the calpain system and mHTT processing.

## **Conclusion and Discussion**

It was shown that calpains play an important role in the proteolysis of mHTT *in vivo* and in a cell model of HD. The tested cell model did only show minor changes in calpain activation due to VDAC1-targetting. This could possibly be caused by a low sensitivity to decent changes in cytoplasmatic calcium concentration in HEK293T cells. Since VDAC1 is reduced in the striatum of six-month-old HD knock-in mice and due to the aforementioned possible limitations of the employed cell line, the research on VDAC1's targetability in HD should continue.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	I
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	III
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Historie, Epidemiologie und Klinik des Morbus Huntington .....	1
1.2 Diagnose und Differentialdiagnostik.....	6
1.3 Die physiologische Rolle von Huntingtin .....	6
1.4 Molekulare Pathogenese der HD .....	9
1.5 Proteolytische Spaltung und Calpaine bei HD .....	15
1.6 Mitochondrien-assoziierte Membranen und VDAC im Kontext der HD ....	18
1.7 Der Wirkstoff Olesoxim als potentiell neuroprotektives Therapeutikum ...	24
1.8 Zielsetzung.....	27
2 Material und Methoden .....	29
2.1 Materialauflistung.....	29
2.1.1 Technische Unterstützung, Geräte und Software .....	29
2.1.2 Puffer und Lösungen .....	31
2.1.3 Chemikalien, Kits und Transfektionsreagenzien.....	33
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	34
2.1.5 Größenstandards.....	34
2.1.6 Antikörper .....	35
2.1.7 Tiergewebeproben.....	36
2.1.8 Zellkulturmaterialien .....	38
2.1.9 Plasmide und esiRNAs.....	39
2.2 Zellkulturmethoden .....	40
2.2.1 Kultivierung von HEK293T und MEF Zellen .....	40
2.2.2 Passagieren von Zellen (Subkultivierung) .....	41
2.2.3 Zellzählung und Aussaat von Zellen.....	42
2.2.4 Inkulturnahme von Zellen und Anfertigung von Kryostocks.....	43
2.2.5 Beschichten von Gewebekulturplatten mittels Poly-L-Lysin .....	44
2.2.6 Transfektionen.....	44

2.2.7	Olesoxim-Behandlung von mit Huntingtin transfizierten HEK293T Zellen .....	45
2.2.8	Itraconazol-Behandlung von mit Huntingtin transfizierten HEK293T Zellen .....	46
2.2.9	Fluoreszenzmikroskopische Aggregatanalyse .....	46
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	49
2.3.1	Protein-Isolierung aus kultivierten Zellen.....	49
2.3.2	Protein-Isolierung aus Tiergewebe .....	50
2.3.3	Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay.....	50
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	51
2.3.5	Western Blot.....	54
2.3.6	Immundetektionen.....	55
2.3.7	Aggregatanalyse mittels Filter-Retardation-Assay.....	58
2.4	Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA .....	59
2.5	Statistische Auswertung und Ausschlusskriterien.....	60
3	Ergebnisse.....	61
3.1	<i>In-vivo</i> -Analyse von MAM-Komponenten und von Markern des Calpain-Systems in HDKI-Mäusen.....	61
3.1.1	Calpaine sind im Striatum, nicht aber im Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse überaktiviert .....	61
3.1.2	VDAC1 ist im Striatum, nicht aber im Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse herabreguliert.....	63
3.1.3	In Gesamthirn-Lysaten 12 Monate alter HDKI-Mäuse sind keine Effekte auf das Calpain-System nachweisbar .....	65
3.1.4	Hypothese der Verbindung zwischen MAM und Calpain-Aktivierung als Grundlage weiterer Experimente .....	66
3.2	Generierung eines <i>In-cellulo</i> -Modelles einer Calpain-Überaktivierung ....	67
3.2.1	Calpaine werden durch eine Herabregulation von CAST überaktiviert.....	67
3.2.2	Eine Herabregulation von CAST führt zu vermehrter Spaltung von mutiertem Huntingtin und zu vermehrter zytosolischer und nukleärer Huntingtin-Aggregation.....	68
3.3	Untersuchung der <i>In-cellulo</i> -Wirkung von Olesoxim und der <i>In-cellulo</i> -Effekte einer genetischen und pharmakologischen Beeinflussung von VDAC1.....	74
3.3.1	Etablierung einer Olesoxim-Behandlung in HEK293T Zellen .....	74

3.3.2	Auswirkungen einer Olesoxim-Behandlung <i>in cellulo</i> auf das Calpain-System und auf die Prozessierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin.....	76
3.3.3	Etablierung einer VDAC1-Überexpression in HEK293T Zellen .....	79
3.3.4	Auswirkungen einer Überexpression von VDAC1 <i>in cellulo</i> auf das Calpain-System und auf die Prozessierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin .....	80
3.3.5	Etablierung einer VDAC1-Herabregulation in HEK293T Zellen.....	83
3.3.6	Auswirkungen einer Herabregulation von VDAC1 <i>in cellulo</i> auf das Calpain-System und auf die Prozessierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin .....	84
3.3.7	Etablierung einer pharmakologischen VDAC1-Inhibition mittels Itraconazol in HEK293T Zellen .....	87
3.3.8	Auswirkungen einer Itraconazol-Behandlung <i>in cellulo</i> auf das Calpain-System und auf die Prozessierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin.....	91
3.3.9	Analyse des Calpain-Aktivierungsmusters in MEF-VDAC1-Knockout-Zellen.....	94
3.3.10	Zusammenschau der durchgeführten <i>In-vitro</i> -Experimente.....	96
4	Diskussion .....	97
5	Zusammenfassung .....	112
6	Referenzen .....	114
7	Erklärung zum Eigenanteil .....	131
8	Veröffentlichungen, Kongressbeiträge und Förderungen.....	132
9	Danksagung.....	133

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 – Molekulare Pathomechanismen bei HD. ....	14
Abbildung 2 – Hypothese des Calpain-vermittelten Teufelskreises der Neurodegeneration.....	18
Abbildung 3 – Mögliche Involvierung von VDAC in die Pathogenese der HD...21	
Abbildung 4 – Strukturformel von Olesoxim (TRO19622). ....	24
Abbildung 5 – Vereinfachte Darstellung der strukturellen Komponenten Mitochondrien-assoziiierter Membranen (MAM). ....	25
Abbildung 6 – Beispielhafte lichtmikroskopische Aufnahme der verwendeten HEK293T Zelllinie.....	41
Abbildung 7 – Beispiel einer Ponceau-S-Gesamtprotein-Färbung einer NC-Membran.....	55
Abbildung 8 – Prinzip der indirekten Immundetektion mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper. ....	56
Abbildung 9 – Es finden sich keine Anzeichen für eine vermehrte Calpain-Aktivierung im Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse.....	62
Abbildung 10 – Calpaine sind im Striatum von sechs Monate alten HDKI-Mäusen überaktiviert. ....	63
Abbildung 11 – Die MAM-Komponenten weisen im Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse keine Veränderungen auf.....	64
Abbildung 12 – Die Expression von VDAC1 und IP3R1 ist im Striatum von sechs Monate alten HDKI-Mäusen verringert.....	65
Abbildung 13 – In Gesamtgehirn-Lysaten von 12 Monate alten HDKI-Mäusen zeigen sich keine Hinweise auf veränderte Calpain-Aktivierung und Expression von VDAC1.....	66
Abbildung 14 – Eine <i>In-cellulo</i> -Herabregulation von CAST führt zu vermehrter Auto-Prozessierung von Calpain-1 und zu vermehrter Prozessierung von $\alpha$ -Spektrin. ....	68
Abbildung 15 – In 128QFL-Huntingtin-überexprimierenden Zellen treten Polyglutamin-enthaltende Fragmente durch eine Herabregulation von CAST signifikant häufiger auf.....	69
Abbildung 16 – Die nukleäre und zytosolische Aggregation von mutiertem Huntingtin wird signifikant gesteigert durch eine Herabregulation von CAST. 71	
Abbildung 17 – Eine Herabregulation von CAST bewirkt keine veränderte Grundaktivität typischer Autophagie-Markerproteine. ....	73
Abbildung 18 – Dosisfindung für eine 48-stündige Olesoxim-Behandlung <i>in cellulo</i> . ....	75
Abbildung 19 – Prozessiertes/vl-Huntingtin bei verschiedenen Olesoxim-Konzentrationen. ....	76
Abbildung 20 – Eine Olesoxim-Behandlung <i>in cellulo</i> führt zu keinen signifikanten Veränderungen in der Aktivität des Calpain-Systems. ....	77
Abbildung 21 – Eine Olesoxim-Behandlung <i>in cellulo</i> führt zu keinen signifikanten Veränderungen in der Huntingtin-Fragmentierung. ....	78

Abbildung 22 – Eine Olesoxim-Behandlung <i>in cellulo</i> führt zu keinen signifikanten Veränderungen in der Huntingtin-Aggregation. ....	79
Abbildung 23 – Klontestung von FLAG-markierten VDAC1-DNA-Konstrukten. ....	80
Abbildung 24 – Eine Überexpression von VDAC1 <i>in cellulo</i> führt zu keinen Veränderungen in der Aktivität des Calpain-Systems. ....	81
Abbildung 25 – Eine Überexpression von VDAC1 <i>in cellulo</i> bewirkt keine signifikanten Änderungen in der Huntingtin-Fragmentierung. ....	82
Abbildung 26 – Eine Überexpression von VDAC1 <i>in cellulo</i> führt zu vermehrter Huntingtin-Aggregation. ....	82
Abbildung 27 – Etablierung einer esiRNA-vermittelten Herabregulation von VDAC1 <i>in cellulo</i> . ....	83
Abbildung 28 – Eine Herabregulation von VDAC1 <i>in cellulo</i> führt zu keinen signifikanten Veränderungen in der Aktivität des Calpain-Systems. ....	85
Abbildung 29 – Eine Herabregulation von VDAC1 <i>in cellulo</i> führt zu einer signifikant niedrigeren Huntingtin-Prozessierung in mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Zellen. ....	86
Abbildung 30 – Eine Herabregulation von VDAC1 <i>in cellulo</i> zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Huntingtin-Aggregation. ....	86
Abbildung 31 – <i>In-cellulo</i> -Effekte einer 5 µM Itraconazol-Behandlung auf die P70S6-Kinase, S6 und auf $\alpha$ -Spektrin zu verschiedenen Zeitpunkten. ....	88
Abbildung 32 – Dosisfindung für eine 48-stündige Itraconazol-Behandlung <i>in cellulo</i> . ....	89
Abbildung 33 - Prozessiertes/vl-Huntingtin bei verschiedenen Itraconazol- Konzentrationen. ....	89
Abbildung 34 – Zellkulturplatte der Itraconazol-Dosisfindung 48 h nach Beginn der Itraconazol-Behandlung. ....	90
Abbildung 35 – Eine Itraconazol-Behandlung <i>in cellulo</i> führt zu einer verminderten Calpain-vermittelten Prozessierung von $\alpha$ -Spektrin in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen. ....	92
Abbildung 36 – Eine Itraconazol-Behandlung <i>in cellulo</i> bewirkt keine signifikanten Änderungen in der Huntingtin-Fragmentierung. ....	93
Abbildung 37 – Eine Itraconazol-Behandlung <i>in cellulo</i> führt zu keinen Veränderungen in der Huntingtin-Aggregation. ....	93
Abbildung 38 – Lichtmikroskopische Aufnahme der verwendeten MEF-Wildtyp- (a) und MEF-VDAC1-Knockout-Zellen (b). ....	94
Abbildung 39 – MEF-VDAC1-Knockout-Zellen zeigen eine signifikant erhöhte Prozessierung von $\alpha$ -Spektrin ohne Aktivierung von Calpain-1. ....	95
Abbildung 40 – Darstellung der Prozesse Calpain-vermittelter Neurodysfunktion bei HD. ....	103

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 – Modulatoren von VDAC und ihr therapeutisches Potential. ....	23
Tabelle 2 – Auflistung von verwendeten technischen Geräten.....	29
Tabelle 3 – Auflistung von verwendeter Software. ....	31
Tabelle 4 – Auflistung von zur Gelherstellung verwendeter Puffer und Chemikalien. ....	31
Tabelle 5 – Auflistung von für die SDS-PAGE verwendeter Ladepuffer. ....	31
Tabelle 6 – Auflistung von für die SDS-PAGE und Immundetektion verwendeter Puffer. ....	32
Tabelle 7 – Bakterienkultur und Lyse-Puffer.....	32
Tabelle 8 – Verwendete Chemikalien, Kits und Transfektionsreagenzien.....	33
Tabelle 9 – Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	34
Tabelle 10 – Auflistung verwendeter Größenstandards. ....	34
Tabelle 11 – Liste der verwendeten Primärantikörper. ....	35
Tabelle 12 – Liste der verwendeten Sekundärantikörper. ....	36
Tabelle 13 – Auflistung der verwendeten sechs Monate alten Wildtyp- und <i>Hdh</i> <sup>Q111</sup> knock-in-Mäuse.....	36
Tabelle 14 – Auflistung der verwendeten zwölf Monate alten Wildtyp und <i>Hdh</i> <sup>Q111</sup> knock-in-Mäuse.....	37
Tabelle 15 – Auflistung der verwendeten Zellkulturmaterialien. ....	38
Tabelle 16 – Auflistung und Herkunft der verwendeten Plasmidkonstrukte.....	39
Tabelle 17 – Auflistung der verwendeten esiRNAs. ....	39
Tabelle 18 – Attractene Transfektionsansätze. ....	45
Tabelle 19 – BisTris-Gel Zusammensetzung für ein Trenngel.....	52
Tabelle 20 – BisTris-Gel Zusammensetzung für ein Sammelgel.....	53
Tabelle 21 – Tris-Glycin-Gel Zusammensetzung für Sammel- und Trenngel...	53
Tabelle 22 – Zusammengefasste Auflistung der Ergebnisse aller in HEK293T Zellen durchgeführten <i>In-vitro</i> -Experimente.....	96
Tabelle 23 – Zusammenfassung der bisherigen Untersuchungen zu Expressions-Leveln von VDAC1 und IP3R1 im Kontext der HD. ....	99

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A/A</b>	<b>Antibiotikum/Antimykotikum</b>
<b>AD</b>	<b>Alzheimer Disease</b> (dt.: Alzheimer Krankheit)
<b>ADP</b>	<b>Adenosindiphosphat</b>
<b>ALS</b>	<b>Amyotrophe Lateralsklerose</b>
<b>AMPK</b>	<b>Adenosin-Mono-Phosphat-aktivierte Proteinkinase</b>
<b>ANT-1</b>	<b>Adenin-Nukleotid-Transporter 1</b>
<b>APS</b>	<b>Ammoniumpersulfat</b>
<b>AS</b>	<b>Aminosäure</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosintriphosphat</b>
<b>BAC</b>	<b>Bacteria artificial chromosome</b> (dt.: bakterielles künstliches Chromosom)
<b>BDNF</b>	<b>Brain-derived neurotrophic factor</b> (dt.: vom Gehirn stammender neurotropher Faktor)
<b>BSA</b>	<b>Bovines Serumalbumin</b>
<b>CAG</b>	<b>Cytosin-Adenin-Guanin-Triplett</b>
<b>cAMP</b>	<b>Cyclisches Adenosinmonophosphat</b>
<b>CAST</b>	<b>Calpastatin</b>
<b>cDNA</b>	<b>Complementary DNA</b> (dt.: komplementäre DNA)
<b>CREB</b>	<b>cAMP response element-binding protein</b> (dt.: cAMP "response element"-bindendes Protein)
<b>CRISPR/Cas</b>	<b>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associate</b> (dt.: häufige kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigem Abstand/CRISPR-assoziiert)
<b>CSS1</b>	<b>Calpain small subunit 1</b> (dt.: kleine Calpain Untereinheit 1)
<b>CT</b>	<b>Computertomographie</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>Double-distilled water</b> (dt.: demineralisiertes Wasser)
<b>DIDS</b>	<b>4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid</b> (dt.: 4,4'-Diisothiocyanat-2,2'-Stilbendisulfonsäure)
<b>DMA III</b>	<b>Dimethylarsinous acid III</b> (dt.: Dimethylarsenige Säure III)
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b> (dt.: Dulbecco's abgeändertes Eagle Medium)

- Abkürzungsverzeichnis -

<b>DMSO</b>	<b>Dimethylsulfoxid</b>
<b>DNA</b>	<b>Deoxyribonucleic acid</b> (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
<b>DPBS</b>	<b>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</b> (dt.: Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline)
<b>DRPLA</b>	<b>Dentatorubropallidoluysische Atrophie</b>
<b>DTT</b>	<b>Dithiothreitol</b>
<b><i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	<b><i>Escherichia coli</i> Stamm DH5<math>\alpha</math></b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethylendiaminetetraacetic acid</b> (dt.: Ethylendiamintetraessigsäure)
<b>ER</b>	<b>Endoplasmatisches Retikulum</b>
<b>ESC</b>	<b>Embryonic stem cell</b> (dt.: embryonale Stammzelle)
<b>esiRNA</b>	<b>Endoribonuclease-prepared siRNA</b> (dt.: endoribonuclease aufbereitete siRNA)
<b>FBS</b>	<b>Fetale bovine serum</b> (dt.: Fetales Kälberserum)
<b>Fc region</b>	<b>Fragment crystallizable region</b> (dt.: Fragment kristallisierbare Region)
<b>FDA</b>	<b>Food and Drug Administration</b> (dt.: Behörde für Lebens- und Arzneimittel in den Vereinigten Staaten von Amerika)
<b>FNQs</b>	<b>Furanonaphthoquinones</b> (dt.: Furanonaphthochinone)
<b>GABA</b>	<b>Gamma-aminobutyric acid</b> (dt.: $\gamma$ -Aminobuttersäure)
<b>grp75</b>	<b>Glucose-regulated protein 75 kDa</b> (dt.: Glukose-reguliertes Protein 75 kDa)
<b>HA</b>	<b>Hämagglutinin</b>
<b>HAc</b>	<b>Essigsäure</b>
<b>HD</b>	<b>Huntington Disease</b> (dt.: Morbus Huntington; Chorea Huntington; Chorea major)
<b>HDCRG</b>	<b>Huntington's Disease Collaborative Research Group</b>
<b><i>Hdh</i><sup>Q111</sup> knock-in-Maus</b>	<b>Knock-in Mausmodell für HD mit 111 Glutaminen</b>
<b>HDKI</b>	siehe <i>Hdh</i> <sup>Q111</sup>
<b>HEAT-Domäne</b>	<b>Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A and TOR1</b> (dt.: Huntingtin, Elongationsfaktor 3, Proteinphosphatase 2A und TOR1)

- Abkürzungsverzeichnis -

<b>HEK cells</b>	<b>H</b> uman <b>E</b> mbrionic <b>K</b> idney cells (dt.: menschliche embryonale Nierenzellen)
<b>HeLa cells</b>	Epithelzellen aus einem humanem Zervixkarzinom
<b>HIP1</b>	<b>H</b> untingtin-interacting <b>p</b> rotein <b>1</b> (dt.: Huntingtin-interagierendes Protein 1)
<b>HK</b>	<b>H</b> exokinase
<b>HRP</b>	<b>H</b> orseradish <b>p</b> eroxidase (dt.: Meerrettichperoxidase)
<b>Hsp40</b>	<b>H</b> eat <b>s</b> hock <b>p</b> rotein <b>40</b> kDa (dt.: Hitzeschockprotein 40 kDa)
<b>Hsp70</b>	<b>H</b> eat <b>s</b> hock <b>p</b> rotein <b>70</b> kDa (dt.: Hitzeschockprotein 70 kDa)
<b>HTT</b>	<b>H</b> untingtin (Protein)
<i><b>HTT</b></i>	<b>H</b> untingtin (Gen)
<b>HUVEC</b>	<b>H</b> uman <b>u</b> mbilical <b>v</b> ein <b>e</b> ndothelial <b>c</b> ells (dt.: Nabelschnurvenen-Endothelzellen)
<b>IP3R</b>	Inositol-1,4,5- <b>t</b> risphosphat <b>R</b> ezeptor
<b>IPS</b>	Induzierte <b>p</b> luripotente <b>S</b> tammzelle
<b>IT15</b>	Interesting transcript <b>15</b> (dt.: interessantes Transkript 15; siehe <i>HTT</i> )
<b>KO</b>	Gen <b>K</b> nock- <b>o</b> ut
<b>KI</b>	Gen <b>K</b> nock- <b>i</b> n
<b>LDS</b>	Lithium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulfate (dt.: Lithiumlaurylsulfat)
<b>LV</b>	<b>L</b> eervektor
<b>MAM</b>	<b>M</b> itochondria- <b>a</b> ssociated <b>m</b> embrane (dt.: Mitochondrien-assoziierte Membran)
<b>MAO</b>	<b>M</b> onoaminoxidase
<b>MEF</b>	<b>M</b> ouse <b>E</b> mbrionic <b>F</b> ibroblasts (dt.: embryonale Maus-Fibroblasten)
<b>MES</b>	2-( <b>N</b> - <b>M</b> orpholino)ethansulfonsäure
<b>mHTT</b>	<b>m</b> utiertes <b>HTT</b>
<b>MOPS</b>	3-( <b>N</b> - <b>M</b> orpholino)propansulfonsäure
<b>mPTP</b>	<b>M</b> itochondrial <b>p</b> ermeability <b>t</b> ransition <b>p</b> ore (dt.: mitochondrialer Permeabilitäts-Transitions-Porenkomplex)
<b>mRNA</b>	<b>M</b> essenger <b>R</b> NA (dt.: Boten-RNA)
<b>MRT</b>	<b>M</b> agnetresonanztomographie

- Abkürzungsverzeichnis -

<b>mTOR</b>	<b>Mammalian target of rapamycin</b> (dt.: Säugetier-Angriffspunkt von Rapamycin)
<b>NADH</b>	<b>Nicotinamidadenindinucleotid-Hydrat</b>
<b>NC</b>	<b>Nitrocellulose</b> (dt.: Nitrozellulose)
<b>NEAA</b>	<b>Non-essential amino acids</b> (dt.: nicht-essentielle Aminosäuren)
<b>NII</b>	<b>Neuronal intranuclear inclusions</b> (dt.: neuronale intranukleäre Einschlusskörperchen)
<b>NMDAR</b>	<b>N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor</b>
<b>NR</b>	Siehe NMDAR
<b>PAA</b>	<b>Polyacrylamid</b>
<b>PC1/2 Domäne</b>	<b>Protease core domain 1/2</b> (dt.: proteolytische Kerndomäne 1/2)
<b>PC-12</b>	<b>Phäochromozytom-12 Zellen</b>
<b>PEF-Domäne</b>	<b>Penta-EF-hand Domäne</b>
<b>PET-CT</b>	<b>Positronenemissionstomographie-CT</b>
<b>PFA</b>	<b>Paraformaldehyd</b>
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	<b>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</b> (dt.: Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor Gamma Coaktivator 1-Alpha)
<b>PVDF</b>	<b>Polyvinylidenfluorid</b>
<b>Q</b>	Glutamin
<b>HD R6/2-Maus</b>	Transgenes Mausmodell für HD
<b>RLUC</b>	<b><i>Renilla luciferase</i></b> (dt.: <i>Renilla</i> -Luziferase)
<b>RNA</b>	<b>Ribonucleic acid</b> (dt.: Ribonukleinsäure)
<b>ROS</b>	<b>Reactive oxygen species</b> (dt.: Reaktive Sauerstoffspezies)
<b>rpm</b>	<b>Revolutions per minute</b> (dt.: Umdrehungen pro Minute)
<b>SBMA</b>	<b>Spinobulbäre Muskuläre Atrophie</b>
<b>SCA</b>	<b>Spinocerebellar ataxia</b> (dt.: Spinozerebelläre Ataxie)
<b>SDC</b>	<b>Sodium deoxycholic acid</b> (dt.: Natriumdesoxychololat)
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</b> (dt.: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)

- Abkürzungsverzeichnis -

<b>SEM</b>	<b>standard error of the mean</b> (dt.: Standardfehler des Mittelwertes)
<b>SH3-Domäne</b>	<b>Src-homology-3-Domäne</b> (dt.: Src-Homologie-3-Domäne)
<b>siRNA</b>	<b>Small interfering RNA</b> (dt.: kleine eingreifende RNA)
<b>SMA</b>	<b>Spinale Muskelatrophie</b>
<b>Sp1</b>	<b>Specific-protein 1</b> (dt.: spezifisches-Protein-1)
<b>TATA</b>	Spezifische DNA-Sequenz
<b>TBP</b>	<b>TATA-Box binding protein</b> (dt.: TATA-Box-bindendes Protein)
<b>TBS</b>	<b>Tris-buffered saline</b> (dt.: Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
<b>TBS-T</b>	<b>TBS-Tween 20</b>
<b>TEMED</b>	<b>Tetramethylethylendiamin</b>
<b>THP-1 cells</b>	Humane monozytische Zelllinie aus Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie
<b>TSPO</b>	<b>Translocator protein</b> (dt.: Transmembranprotein der äußeren Mitochondrienmembran)
<b>UPS</b>	<b>Ubiquitin-Proteasom-System</b>
<b>v/v</b>	<b>volume/volume</b> (dt.: Volumen/Volumen)
<b>VDAC</b>	<b>Voltage-dependent anion channel</b> (dt.: spannungsabhängiger Anionen-Kanal)
<b>w/v</b>	<b>weight/volume</b> (dt.: Gewicht/Volumen)
<b>WT</b>	<b>Wildtyp</b>
<b>YAC</b>	<b>Yeast artificial chromosome</b> (dt.: Künstliches Hefechromosom)
<b>ZNS</b>	<b>Zentrales Nervensystem</b>

# 1 Einleitung

Der Morbus Huntington (Chorea Huntington, HD) ist eine monogenetische, autosomal-dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Er zählt zum Formenkreis der Polyglutaminerkrankungen, einer Untergruppe der Trinukleotiderkrankungen. Durch eine Verlängerung der CAG-Sequenz im krankheitsverursachenden Gen *HTT* kommt es bei HD zu einer Verlängerung der Polyglutaminsequenz im Protein Huntingtin, das dadurch in seiner physiologischen Funktion beeinträchtigt wird (engl.: „loss-of-function“) und zugleich neue pathologische Funktionen erhält (engl.: „gain-of-function“). Neben HD gibt es acht weitere Erkrankungen, die zum Formenkreis der Polyglutaminerkrankungen zählen. Diese sind die Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie (DRPLA), die Spinobulbäre Muskuläre Atrophie (SBMA) und die Spinozerebellären Ataxien (SCA) Typ 1, 2, 3, 6, 7 und 17. Mit Ausnahme der SBMA sind alle Polyglutaminerkrankungen autosomal-dominant vererblich (H. T. Orr und Zoghbi 2007).

## 1.1 Historie, Epidemiologie und Klinik des Morbus Huntington

Der Begriff ‚Chorea‘ stammt vom griechischen ‚c(h)oreia‘, was Tanz bedeutet. Im medizinischen Sinn wurde der Begriff das erste Mal vom mittelalterlichen Chemiker Philippus Theophrastus Aureolus Bombastus von Hohenheim (auch: Paracelsus) verwendet und als St.-Veit-Tanz in die medizinische Nomenklatur aufgenommen. Die erste detailreiche Beschreibung der Chorea major geht zurück auf George Sumner Huntington (1850-1916). Er veröffentlichte 1872 einen Artikel, in dem er die Hauptcharakteristika der später als Chorea Huntington bekannten und nach ihm benannten Erkrankung folgendermaßen beschrieb (Huntington 2003; Neuauflage der Originalpublikation):

1. *its hereditary nature*
2. *the tendency to insanity, and [...] suicide*
3. *its coming on [...] as a grave disease, only in adult life*

Der Begriff ‚Chorea‘ bezeichnet keine Krankheit, sondern ein Symptom, das bei verschiedenen Erkrankungen auftreten kann. Es kommt dabei zu einer Funktionsstörung des Striatum, die (meist im Wachzustand) zu tänzelnden, unwillkürlichen Bewegungen der peripheren Körperpartien führt.

Der Morbus Huntington ist eine autosomal-dominant (Punnett 1908) vererbte, neurodegenerative Erkrankung mit einer weltweiten Prävalenz von 2,71 Betroffenen pro 100.000 Einwohner (Metaanalyse siehe Pringsheim et al. 2012). Es gibt starke regionale Schwankungen in der Prävalenz. So liegt sie in Europa, Nordamerika und Australien mit durchschnittlich 5,70 pro 100.000 deutlich höher als im asiatischen Raum mit durchschnittlich 0,4 pro 100.000 Einwohner (Metaanalyse siehe Pringsheim et al. 2012). Hinzu kommen erhebliche Prävalenzschwankungen in bestimmten regionalen Gebieten. 1963 wurde bekannt, dass in der Gegend des Maracaibo Sees in Venezuela eine starke Häufung von HD-Patienten vorliegt, die sich interessanterweise auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückführen lässt (Negrette 1963). Die Rate an Neumutationen ist bei HD eher gering. Entgegen früherer Annahmen liegt sie aber immerhin bei ca. 10% (Falush et al. 2001).

Der genetische Defekt, der HD zugrunde liegt, wurde 1983 auf dem p-Arm des Chromosom 4 lokalisiert (Subregion 4p16.3; Gusella et al. 1983). Bis zur Bestimmung des genauen Gens vergingen allerdings zehn weitere Jahre. 1993 wurde das *HTT-Gen (IT15)* von der „Huntington’s Disease Collaborative Research Group“ (HDCRG) beschrieben (HDCRG 1993). Molekulargenetisch handelt es sich bei der krankheitsverursachenden Mutation um eine CAG-Wiederholungs-Expansion im Exon 1 des *HTT-Gens*. Durch diese Expansion des für die Aminosäure Glutamin kodierenden CAG-Basentriplets kommt es zu einem verlängerten Polyglutamintrakt am N-Terminus des Huntingtin-Proteins.

Die Anzahl der CAG-Wiederholungen ist entscheidend für die Entstehung der Krankheit, aber auch für das Erstmanifestationsalter. Personen mit weniger als

27 CAG-Wiederholungen laufen keine Gefahr, an HD zu erkranken (Myers et al. 1993). Individuen, die 27-35 CAG-Wiederholungen aufweisen sind klinisch ebenfalls nicht betroffen. Die Frequenz dieser „Intermediären“-Gruppe wird auf 1,9% der Bevölkerung geschätzt (Goldberg et al. 1995). Da das expandierte *HTT* allerdings eine meiotische Instabilität aufweist, kann es zu einer CAG-Wiederholungsverlängerung bei der Weitergabe auf die Nachkommen kommen (Telenius et al. 1995). Kinder von gesunden Patienten mit 27-35 CAG-Wiederholungen weisen aufgrund dieser Antizipation die Gefahr auf, eine CAG-Wiederholungszahl von über 35 zu erreichen und damit in den pathologischen Bereich zu kommen. Antizipation ist generell von Bedeutung für die Vererbung der HD. Zwischen 36 und 39 CAG-Wiederholungen besteht unvollständige Penetranz. Vollständige Penetranz wird bei über 40 CAG-Wiederholungen beobachtet (Kremer et al. 1994; Rubinsztein et al. 1996; Zuhlke et al. 1993). Die meisten Erkrankten sind heterozygot (Durr et al. 1999; Kremer et al. 1994). Die Zahl der CAG-Wiederholungen beeinflusst die Progression und den Phänotyp der Erkrankung nur bei einer sehr großen Wiederholungszahl (Squitieri et al. 2002). Homozygote Allelträger weisen einen verstärkten Phänotyp, schnelleren Krankheitsverlauf und eine verstärkte Hirnatrophie auf (Squitieri et al. 2003).

Es besteht eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl an CAG-Wiederholungen und dem Erstmanifestationsalter der Erkrankung (Review siehe Langbehn et al. 2010). Diese erlaubt allerdings keine exakte Vorhersage des Erkrankungsalters, da die CAG-Wiederholungszahl nur zu etwa 50% entscheidend für das Erstmanifestationsalter ist (Squitieri et al. 2000). In einzelnen Familien kommt es, bei gleicher CAG-Wiederholungszahl, zu einem deutlich späteren Krankheitsbeginn (Tzagournissakis et al. 1995). Es wurden beispielsweise genotypische Variationen in den NMDA-Rezeptor (NR) Untereinheiten NR2A und NR2B für ein verändertes Erstmanifestationsalter ausgemacht (Arning et al. 2005).

Die Erkrankung ist kontinuierlich progredient und führt nach durchschnittlich 15-20 Jahren zum Tod (Foroud et al. 1999). Häufige natürliche Todesursachen sind beispielsweise die Aspirationspneumonie oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Heemskerk und Roos 2012).

Das typische Erstmanifestationsalter liegt zwischen 35 und 45 Jahren. Bei 5-10% der Erkrankten kommt es aber bereits vor dem 20. Lebensjahr zur Erstmanifestation. Daher muss dem dritten Punkt der Huntington'schen Trias (*"its coming on [...] as a grave disease, only in adult life"*; Huntington 2003) widersprochen werden. Bei der juvenilen „Westphal Variante“ kommt es zu einer früh manifestierenden sowie akinetisch-rigiden Form der HD (Westphal 1883). In diesen Fällen liegt zumeist eine paternale Vererbung vor (Srivastava et al. 1999). Betroffene Kinder können zudem an Epilepsie leiden (van Dijk et al. 1986). Auch späte Erstmanifestationen bis zum 80. Lebensjahr sind möglich (Lipe und Bird 2009).

Der klinische Phänotyp ist zumeist charakterisiert durch generalisierte Bewegungsstörungen, psychiatrische Auffälligkeiten und kognitive Leistungseinbußen (Walker 2007). In der Regel zeigt sich die Erkrankung zu Beginn mit psychiatrischen Auffälligkeiten, jedoch kann durch exakte klinische Messmethoden auch schon eine frühe motorische Veränderung detektiert werden (Penney et al. 1990).

Motorisch fallen die Patienten durch eine extrapyramidale Symptomatik mit unwillkürlichen, kurzen ausfahrenden choreatiformen Bewegungsstörungen auf. Typische klinische Zeichen sind die „Chamäleonzunge“ oder die Dysdiadochokinese. Im weiteren Verlauf kommt es zu Ballismus und Dysphagie. Bradykinesie und Rigor sind typische Spätsymptome der Erkrankung (Thompson et al. 1988).

Als frühe psychiatrische Krankheitszeichen treten depressive Verstimmungen und Persönlichkeitsveränderungen auf. Weiterhin wurde eine deutlich erhöhte Suizidrate bei Erkrankten und deren Nachfahren gefunden (Schoenfeld et al. 1984).

Es kommt zu einem progressiven demenziellen Syndrom mit Abbau der Merkfähigkeit und des Konzentrationsvermögens im Rahmen einer subcorticalen Demenz. Anders als beim Morbus Alzheimer (AD) treten Aphasie oder Apraxie aber erst in späten Stadien auf (Salmon et al. 1989).

Viele Patienten sind gezeichnet von Muskelschwund und kontinuierlichem Gewichtsverlust trotz konstanter Nahrungsaufnahme (Kirkwood et al. 2001). Neuere Studien deuten auf eine metabolische Dysfunktion im Aminosäurestoffwechsel bei HD hin (Mochel et al. 2007). Zudem ist das Stresshormon Cortisol deutlich erhöht (Leblhuber et al. 1995).

Die HD betrifft neuropathologisch vorrangig die Basalganglien und angrenzende Strukturen. Der Nervenzelluntergang tritt vor allem im Corpus caudatum, im Nucleus subthalamicus und im Putamen auf. Es kommt zum Verlust der striatalen mittelgroßen dornentragenden GABAergen Projektionsneurone (engl.: Medium spiny neuron; Calabresi et al. 1998; Ferrante et al. 1985) sowie zur cholinergen Dysfunktion striataler großer cholinergischer Interneurone (engl.: large cholinergic interneurons; Holley et al. 2015). Weiterhin betrifft die Neurodegeneration die Schichten V und VI des cerebralen Cortex (Hedreen et al. 1991). Die mittelgroßen dornentragenden GABAergen Projektionsneurone haben einen inhibitorischen Effekt auf die Basalganglienschleife. Durch Untergang der Neurone kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Dopamin und GABA und einer verstärkten Aktivierung des Thalamus und des motorischen Cortex, die für die unkontrollierten Bewegungen bei HD verantwortlich gemacht wird (Review siehe Joel 2001). In späten Krankheitsstadien findet sich oftmals ein atrophisches Gehirn mit breiten Sulci und geschrumpften Gyri (Rosas et al. 2008).

Derzeit gibt es keine kurative Therapie für HD. Die choreatischen Störungen sowie einige psychiatrische Symptome sprechen gut auf symptomatische Therapie an, während die Demenz kaum behandelbar ist (Wyant et al. 2017). Aktuelle Neuerungen wie das „genome editing“ geben aber Hoffnung, dass in den kommenden Jahrzehnten eine kausale Therapie möglich sein könnte. Zu klären bleibt dann allerdings, inwieweit ein schon existierender Phänotyp reversibel ist, oder ob bereits vor Auftreten der ersten Symptome mit einer Therapie begonnen werden muss.

## 1.2 Diagnose und Differentialdiagnostik

Die klassische Diagnostik der HD beinhaltet die folgenden drei Kriterien (Review siehe Vonsattel und DiFiglia 1998):

1. HD in der Familienanamnese
2. Progrediente Störungen in der willkürlichen Motorik mit Chorea oder Rigidität ungeklärter Ursache
3. Psychiatrische Auffälligkeiten mit Demenz ungeklärter Ursache

Heute werden Patienten mit diesen Symptomen einer humangenetischen Beratung und Diagnostik zugeführt.

Seit der Entdeckung des *HTT-Gens* spielt die direkte Gendiagnostik eine wichtige Rolle in der Diagnosestellung von HD. Sie ermöglicht allerdings auch die Durchführung einer prädiktiven Diagnostik. Diese sollte sich nur auf volljährige Risikopatienten beschränken. In der humangenetischen Beratung sollte über die variablen Krankheitsverläufe sowie über den genetischen Hintergrund aufgeklärt werden. Eine zusätzliche apparative Diagnostik mittels CT, MRT oder PET-CT kann zur Einschätzung des Fortschritts der Erkrankung herangezogen werden (Montoya et al. 2006). Differentialdiagnostisch sollten, bei fehlender DNA-Testung, beispielsweise die Schwangerschaftschorea, Medikamentennebenwirkungen, Morbus Wilson, Chorea minor (Sydenham), Lesch-Nyhan-Syndrom, systemischer Lupus erythematodes mit ZNS Beteiligung sowie weitere Polyglutaminerkrankungen (bspw. DRPLA, SCA17) ausgeschlossen werden.

## 1.3 Die physiologische Rolle von Huntingtin

Huntingtin ist ein ubiquitär im Körper vorkommendes Protein mit vorwiegend zytoplasmatischer Lokalisation. Es besteht aus über 3100 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ~ 349 kDa (abhängig von der Länge des Polyglutamintrakts). Die höchste Expression zeigt sich im Hoden und im Gehirn (Trottier et al. 1995). Das Huntingtin-Protein verfügt über zahlreiche „Huntingtin,

Elongation factor 3, Protein Phosphatase 2A and TOR1“-Domänen (HEAT-Domänen), die verschiedene Protein-Protein Interaktionen vermitteln und damit zu den diversen physiologischen Funktionen von Huntingtin beitragen, die im Folgenden genauer charakterisiert werden (Review siehe Schulte und Littleton 2011).

Die exakte Funktion von Huntingtin ist weiterhin unklar. Allerdings gibt es vermehrt Hinweise auf eine Multifunktionalität des Proteins, da es mit über 200 anderen Proteinen interagiert (Harjes und Wanker 2003; Kaltenbach et al. 2007). Wildtypisches Huntingtin scheint eine neuroprotektive Wirkung zu haben. So bewirkt es eine Hochregulation des brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in corticalen Neuronen mit Projektion ins Striatum, die für das Überleben striataler Neurone von Bedeutung ist (Canals et al. 2001; Zuccato et al. 2001). Eine weitere wichtige Funktion von Huntingtin besteht in der direkten inhibitorischen Interaktion mit Caspase-3 (Zhang et al. 2006). Ferner kommt es zu einer Verhinderung der Bildung des Apoptosomalen Komplexes (Rigamonti et al. 2000).

Wildtypisches Huntingtin scheint durch Interaktion mit Huntingtin-interagierendem Protein 1 (HIP1) die Aktivierung von Caspase-8 zu verhindern (Gervais et al. 2002). Dies geschieht durch eine Inhibierung der Bildung des HIP1-HIP1-Protein-Interaktor (HIPPI) Komplexes, der Caspasen aktiviert. Weiterhin wurde gezeigt, dass HIP1-Knockout-Mäuse weniger sensitiv gegenüber NMDA-induzierter Apoptose sind, weshalb HIP1 eine wichtige Rolle in der Exzitotoxizität zugeschrieben werden kann (Metzler et al. 2007).

Neuere Studien konnten zeigen, dass Huntingtin eine essentielle Rolle in der selektiven Autophagie und auch in der Mitophagie zukommt (Gelman et al. 2015; Ochaba et al. 2014; Rui et al. 2015). Huntingtin (insbesondere dessen C-terminale Domäne) funktioniert dabei als Adaptor-Protein, das Proteine, die degradiert werden sollen, in Kontakt mit der autophagischen Maschinerie bringt (Ochaba et al. 2014; Rui et al. 2015). Diese elementare Funktion kann im Weiteren nicht von mutiertem Huntingtin ausgeführt werden (Ochaba et al. 2014).

Huntingtin hat eine wichtige Bedeutung für den intrazellulären Vesikeltransfer (Gauthier et al. 2004; Velier et al. 1998) und die Rezeptor-vermittelte Endozytose (Waelter et al. 2001). Es ist von einer Rolle von Huntingtin im nukleären Transport von Transkriptionsfaktoren auszugehen (Cornett et al. 2005).

Huntingtin ist essenziell für die embryonale Entwicklung. Durch *gene targeting* generierte Huntingtin-Knockout-Mäuse versterben intrauterin an Tag 6-10 der embryonalen Entwicklung (Duyao et al. 1995). Die beobachtete embryonale Letalität konnte allerdings durch das Einbringen von humanem *mHTT* wieder aufgehoben werden (Leavitt et al. 2001). Dieses Erkenntnis weist darauf hin, dass die Anzahl an CAG-Wiederholungen für die embryonale Funktion des Huntingtin möglicherweise keine Rolle spielt. Dies wird auch durch die unauffällige embryologische Entwicklung von Menschen mit *mHTT* bestätigt.

Die Bedeutung von Huntingtin im adulten Organismus ist weiterhin nicht vollständig aufgeklärt. Bis vor wenigen Jahren war man der Meinung, dass Huntingtin auch im Erwachsenen eine essenzielle Bedeutung hat. So führt ein Ausschalten der Huntingtin-Expression am fünften Lebenstag im Gehirn und Hoden von Mäusen zu einer reduzierten Lebenszeit, Sterilität und einem progredienten motorischen Phänotyp (Dragatsis et al. 2000). Neuere Studien zeigen allerdings, dass ein selektives Abschalten der Huntingtin-Expression in Neuronen von vier Monate alten induzierbaren Huntingtin-Knockout-Mäusen zu verringerter Neurodegeneration führt. Jüngere Mäuse, bei denen Huntingtin im gesamten Körper abgeschaltet wird, entwickeln hingegen eine tödliche Pankreatitis (G. Wang et al. 2016). Eine weitere Studie konnte allerdings zeigen, dass durch das Abschalten der Huntingtin-Expression in 3-9 Monate alten Mäusen durchaus Probleme entstanden. So kam es zu Verhaltensauffälligkeiten und neuropathologischen Veränderungen, wie zum Beispiel einer bilateralen Verkalkung des Thalamus (Dietrich et al. 2017).

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass ein CRISPR/Cas9-vermitteltes Ausschalten von *mHTT* auf beiden Allelen im Striatum von homozygoten HD140Q knock-in-Mäusen die Neurotoxizität verringert. Dieser Knockout führte zu einem positiven Einfluss auf die Pathogenese der HD (Yang et al. 2017). Die

in diesen Studien beobachteten Effekte deuten auf eine alters- und gewebeabhängige Bedeutung von Huntingtin im adulten Organismus hin, die noch nicht abschließend aufgeklärt ist. Entgegen früherer Annahmen ist ein adulter „loss-of-function“ möglicherweise weniger involviert in die Neurodegeneration als bisher angenommen und ein Ausschalten des *HTT*-Gens könnte sogar protektiv wirken.

Es kann allerdings sicher davon ausgegangen werden, dass die Expansion des Polyglutamintrakts im Huntingtin-Protein zu neuen Funktionen führt („gain-of-function“). In zahlreichen (transgenen) HD-Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein des mutierten Huntingtin zu Neurodegeneration und phänotypischen Auffälligkeiten führt, auch wenn das endogene Huntingtin weiter exprimiert wird (Davies et al. 1997; Laforet et al. 2001; Reddy et al. 1998; Yamamoto et al. 2000).

#### 1.4 Molekulare Pathogenese der HD

Im Jahr 1994 stellten Max Ferdinand Perutz und Kollegen die Theorie auf, dass sich das mutierte, expandierte Huntingtin mit anderen Proteinen aneinanderlagert und dadurch intranukleäre Aggregate bildet (Perutz et al. 1994). Diese Theorie erhärtete sich in den folgenden Jahren durch erstmaligen Nachweis von Aggregaten in Zellkultur (Scherzinger et al. 1997), im Gehirn transgener HD-Tiermodelle (Davies et al. 1997) und schließlich auch in den Gehirnen verstorbener HD-Patienten (DiFiglia et al. 1997). Die Aggregate treten im gesamten Neuropil sowie als Neuronal Intranuclear Inclusions (NII) im Zellkern der Neuronen auf.

Obwohl Aggregation ein gemeinsames Charakteristikum verschiedener Polyglutaminerkrankungen ist, gibt es noch immer Debatten über die Bedeutung der Aggregation für die Pathogenese der Erkrankungen (Weber et al. 2014). Da die Anzahl der Aggregate im Verlauf der HD zunimmt und diese ein mikroskopisch sehr auffälliges Merkmal darstellen, wurden sie anfangs als Ursache der Pathogenese der HD verstanden. Mittlerweile gibt es allerdings

immer mehr Hinweise, dass die Aggregation für die Pathogenese nur von geringer Bedeutung ist oder sogar protektiv wirkt (Slow et al. 2005). Diese These wird durch ein vermehrtes Auftreten von Aggregaten in nicht von der Neurodegeneration betroffenen Interneuronen unterstützt (Kuemmerle et al. 1999). Darüber hinaus fand man in einem Mausmodell, das lediglich Exon-1 und -2 des mutierten Huntingtin exprimiert, zwar eine ausgeprägte Huntingtin-Aggregation und zahlreiche NII, aber keine phänotypischen oder neurodegenerativen Auffälligkeiten (Slow et al. 2005). Weiterhin ist die Apoptose-Rate in Zellen, die Huntingtin-Aggregate aufweisen, niedriger als in Zellen ohne Aggregate (Arrasate et al. 2004).

Die Aggregation ist in jedem Fall als Ausdruck einer zellulären Antwort auf das Vorhandensein des zelltoxischen mutierten Huntingtin zu sehen. Durch eine Interaktion der Huntingtin-Aggregate mit dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und dem Autophagie-System könnten Aggregate dazu beitragen, die intrazellulären Konzentrationen von toxischem mutierten Huntingtin zu verringern (Arrasate und Finkbeiner 2012). Die Aggregation ist ein Prozess zwischen Akkumulation neuer und dem Abbau vorhandener Aggregate (Martin-Aparicio et al. 2001). Verschiedene Pathways, die zur Bildung von Aggregaten führen, sind bekannt und können durch spezielle Inhibitoren beeinflusst werden (Jayaraman et al. 2012). Die Herstellung einer kausalen Verbindung zwischen der Bildung von Aggregaten und dem Prozess der Neurodegeneration gestaltet sich aber schwierig.

Huntingtin-Aggregate sind vielfach ubiquitiniert, was als Versuch der Zelle verstanden werden kann, die Aggregate für den Abbau im UPS zu markieren (Juenemann et al. 2015). Ubiquitin-Konjugationsenzyme treten ebenfalls vermehrt in Aggregaten auf und zwar sowohl *in vitro* (Jana et al. 2001; Wyttenbach et al. 2000) als auch *in vivo* (Jana et al. 2001). Allerdings könnte mutiertes Huntingtin resistent gegenüber einem proteasomalen Abbau sein, was die UPS-vermittelte Degradation verhindert (Jana et al. 2001).

Eine Beeinträchtigung des UPS kann zum Zelltod über Autophagie oder Apoptose führen. Eine Hochregulation der Autophagie führt zu einer vermehrten

Huntingtin-Degradation und zu weniger Aggregaten (Ravikumar et al. 2004). Bei HD ist dieser Mechanismus aber gestört, da es zwar zu einer vermehrten Formierung von Autophagosomen kommt, die Fusion mit den Lysosomen aber weniger stattfindet (Wong und Holzbaur 2014). Die daraus resultierenden leeren Autophagosomen werden wohl durch Defekte in der „cargo recognition“ verursacht, in der wildtypisches Huntingtin eine Rolle spielt (Martinez-Vicente et al. 2010). Diese Theorie wird auch durch eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an Autophagosomen und der Länge des Polyglutamintrakts in HD-Lymphoblasten gestützt (Nagata et al. 2004). Weiterhin ist die Apoptose aufgrund der Unfähigkeit des mutierten Huntingtin, Caspase-3 zu inhibieren, gestört (Zhang et al. 2006).

Aufgrund der bekannten Rolle des wildtypischen Huntingtin im intrazellulären vesikulären Transport erscheint es einleuchtend, dass die HD mit einer Störung der synaptischen Transmission einhergeht (Levine et al. 1999; Usdin et al. 1999). Darüber hinaus kommt es bei HD zu axonalen Degenerationen (H. Li et al. 2000).

Bei HD kommt es zu einer transkriptionellen Dysregulation (Cha 2007). Über seine Polyglutamin-domäne interagiert mutiertes Huntingtin unter anderem mit den Transkriptionsfaktoren cAMP response element-binding Protein (CREB; Schaffar et al. 2004; Steffan et al. 2000), TATA box binding protein (TBP; Schaffar et al. 2004) und specific-protein 1 (Sp1; S. H. Li et al. 2002). Mit dem pro-apoptotischen Transkriptionsfaktor p53 interagiert Huntingtin über seine SH3-Sequenz distal des Polyglutamintrakts (Steffan et al. 2000). Trotz dieser bekannten Interaktionspartner von Huntingtin gibt es zunehmend auch Hinweise, dass eine transkriptionelle Dysregulation weit weniger von Bedeutung für die molekulare Pathogenese sein könnte als bisher angenommen. So konnten bei HD R6/2-Mäusen keine Unterschiede der Transkriptions-Level HD-spezifischer Gene zwischen NII-positiven und NII-negativen Neuronen gefunden werden (Sadri-Vakili et al. 2006). Weiterhin kommt es zu reduzierten Protein-Leveln, beispielsweise von Chaperonen wie Hdj1, Hdj2 und Hsp70 ohne reduzierte korrespondierende mRNA-Level (Hay et al. 2004).

Die Polyglutaminexpansion im mutierten Huntingtin führt zu einer Fehlfaltung des mutierten Huntingtin (Arrasate und Finkbeiner 2012). Diese Fehlfaltung zieht Chaperone an, die als Hitzeschockproteine versuchen, die korrekte Faltung des mutierten Huntingtin wiederherzustellen. Die vorangegangenen erwähnten reduzierten Chaperon-Level bei HD und die zusätzliche Anziehung von Chaperonen an das fehlgefaltete mutierte Huntingtin sind im Besonderen interessant, da es bei HD zu einer Interaktion der Chaperone Hsp40 und Hsp70 mit Huntingtin-Aggregaten kommt (Arrasate und Finkbeiner 2012). Diese Interaktion mildert die von Huntingtin-Aggregaten verursachte Inhibition der Transkriptionsfaktoren CREB und TBP etwas ab (Schaffar et al. 2004). Allerdings könnte es durch Kolokalisierung der Chaperone mit Huntingtin-Aggregaten zu einer verminderten eigentlichen Funktion der Chaperone und konsekutiv zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine in der Zelle kommen (Review siehe Ho et al. 2001).

Mutiertes Huntingtin bindet direkt an das Mitochondrium (Choo et al. 2004; A. L. Orr et al. 2008) und verändert dessen metabolische Aktivität (A. L. Orr et al. 2008). Weiterhin zeigen Mitochondrien in Anwesenheit des mutierten Huntingtin Defekte in der Calcium-Pufferkapazität und ein verringertes Membranpotential (Panov et al. 2002). Die ATP-Generierung ist bei HD vermindert (Milakovic und Johnson 2005; Seong et al. 2005). Aufgrund der bedeutenden Rolle der Mitochondrien in der Induktion des programmierten Zelltods liegt eine Verbindung der Mitochondrien mit Apoptose und neuronalem Zellverlust bei HD nahe. Dies konnte sowohl in HD-Lymphoblasten (Sawa et al. 1999), als auch in HD-Myoblasten (Ciammola et al. 2006) von präsymptomatischen und symptomatischen HD-Patienten demonstriert werden. In beiden Versuchsreihen zeigte sich verstärkte mitochondriale Depolarisation sowie verstärkte Caspase-3 und -9-Aktivität. Eine vermehrte Cytochrom-C-Freisetzung und Caspase-8-Aktivität wurde in HD-Myoblasten gefunden. Mutiertes Huntingtin vermindert die Expression von peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ; Cui et al. 2006; Weydt et al. 2006), einem Transkriptions-Koaktivator, der eine zentrale Rolle im zellulären Energie-Metabolismus und in der mitochondrialen Proliferation spielt (Liang und Ward 2006). Kreuzung von

PGC-1 $\alpha$ -knockout-Mäusen mit HD knock-in-Mäusen führte zu einer vermehrten striatalen Neurodegeneration, während eine lentivirale Applikation von PGC-1 $\alpha$  ins Striatum von HD R6/2-Mäusen neuroprotektive Effekte zeigte (Cui et al. 2006). Weiterhin wird die durch mutiertes Huntingtin gestörte Funktion von PGC-1 $\alpha$  mit einer verminderten Induktion von reactive oxygen species (ROS)-abbauenden Enzymen in Verbindung gebracht, wodurch der zelluläre oxidative Stress erhöht wird (St-Pierre et al. 2006). Diese HD-assoziierten Veränderungen des mitochondrialen Calcium- und Energie-Haushalts sowie die gesteigerte Apoptose und Bildung reaktiver Sauerstoffradikale führen zu einer elementaren Rolle der Mitochondrien in der Pathogenese der HD.

Die Toxizität des mutierten Huntingtin wurde mit der Bildung N-terminaler Huntingtin-Fragmente in Verbindung gebracht (Nagai et al. 2007; Rigamonti et al. 2000; C. E. Wang et al. 2008). Diese N-terminalen Fragmente sind in der Lage, wichtige zelluläre Pathways zu beeinflussen (Zuccato et al. 2010), akkumulieren im Nukleus (Landles et al. 2010) und bilden Protein-Aggregate im Nukleus und im Zytoplasma (S. H. Li und Li 1998). In post-mortem Hirngewebe von HD-Patienten wurde gezeigt, dass NII nur durch N-terminale anti-Huntingtin Antikörper detektiert werden können (DiFiglia et al. 1997). Es wurde beobachtet, dass kürzere Huntingtin-Fragmente und solche mit einer längeren Polyglutaminsequenz schneller aggregieren (Hackam et al. 1998). Die meisten Proteine, die mit Huntingtin interagieren, binden an den N-Terminus des Proteins. Dazu gehören unter anderem die Transkriptionsfaktoren Sp1 und CREB. Die proteolytische Spaltung von mutiertem Huntingtin scheint also für die Pathogenese von gravierender Bedeutung zu sein.

In *Abbildung 1* sind die grundlegenden Pathomechanismen dargestellt, die bei HD eine Rolle spielen (Review siehe Gil und Rego 2008).

- Einleitung -

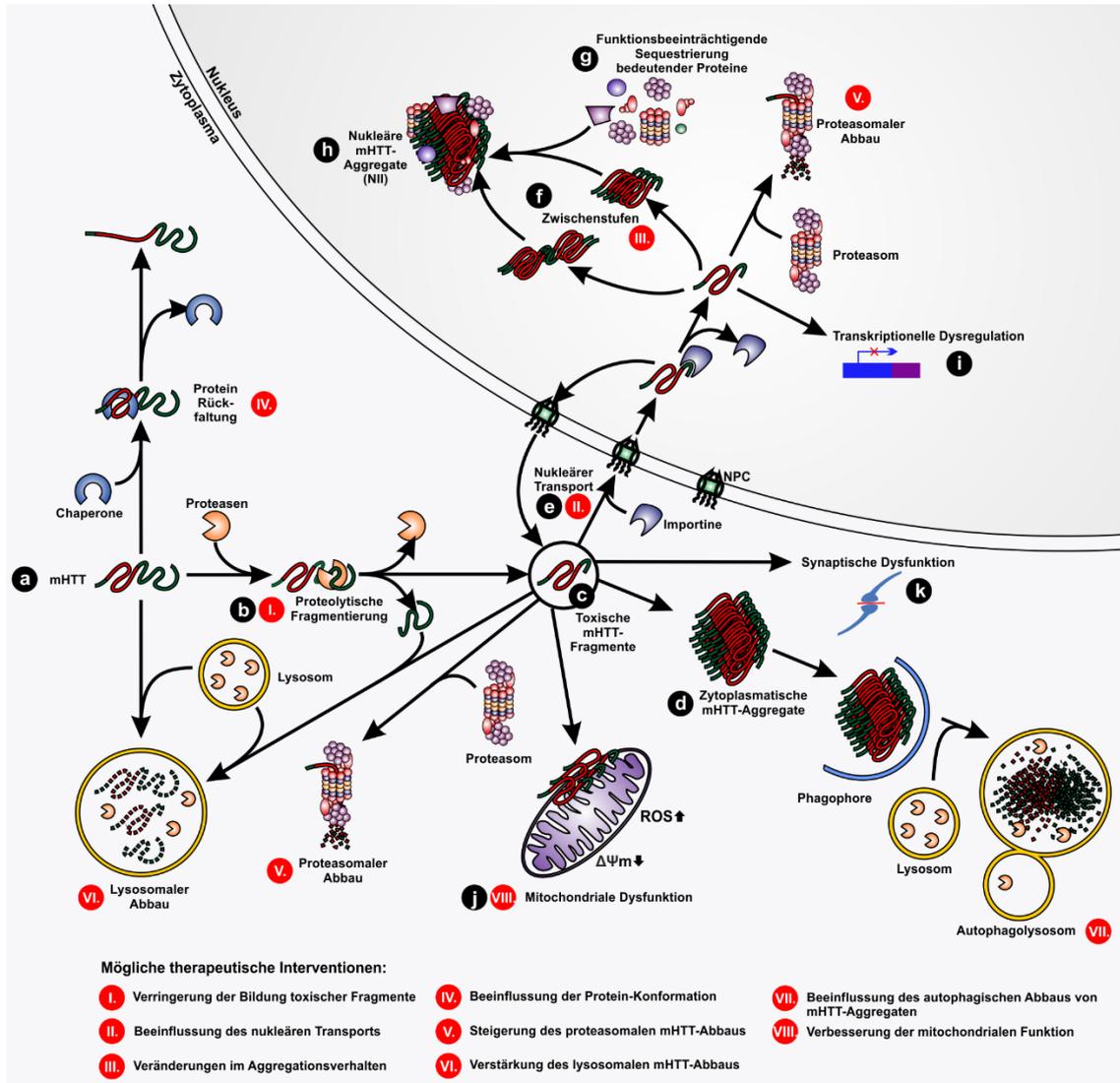


Abbildung 1 – **Molekulare Pathomechanismen bei HD.** Schematische Darstellung der von mutiertem Huntingtin vermittelten molekularen Pathomechanismen bei HD. Das mutierte Huntingtin (a) wird durch endogene Enzyme proteolytisch prozessiert (b) und bildet dadurch toxische Fragmente (c). Diese Fragmente sind in der Lage, zytoplasmatische Aggregate zu bilden (d). Alternativ kann das toxische Spaltprodukt auch in den Nucleus translozieren (e). Über Zwischenstufen (f) kommt es zur Bildung nukleärer Einschlusskörperchen (h), in die auch andere bedeutende zelluläre Proteine sequestriert werden können (g). Die Akkumulation von mutiertem Huntingtin kann zu Schädigungen diverser zellulärer Funktionen führen, wie beispielsweise transkriptionelle (i), mitochondriale (j) und synaptische Dysfunktion (k). Aus den dargestellten Pathomechanismen ergeben sich diverse mögliche Angriffspunkte für therapeutische Interventionen. So würde eine Verringerung der proteolytischen Prozessierung (I) von mutiertem Huntingtin zu weniger toxischen Fragmenten führen. Weitere mögliche Einflussnahmen wären eine Beeinflussung des nukleären Transports (II) und der nukleären Aggregation (III). Die Expansion im mutierten Huntingtin führt zur Fehlfaltung von mutiertem Huntingtin, weshalb eine verbesserte Chaperon-Aktivität zu Protein-Rückfaltung (IV) und damit zu besserer Funktionalität von mutiertem Huntingtin führen würde. Ein gesteigerter Abbau des mutierten Huntingtin und der Huntingtin-Aggregate über das Proteasom (V), Lysosom (VI) oder über Autophagie (VII) würde die Toxizität des mutierten Huntingtin ebenfalls vermindern. Abschließend würde auch eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion (VIII) zu einer erhöhten Viabilität führen. Abbildung übersetzt, modifiziert und um (i) und (k) ergänzt nach Weber et al. (2014). Bildlizenz: CC BY 3.0.

## 1.5 Proteolytische Spaltung und Calpaine bei HD

Die proteolytische Spaltung von mutiertem Huntingtin ist schon lange bekannt (bspw. Goldberg et al. 1996). Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Wirkungen N-terminaler Huntingtin-Fragmente führten zur Formulierung der „Hypothese der toxischen Fragmente“ (Wellington und Hayden 1997). Diese These wurde von Beginn an kontrovers diskutiert. In einem Mausmodell wurde beispielsweise gezeigt, dass die Expression von Exon-1 und -2 des mutierten Huntingtin zwar vermehrt NII zeigte, die Tiere aber weder phänotypische noch neurodegenerative Veränderungen aufwiesen (Slow et al. 2005). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass durch eine Schnittstellenmutation einer Caspase-6-abhängigen Schnittstelle im mutierten Huntingtin die Neurotoxizität in YAC-HD-Mäusen unterdrückt werden konnte (Graham et al. 2006). Diese und weitere im vorangegangenen Teil beschriebene Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass proteolytische Fragmentierung von mutiertem Huntingtin eine elementare Komponente in der Pathogenese der HD ist.

Als hauptverantwortlich für die proteolytische Spaltung von mutiertem Huntingtin können Caspasen (Goldberg et al. 1996) und Calpaine (Gafni und Ellerby 2002) angesehen werden. Es besteht aber Evidenz, dass auch Cathepsine (Y. J. Kim et al. 2006), Sekretasen (Kegel et al. 2010) und Matrix-Metalloproteasen (J. P. Miller et al. 2010) in die proteolytische Spaltung von mutiertem Huntingtin involviert sind. Als weitere Quelle für Huntingtin-Fragmente wurde ein aberrantes Spleißen der zugehörigen mRNA ausgemacht (Neueder et al. 2017).

Calpaine sind eine Calcium-abhängige Familie von Cysteinproteasen (Ono und Sorimachi 2012), die nicht nur ubiquitär im menschlichen Körper, sondern auch im Tier-, Pilz- und Pflanzenreich sowie bei einigen Bakterien vorkommen. Ein gemeinsames Charakteristikum dieser Proteasen ist das Vorhandensein zweier N-terminaler proteolytischer Kerndomänen (engl.: protease core domain; oder PC-1/-2). Im Menschen unterscheidet man 15 humane Calpaine, die in drei Gruppen unterteilt werden können: konventionell klassische (Calpain-1 und -2), unkonventionell klassische (Calpain-3, -8, -9, -11 bis -14) und nicht-klassische

Calpaine (Calpain-5, -6, -7, -10, -15 und -16). Die am besten untersuchten Calpaine sind die konventionell klassischen Calpaine. Diese sind Heterodimere, die eine C-terminale Calcium-bindende penta-EF-hand (PEF)-Domäne aufweisen sowie eine N-terminale große katalytische Untereinheit (engl.: catalytic subunit) und eine separate kleine regulatorische Untereinheit (engl.: calpain small subunit 1 (CSS1), früher auch: Calpain-4; Sorimachi et al. 2011). Die Calpain-Aktivierung wird durch Bindung von insgesamt 10 Calcium-Ionen vermittelt. Jeweils vier Calcium-Ionen binden an die beiden PEF-Domänen, je ein weiteres Calcium-Ion wird von den beiden proteolytischen Domänen PC-1/-2 gebunden (Hanna et al. 2008; Moldoveanu et al. 2008). Calpain-1 (auch:  $\mu$ -Calpain) unterscheidet sich von Calpain-2 (auch: m-Calpain) anhand der Calcium-Konzentrationen, die für deren Aktivierung in *In-vitro*-Experimenten notwendig sind. Während Calpain-1 bei mikromolaren Calcium-Konzentrationen (5–50  $\mu$ M) aktiv wird, wird Calpain-2 erst durch viel höhere, millimolare Calcium-Konzentrationen (0,2 bis 1 mM) aktiviert (Khorchid und Ikura 2002). Diese millimolaren Calcium-Konzentrationen bleiben in lebenden Zellen unerreicht und würden zytotoxisch wirken. Unter bestimmten Umständen kann es aber zu zytoplasmatischen Calcium-Strömen kommen, die entsprechend hohe lokale Calcium-Konzentrationen erzeugen können (Campbell und Davies 2012).

Die zellulären Funktionen, die von Calpainen übernommen werden, sind mannigfaltig. Calpaine werden auch als intrazelluläre Modulator-Proteasen bezeichnet, da sie die Struktur und Aktivität ihrer Substrate durch limitierte Proteolyse verändern (Sorimachi et al. 2011).

Calpaine spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen (Camins et al. 2006), aber auch bei vererbaren Calpainopathien (bspw. Gliedergürteldystrophie 2A) und bei Diabetes mellitus Typ II (del Bosque-Plata et al. 2004). Bei HD sind Calpaine überaktiviert (Gafni und Ellerby 2002). Eine Inhibition der Calpain-vermittelten proteolytischen Spaltung von mutiertem Huntingtin in HEK293T Zellen resultiert in weniger Proteolyse, weniger Aggregation und einer geringeren Toxizität (Gafni et al. 2004). Darüber hinaus scheint eine Überaktivierung von Calpainen mit synaptischer Dysfunktion durch

Calpain-abhängigen Verlust von NMDAR verbunden zu sein (Cowan et al. 2008; Dau et al. 2014; Gladding et al. 2012).

Bislang wurden drei definitive Calpain-abhängige Schnittstellen im Huntingtin-Protein identifiziert. Eine liegt zwischen Aminosäure 468-470 und eine weitere zwischen Aminosäure 535-537 (Gafni et al. 2004). Die dritte bekannte Schnittstelle liegt in der direkten Umgebung der Polyglutaminsequenz zwischen Aminosäure 63 und 111 und wird verstärkt geschnitten, wenn mehr als 36 Polyglutamine vorliegen (Sun et al. 2002). Eine posttranslationale Modifizierung von Huntingtin innerhalb der zweiten hier beschriebenen Schnittstelle konnte Einfluss auf die proteolytische Spaltung des Proteins nehmen. So inhibiert eine Phosphorylierung an der Stelle Ser536 die Calpain-vermittelte Spaltung von mutiertem Huntingtin und reduziert dadurch dessen Toxizität (Schilling et al. 2006). Eine weitere Calpain-abhängige Schnittstelle im N-Terminus des Huntingtin-Proteins wurde ausgemacht, aber noch nicht abschließend definiert (Ratovitski et al. 2009).

Neuere Studien weisen darüber hinaus auf eine Calpain-abhängige Beeinträchtigung der Autophagie bei HD hin. So konnte gezeigt werden, dass Calpaine Schlüsselproteine der Autophagie inaktivieren können, was zu einer Reduzierung dieses zellulären Recyclingmechanismus führen kann (Russo et al. 2011; Yousefi et al. 2006). In Anbetracht der mit HD assoziierten Calpain-Überaktivierung könnten sich hieraus weitere Probleme bei der Degradation des mutierten Huntingtin und seiner Aggregate ergeben. Ferner wurde gezeigt, dass die Level an Autophagosomen durch eine Überexpression des endogenen Calpain-Inhibitors Calpastatin in *Drosophila* und HD-Mäusen, die ein Exon-1-Fragment von mutiertem Huntingtin exprimieren, erhöht wurden und hierdurch die Aggregation reduziert wurde (Menziez et al. 2015).

Bei HD treten Störungen im Mitochondrium und im glatten endoplasmatischen Retikulum, den beiden bedeutendsten Calcium-Speichern der Zelle, auf. Die daraus resultierenden Störungen in der Calcium-Homöostase tragen erheblich zur beobachteten Calpain-Aktivierung bei (B. R. Miller und Bezprozvanny 2010). Es ergibt sich ein Teufelskreis aus mitochondrialer Dysfunktion, Calcium-

Dyshomöostase und Calpain-Aktivierung, der in *Abbildung 2* dargestellt ist (Clemens et al. 2015).

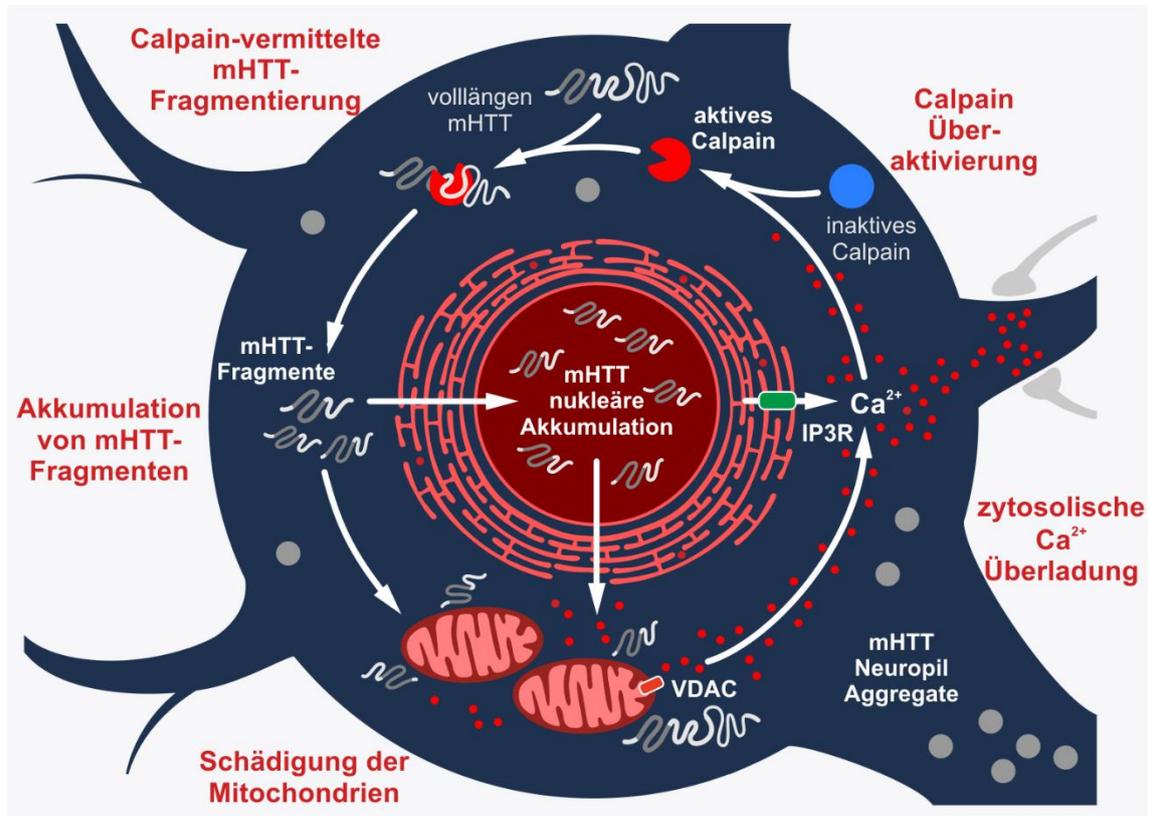


Abbildung 2 – **Hypothese des Calpain-vermittelten Teufelskreises der Neurodegeneration.** Bereits eine basale Calpain-Aktivierung führt zur proteolytischen Prozessierung von mutiertem Huntingtin (mHTT). Fragmente des mutierten Huntingtin aggregieren im Zytosol und im Nucleus und beeinträchtigen diverse zelluläre Mechanismen wie beispielsweise die mitochondriale Funktion. Die geschädigten Mitochondrien haben eine geringere Calcium-Pufferkapazität, wodurch es zur Calcium-Freisetzung ins Zytosol kommt. Zusätzlich werden auch Calcium-Speicher im endoplasmatischen Retikulum entleert. Die dadurch gestörte Calcium-Homöostase führt zu einer vermehrten Aktivierung von Calpainen und treibt die Proteolyse von mutiertem Huntingtin weiter an. Als wichtige Komponenten ihrer Zellorganellen sind die Kanäle VDAC (äußere Mitochondrienmembran) und IP3R (glattes endoplasmatisches Retikulum) in diesen Prozess involviert. Abbildung mit Genehmigung von Oxford University Press übersetzt und um VDAC ergänzt nach Clemens et al. (2015).

## 1.6 Mitochondrien-assoziierte Membranen und VDAC im Kontext der HD

In Anbetracht der bei HD auftretenden Störungen in der Calcium-Homöostase sind definierte Kontaktflächen zwischen Mitochondrium und endoplasmatischem Retikulum von besonderer Relevanz. Diese Mitochondrien-assoziierten Membranen (MAMs) haben diverse bedeutende Funktionen innerhalb der Zelle.

So spielen sie eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel und in der Calcium-Homöostase (Review siehe Krols et al. 2016). Weiterhin wurde eine Bedeutung von MAM im Kontext der Apoptose und der Autophagie gefunden (Hamasaki et al. 2013).

MAMs verbinden zwei der wichtigsten Calcium-Speicher der Zelle: Das glatte endoplasmatische Retikulum und das Mitochondrium. Um Calcium zwischen den beiden Zellorganellen austauschen zu können, werden spezielle Kontaktflächen benötigt. Diese machen etwa 12% der mitochondrialen Oberfläche aus (Csordas et al. 2006). In der Nähe solcher Kontaktflächen kommt es zu lokalen Calcium-Konzentrationen von bis zu 16  $\mu\text{M}$  (Csordas et al. 1999), was etwa dem 1000-fachen der normalen zytoplasmatischen Calcium-Konzentration entspricht. Derart hohe Calcium-Konzentrationen sind in der Lage, zu einer Calpain-Aktivierung zu führen (vgl. 1.5).

Strukturell vermittelt das Hitzeschockprotein grp75 (auch: Mortalin) die Verbindung zwischen dem mitochondrialen Porin voltage-dependent anion channel (VDAC) in der äußeren Mitochondrienmembran und dem Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor (IP3R) auf der Seite des endoplasmatischen Retikulums (Review siehe Decuypere et al. 2011). *Abbildung 5* zeigt den vereinfachten, schematischen Aufbau der MAM. Weitere strukturelle Komponenten, wie beispielsweise der Sigma-1-Rezeptor, Mitglieder der Bcl-2-Familie und Mitofusin-1 und -2, werden in dieser Arbeit nicht weiter diskutiert.

Auf der Seite des endoplasmatischen Retikulums spielt der IP3R eine wichtige Rolle für den Calcium-Haushalt. Der IP3R hat drei Isoformen (IP3R1-3), von denen IP3R3 trotz niedriger Expression die größten Effekte im mitochondrialen Calcium-Austausch in HEK293 Zellen zeigte und häufig in Membranen des endoplasmatischen Retikulums in der Nähe von Mitochondrien auftrat (Mendes et al. 2005). In Astrozyten hingegen kolokalisierte IP3R2 als häufigste Isoform in MAMs (Simpson et al. 1998). Bei HD wurde eine Interaktion von mutiertem Huntingtin und dem IP3R gefunden. Diese verstärkt den Calcium-Transfer zwischen endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrium (Bezprozvanny und Hayden 2004; Panov et al. 2002). Weiterhin ist bekannt, dass eine gesteigerte

IP3R1-vermittelte Calcium-Freisetzung ins Zytosol die Apoptose fördert (Stutzmann und Mattson 2011).

Ein moderater mitochondrialer Calcium-Import wird zur Induktion der ATP-Synthese benötigt, und transiente mitochondriale Calcium-Ströme gehen einher mit einer gesteigerten ATP-Produktion (Jouaville et al. 1999). Ein exzessiver mitochondrialer Calcium-Import induziert aber apoptotische Prozesse. So gilt VDAC als regulatorisches Protein zwischen Zelltod und Überleben der Zelle (Shoshan-Barmatz et al. 2010). Weiterhin wurde herausgefunden, dass niedrig-amplitudige Calcium-Signale eine regulatorische Funktion in der Apoptose einnehmen (De Stefani et al. 2011). Daraus ergeben sich elementare Funktionen des Kanals VDAC, die auch im Kontext von HD eine Rolle spielen könnten. Diese werden in *Abbildung 3* dargestellt.

Es existieren drei Isoformen von VDAC (VDAC1-3), die prinzipiell alle einen Calcium-Fluss zulassen (Review siehe Messina et al. 2012). VDAC1 ist aber die am meisten verbreitete Isoform (bspw. 65%-75% in PC12 Zellen; Karachitos et al. 2016).

Durch selektives Stilllegen der einzelnen VDAC-Isoformen in humanen Zervixkarzinom-Epithelzellen (HeLa Zellen) konnte gezeigt werden, dass VDAC1 pro-apoptotisch auf oxidativen Stress wirkt, während VDAC2 protektiv wirkt. Dagegen schien VDAC3 keinen bedeutenden Einfluss auf die Apoptose zu haben (De Stefani et al. 2011). Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht die Erkenntnis, dass eine Inhibition von VDAC1 mit 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfon Säure (DIDS) eine 5-Aminolävulinsäure vermittelte Apoptose in THP-1 Makrophagen verhindert (Chen et al. 2014). Interessanterweise ist nur ein Knockout von VDAC2 in Mausembryonen nicht überlebensfähig, was für eine bedeutende Rolle von VDAC2 in der Embryogenese spricht (Cheng et al. 2003). Jedoch zeigen VDAC1-Knockout-Mäuse Defekte in der Skelettmuskulatur und in einigen mitochondrialen Enzymen (Anflous et al. 2001). VDAC3-Knockout-Mäuse sind steril, was mit strukturellen Modifikationen im Axonem in Verbindung gebracht wurde, die zu einer Unbeweglichkeit der Spermien führen (Sampson et al. 2001). In murinen embryonalen Stammzellen zeigte eine Inaktivierung von

VDAC1, -2 oder -3 jeweils eine Reduktion in der Aktivität der Atmungskette, die aber durch die anderen Isoformen kompensiert werden konnte (Wu et al. 1999).

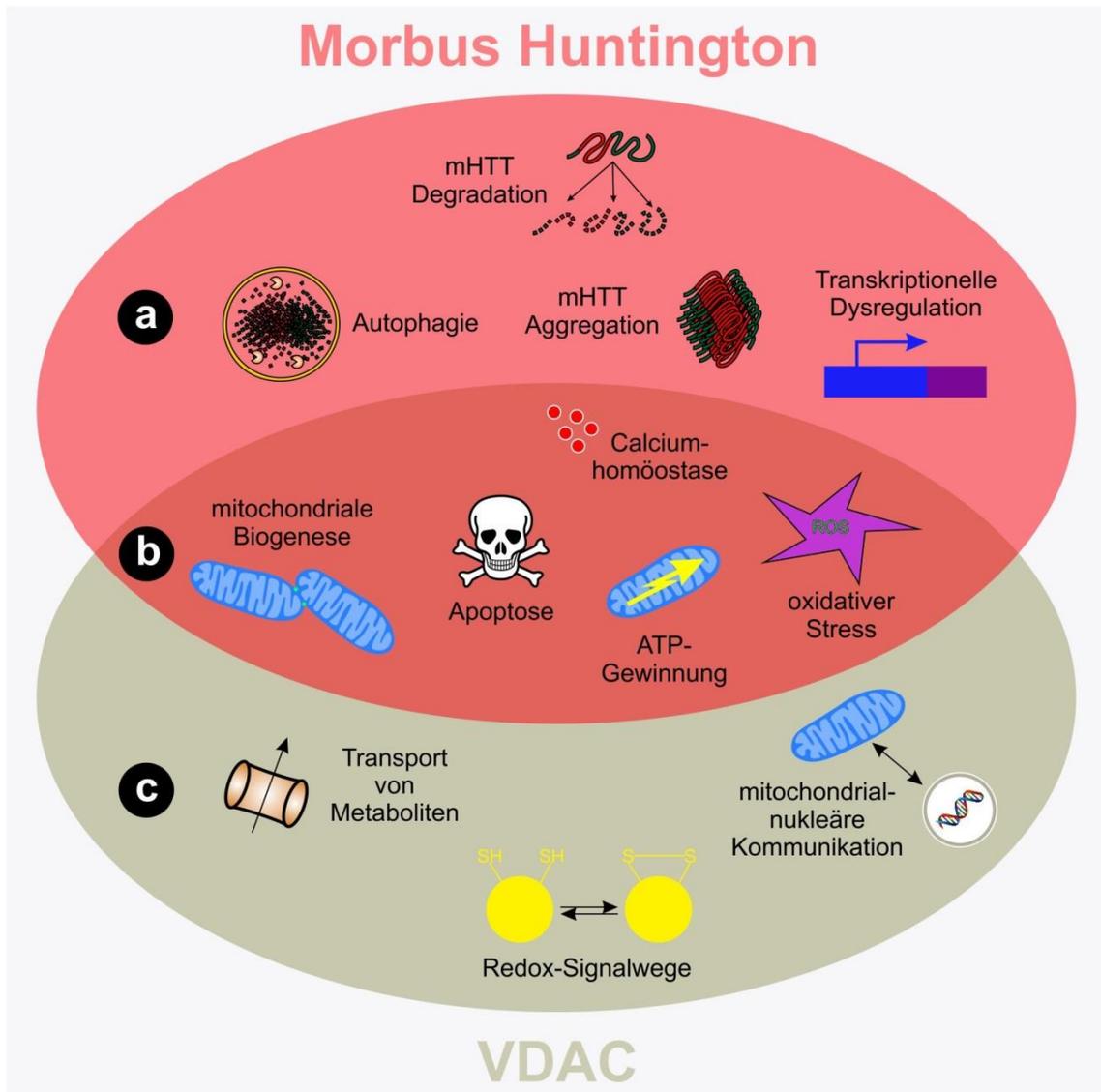


Abbildung 3 – **Mögliche Involvierung von VDAC in die Pathogenese der HD.** Schematische Darstellung zellulärer Prozesse, die in der HD eine Rolle spielen und solcher, die durch VDAC vermittelt werden. Die dargestellten Effekte werden entweder direkt durch mHTT (a) oder durch VDAC (c) verursacht. Das überlappende Gebiet (b) zeigt bestimmte Störungen in der mitochondrialen Funktion, die bei HD auftreten und durch eine gestörte Funktion von VDAC verursacht sein könnten. Abbildung nach Karachitos et al. (2015).

VDAC wird häufig als äußere Membrankomponente der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) beschrieben (Baines 2009). Weitere Komponenten sind der ADP/ATP-Transporter ANT1 und das regulatorische

Protein Cyclophilin D (Baines 2009). Die mPTP soll eine gravierende Rolle in der Cytochrom-C-Freisetzung und damit in der Induktion der Apoptose einnehmen (Tait und Green 2010). So führen hohe Calcium-Konzentrationen im Mitochondrium zu einer Öffnung der mPTP und einer Cytochrom-C-Freisetzung ins Zytoplasma (Rasola und Bernardi 2007). Interessanterweise haben sowohl Cytochrom-C als auch Caspase-3 einen positiven Feedbackmechanismus auf IP3R, sodass es zu weiterer Überladung des Mitochondriums mit Calcium kommt (Boehning et al. 2005). Zu bemerken ist allerdings, dass ein Knockout der diversen VDAC-Isoformen in Mäusen weder zu einer verminderten Formierung der mPTP, noch zu weniger Zelltod führte (Baines et al. 2007).

Neuronen sind sehr darauf angewiesen, dass in der Zelle ein ausgeglichener Energie-Metabolismus und ein effektiver Calcium-Puffer existiert. Es überrascht daher nicht, dass VDAC von Bedeutung für die Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen zu sein scheint (Review siehe Karachitos et al. 2015). Zu diesen gehören Morbus Alzheimer (Ferrer 2009; Ramirez et al. 2009), Amyotrophe Lateralsklerose (ALS; Fukada et al. 2004; Israelson et al. 2010), Epilepsie (Jiang et al. 2007) und Trisomie 21 (Yoo et al. 2001). Interessanterweise wirkt das zugelassene Parkinson-Medikament Rasagilin, eigentlich ein MAO-B-Hemmer, auch über eine verzögerte Öffnung von VDAC und wirkt dadurch zytoprotektiv (Youdim 2003). In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion von VDAC1 vor Morbus Alzheimer schützt und die mitochondriale Dysfunktion sowie synaptische Defizienz vermindert (Manczak et al. 2013). In Übereinstimmung damit wurde berichtet, dass eine Überexpression von VDAC1 zu einer Freisetzung pro-apoptotischer Proteine und damit zum Zelltod führt (Simamura et al. 2008; Yuan et al. 2008).

Es sind diverse Modulatoren von VDAC bekannt, die in *Tabelle 1* zusammengetragen wurden. Im Kontext der HD sind keine Daten bekannt, wie sich diese Medikamente auf klinische Parameter auswirken. Über eine Wirkung von VDAC auf die Calpain-vermittelte proteolytische Spaltung von mutiertem Huntingtin ist bisher noch nichts bekannt.

Tabelle 1 – Modulatoren von VDAC und ihr therapeutisches Potential. Ergänzt und modifiziert nach Karachitos et al. (2015).

Substanz	Mechanismus	VDAC Leitfähigkeit	Zelltod	Therapeutisches Potential	Klinischer Status	Referenzen
<b>Cisplatin</b>	Direkte Interaktion, VDAC1-Hochregulation	Unbekannt	Pro-apoptotisch	Chemotherapeutische Apoptose-Induktion	Handelsname: Cisplatin; Chemotherapeutische Krebsbehandlung	(Shoshan-Barmatz und Ben-Hail 2012)
<b>DIDS</b>	Direkte Interaktion, Inhibiert die mitochondriale Superoxidfreisetzung	Reduziert	Pro-Überleben	Unbekannt	Präklinisch	(Shoshan-Barmatz und Ben-Hail 2012)
<b>DMA III</b>	Direkte Interaktion	Unbekannt	Pro-apoptotisch	Chemotherapeutische Apoptose-Induktion	Präklinisch	(Naranmandura et al. 2012)
<b>Erasin</b>	Inhibiert die VDAC-Oligomerisierung, reduziert die VDAC-Permeabilität für NADH	Unbekannt	Pro-apoptotisch	Chemotherapeutische Apoptose-Induktion	Präklinisch	(Yagoda et al. 2007)
<b>FNQs</b>	VDAC-abhängige ROS-Produktion	Unbekannt	Pro-apoptotisch	Chemotherapeutische Apoptose-Induktion	Präklinisch	(Simamura et al. 2008)
<b>Itraconazol</b>	Direkte Interaktion, reduziert die ATP-Freisetzung, AMPK-Aktivierung	Unbekannt	Unbekannt; pro-apoptotisch über Hedgehog im Magenkarzinom	Chemotherapeutische Apoptose-Induktion	Etabliertes Antimykotikum, Mögliche Anwendung in der Krebstherapie	(Head et al. 2015; Hu et al. 2017)
<b>Methyl-jasmonate</b>	Inhibiert die HK-VDAC-Interaktion	Unbekannt	Pro-apoptotisch	Chemotherapeutische Apoptose-Induktion	Präklinisch	(Palmieri et al. 2011)
<b>Minocycline</b>	Direkte Interaktion	Reduziert/moduliert	Pro-Überleben	Zytoprotektiv, auch neuroprotektive und immunmodulierende Eigenschaften	Fallberichte bei präkanzerösen Hautläsionen Fallberichte: Vielversprechend bei Schizophrenie, Psychosen und bipolaren Störungen Klinische Studien zeigten keine Wirkung bei ALS und HD, aber bei Morbus Parkinson (Phase II). Gegenwärtig klinische Studien zu Morbus Alzheimer (Phase II), Schlaganfall (Phase I-IV) und Fragile X-Syndrom	(Casha et al. 2012; Chaudhry et al. 2012; Garcia-Martinez et al. 2010)
<b>Oblimersen (G3139)</b>	Direkte Interaktion	Blockiert	Pro-apoptotisch	Chemotherapeutische Apoptose-Induktion	Handelsname: Genasense; Über 45 klinische Studien, auch an Lymphomen und Melanomen; keine klinische Anwendung	(Tikunov et al. 2010)
<b>Olesoxim (TRO19622)</b>	Bindet direkt, Inhibierung der Bildung der mPTP	Unbekannt	Pro-Überleben	Neuroprotektiv	Klinische Studien in ALS und SMA	(Bertini et al. 2017; Bordet et al. 2007; Lenglet et al. 2014)
<b>Rasagiline</b>	Direkte Interaktion	Reduziert/verspätete Öffnung	Pro-Überleben	Zytoprotektiv	Handelsname: Azilect; Anwendung in PD; insgesamt 44 klinische Studien; Auch untersucht für die Behandlung von AD	(Youdim 2003)

## 1.7 Der Wirkstoff Olesoxim als potentiell neuroprotektives Therapeutikum

Aufgrund des immer tiefer greifenden Verständnisses der Pathomechanismen, die bei HD eine Rolle spielen, gibt es zahlreiche mögliche Angriffspunkte für eine kausale Therapie (Review siehe Wild und Tabrizi 2014). Zu den vielversprechendsten Ansätzen zählt beispielsweise eine Reduktion der Expression von mutiertem Huntingtin durch Antisense-Oligonukleotide. Eine (bspw. CRISPR/Cas9-vermittelte) Reparatur des Gendefektes wäre sicher die effektivste Therapie. Präklinische Studien belegen bereits, dass ein solcher genetischer Eingriff in Mäusen möglich ist (Yang et al. 2017). Die klinische Anwendung einer intrathekal applizierten Antisense-Oligonukleotid-Therapie bei HD wird bereits erprobt (Tabrizi et al. 2019; van Roon-Mom et al. 2018) und zeigt erste, vielversprechende Resultate bei guter Verträglichkeit. Dass ein solcher Antisense-Oligonukleotid-gerichteter Ansatz zielführend sein kann zeigt auch die FDA-Zulassung des Medikaments „Zolgensma“ (Novartis, Basel, Schweiz), das seit Mai 2019 in den USA zur Therapie der SMA bei Säuglingen und Kleinkindern verwendet wird.

Eine einfacher zu realisierende therapeutische Option ist die Verwendung sogenannter small molecules. Zu diesen zählt das von der Firma Trophos (Marseille, Frankreich) entwickelte Medikament Olesoxim (auch: TRO19622; Bordet et al. 2007).

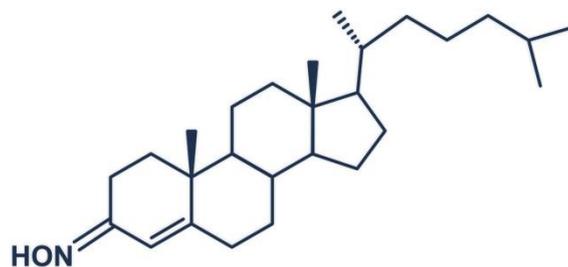


Abbildung 4 – **Strukturformel von Olesoxim (TRO19622)**. Als Bindungsstelle für VDAC wird der ungesättigte A-Ring des Moleküls angenommen. Die Bindung wird erst durch die 5 $\beta$ -Konformation von Olesoxim möglich (Bordet et al. 2007).

Olesoxim ist ein kleines, Cholesterol-ähnliches Molekül, das in der Umgebung des Mitochondriums akkumuliert (Bordet et al. 2010). Es wurde nachgewiesen, dass Olesoxim an zwei Proteine der äußeren Mitochondrienmembran bindet (siehe *Abbildung 5*) – VDAC und TSPO (Bordet et al. 2007).

Der in dieser Arbeit untersuchte Kanal VDAC könnte eine direkte Brücke schlagen zum „Teufelskreis der Calpain-vermittelten Neurodegeneration“ (dargestellt in *Abbildung 2*) und zu einer durch MAM-Deregulation verursachten zellulären Calcium-Dyshomöostase (Clemens et al. 2015). Olesoxim könnte ein geeignetes Therapeutikum darstellen, um diesen Teufelskreis zu durchbrechen.

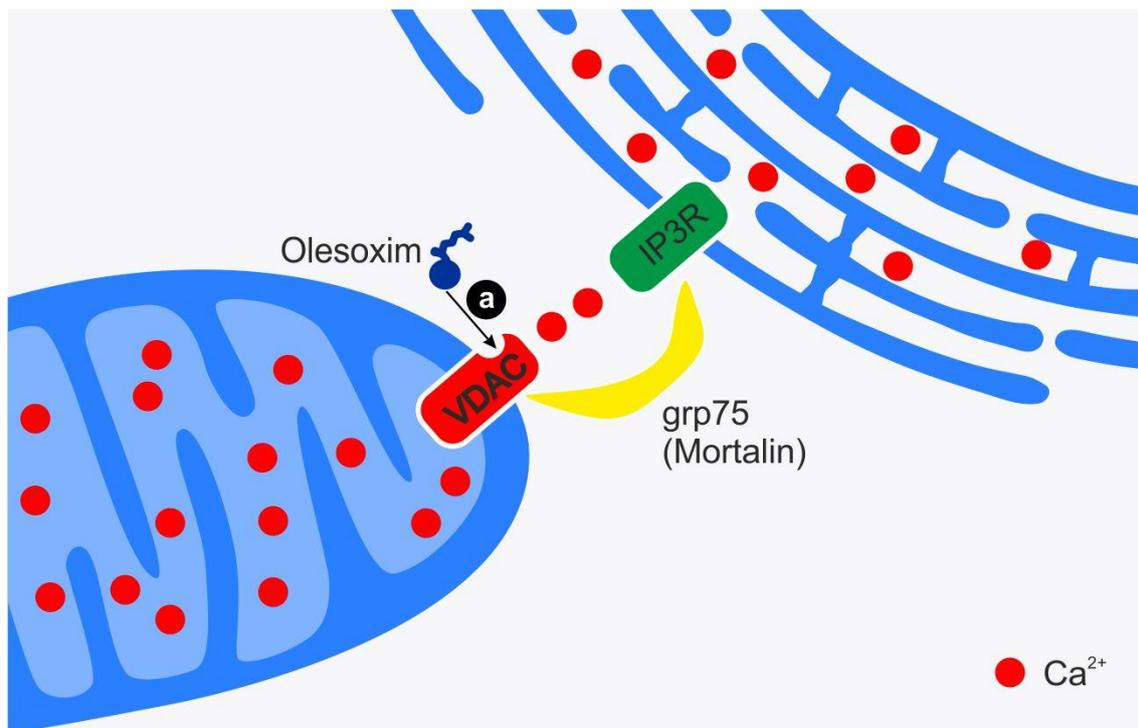


Abbildung 5 – Vereinfachte Darstellung der strukturellen Komponenten Mitochondrien-assoziiierter Membranen (MAM). Das Protein grp75 (auch: Mortalin) stellt eine Verbindung zwischen VDAC in der äußeren Mitochondrienmembran und dem IP3-Rezeptor im glatten endoplasmatischen Retikulum her. Über diese Verbindung fließen Calcium-Ströme zwischen Mitochondrium und endoplasmatischem Retikulum, die regulatorische Funktionen einnehmen. Das small molecule Olesoxim könnte an den Kanal VDAC binden und dessen Leitfähigkeit für Calcium beeinflussen (a).

Es wurde gezeigt, dass Olesoxim neuroprotektiv wirkt und die Cytochrom-C-Freisetzung aus dem Mitochondrium reduziert (Bordet et al. 2007). Weiterhin inhibiert Olesoxim die Bildung der mPTP (Bordet et al. 2010). Interessanterweise

wurde beobachtet, dass der Neurotransmitter GABA die Bindung von Olesoxim an VDAC verstärkt, woraus die Hypothese entstand, dass Olesoxim in Synapsen seine maximale Wirkung entfaltet (Bordet et al. 2007). Im Einklang damit steht ein verstärkender Effekt von Olesoxim auf die neuronale Aussprossung (Rovini et al. 2010).

Olesoxim hat positive Effekte auf die Myelinisierung von Nervenscheiden (Y. Li et al. 2013; Magalon et al. 2012) und kommt daher auch als potentielles Therapeutikum für die Multiple Sklerose in Frage. Dieser Ansatz wurde zusätzlich gestärkt, da Olesoxim positive Effekte bei der Differenzierung von Oligodendrozyten hat (Magalon et al. 2016).

Im Kontext der HD konnte festgestellt werden, dass Olesoxim die mitochondriale Membranfluidität, die bei HD erhöht ist, wieder auf normale Level senken kann (Eckmann et al. 2014).

Die neuroprotektiven Effekte von Olesoxim wurden bereits in einem Mausmodell für ALS (L. J. Martin 2010; Sunyach et al. 2012) und in den HD-Tiermodellen BACHD-Ratte (Clemens et al. 2015) und *Hdh*<sup>Q111</sup> knock-in-Maus (Weber et al. 2016) gezeigt. In der BACHD-Ratte zeigten Olesoxim-behandelte Tiere einen verbesserten kognitiven und psychiatrischen Phänotyp. Es kam zu einer verminderten Abnahme der Dicke des frontalen Cortex sowie zu Verbesserungen in den molekularen Markern der HD (Huntingtin-Fragmentierung, -Aggregation und mitochondriale Dysfunktion). Die Veränderungen in der Huntingtin-Fragmentierung und -Aggregation wurden einer Herabregulation des Calpain-Systems in Olesoxim-behandelten Ratten zugeschrieben (Clemens et al. 2015). Olesoxim ist damit das erste small molecule, welches die Calpain-abhängige Fragmentierung von mutiertem Huntingtin im Tiermodell effektiv verringern konnte (Clemens et al. 2015).

Die Anwendung des bis dato experimentellen Medikaments kann oral erfolgen. Trotz seines steroidähnlichen Charakters ist die Pharmakodynamik sicher, und in Studien am Menschen zeigten sich keine größeren Nebenwirkungen (Lenglet et al. 2014). Eine klinische Phase 3 Studie an ALS-Patienten zeigte keine positiven krankheitsbeeinflussenden Effekte von Olesoxim (Lenglet et al. 2014).

Nach anfänglichen positiven Ergebnissen einer zwei Jahre dauernden klinischen Phase 2 Studie, in der Olesoxim an Patienten mit spinaler Muskelatrophie (SMA) getestet wurde (Bertini et al. 2017), kam es 2018 zu einem Abbruch der Entwicklung einer Olesoxim-Therapie für SMA aufgrund enttäuschender Endergebnisse. Olesoxim war auch in dieser Studie von den Patienten gut vertragen worden und war sicher in der Anwendung.

Der genaue Wirkmechanismus von Olesoxim ist weiterhin unklar.

## 1.8 Zielsetzung

VDAC nimmt eine elementare Funktion in der Apoptose-Induktion und im Energie-Stoffwechsel der Zelle ein. Weiterhin ist VDAC als bedeutender Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran ein wichtiger Regulator der mitochondrialen Funktion.

Da es bei HD zu einer Störung des Energie-Stoffwechsels, mitochondrialer Dysfunktion, einer gestörten Calcium-Homöostase, vermehrter ROS-Freisetzung und einer Induktion der Apoptose kommt und all diese Funktionen prinzipiell mit VDAC assoziiert sind, ist es wichtig, die Bedeutung von VDAC bei HD besser zu verstehen. Da VDAC als Komponente von MAM eine bedeutende Rolle in der Calcium-Homöostase der Zelle einnimmt, soll eine Beeinflussung des Calpain-Systems durch VDAC untersucht werden. Diese ist von besonderer Bedeutung, da Calpaine mutiertes Huntingtin schneiden und dadurch toxische N-terminale Huntingtin-Fragmente erzeugen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des wichtigen VDAC-Subtyps VDAC1 in *Hdh*<sup>Q111</sup> knock-in-Mäusen untersucht. Anschließend wurde ein *In-cellulo*-Modell erzeugt, in dem Calpaine durch Herabregulation des endogenen Calpain-Inhibitors Calpastatin überaktiviert wurden. Dieses *In-cellulo*-Modell soll zum Vergleich mit den *In-cellulo*-Effekten einer genetischen Beeinflussung von VDAC1 (Herabregulation, Überexpression und Knockout) sowie einer pharmakologischen Inhibition von VDAC (mittels Itraconazol) dienen.

Es wurden in allen *In-celluo*-Experimenten zentrale molekulare Charakteristika der HD untersucht. Zu diesen zählen die Calpain-Aktivierung sowie die Huntingtin-Fragmentierung und -Aggregation.

Eine medikamentöse Beeinflussung von VDAC ist mit vorhandenen Wirkstoffen bereits möglich und könnte damit eine vielversprechende therapeutische Option für HD darstellen.

## 2 Material und Methoden

Im Folgenden werden die für die Arbeit benötigten Materialien in tabellarischer Form aufgelistet. Anschließend werden die methodischen Vorgehensweisen erläutert, die dieser Arbeit zu Grunde liegen. Zur Etablierung dieser Methoden wurden technische Optimierungen durchgeführt um bestmögliche Protein-Stabilität und Reproduzierbarkeit zu erreichen.

### 2.1 Materialauflistung

#### 2.1.1 Technische Unterstützung, Geräte und Software

Tabelle 2 – Auflistung von verwendeten technischen Geräten.

Gerät	Modell	Hersteller
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator</b>	CB150	Binder, Tuttlingen, DE
	CB 210	
<b>Filter-Retardation-Assay Geräte</b>	Millivac Vakuumpumpe	Millipore GmbH, Schwalbach, DE
	Minifold II Mikrofiltrationsgerät	Schleicher & Schuell, Dassel, DE
<b>Gelsysteme (SDS-PAGE)</b>	Mini Protean Casting Module	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
	Mini-Protean Tetra Cell	
	Mini Gel Tank	Life Technologies, (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA
	TE22 Mighty Small Transfer Tank	Hoefer Inc., Holliston, USA
<b>Gewebe-homogenisator</b>	Ultra-Turrax-Disperser	VWR International, Radnor, USA
<b>Heizblöcke</b>	Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	ThermoStat Plus	
<b>Kamera</b>	AxioCam MRm	Carl Zeiss, Jena, DE
<b>Magnetrührer</b>	Heidolph MR3000	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, DE
	Heidolph MR3002	
	IKAMAG REO	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
<b>Mikroskop</b>	Eclipse TS100	Nikon, Tokyo, JP
<b>Mischgeräte</b>	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE

- Material und Methoden -

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
	RM 5-40	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, DE
<b>Multi-Detektions- Leser</b>	Synergy HT	BioTek U.S., Winooski, USA
	Odyssey Fc Dual-Mode Imaging System	Li-COR Bioscience, Lincoln, USA
<b>Netzgeräte</b>	Consort EV231	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
	Consort EV835	
	EPS 301	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
<b>pH-Meter</b>	S20 SevenEasy pH	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE
<b>Photometer</b>	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	Mit Eppendorf µm Cuvette G1.0	
<b>Schüttelinkubator</b>	Multitron HT	Infors GmbH, Einsbach, DE
<b>Sterilbänke</b>	HERAsafe HS 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
	HERA safe HS 18	
<b>Ultraschall- homogenisator</b>	UW 2200	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
	Sonotrode Mikrospitze MS 73	
	Boosterhorn SH 213 G	
	Netzgerät Sonopuls HD2200	
<b>Vakuumpumpen</b>	LABOPORT	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
	ECOM-P 4153	Eppendorf AG, Hamburg, DE
<b>Vortexer</b>	Vibro-Fix VF2	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
	REAX Control	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
	Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg, DE
<b>Waagen</b>	Precisa XB 620M	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
	Precisa XT 6200C-FR	
<b>Wasseraufberei- tungssysteme</b>	Quantum EX	Millipore GmbH, Schwalbach, DE
<b>Zell-Zählkammer</b>	Neubauer improved Zählkammer Bright Line, Assistent, Tiefe: 0,1 mm; Fläche: 0,0025 mm <sup>2</sup>	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, DE
<b>Zentrifugen</b>	Centrifuge 5418 Centrifuge 5417C Centrifuge 5810 Kühlzentrifugen: Centrifuge 5415R Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, DE

- Material und Methoden -

Tabelle 3 – Auflistung von verwendeter Software. (Lediglich Windows-Versionen).

Software	Anbieter
Corel Draw Suite X8	Corel GmbH, München, DE
Gen5 Data Analysis Software	BioTek U.S., Winooski, USA
GraphPad Prism V6.00	GraphPad Software, Inc.
Image Studio Software Ver. 2.1	Li-COR Bioscience, Lincoln, USA
ImageJ v. 1.46r foto software	Opensource, siehe Schneider et al. (2012)

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Zur Vorbereitung der verwendeten Puffer wurden Chemikalien höchster Reinheit der Hersteller AppliChem (Darmstadt, DE), Carl Roth (Karlsruhe, DE), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und VWR International (Dietikon, CH) verwendet.

Tabelle 4 – Auflistung von zur Gelherstellung verwendeter Puffer und Chemikalien.

Lösung/Puffer	Inhaltsstoff	Konzentration
10% APS-Lösung	Ammoniumpersulfat	10% (w/v)
BisTris 3,5 x Puffer pH 6,65	BisTris	1,25 M
TEMED	Tetramethylethyldiamin	Min. 99% (v/v)
Tris-Glycin Sammelgel-Puffer pH 6,8	Tris-HCl	0,5 M
Tris-Glycin Trenngel-Puffer pH 8,8	Tris-HCl	1,5 M

Tabelle 5 – Auflistung von für die SDS-PAGE verwendeter Ladepuffer.

Lösung/Puffer	Inhaltsstoff	Eingesetzte Menge
4x LDS-Ladepuffer pH 8,5	Tris-HCl 2,5 M pH 8,5	4 ml
	Glycerin 86%	5 ml
	Phenolrot 1%	0,25 ml
	LDS	0,7 g
	EDTA	0,006 g
	optional: Coomassie G250 1%	0,75 ml
4x Lämmli-Ladepuffer pH = 6,8	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	5 ml
	Glycerin 86%	4,69 ml
	Bromphenolblau 1%	1 ml
	LDS	0,4 g

- Material und Methoden -

Tabelle 6 – Auflistung von für die SDS-PAGE und Immundetektion verwendeter Puffer.

Lösung/Puffer	Inhaltsstoff	Konzentration
<b>Blocking-Puffer</b>	Slim Fast ® in TBS	5% (w/v)
<b>MES-Laufpuffer 20x</b>	MES Tris-Base SDS EDTA	1 M 1 M 69,3 mM 20,5 mM
<b>MOPS-Laufpuffer 20x</b>	MOPS Tris-Base SDS EDTA	1 M 1 M 69,3 mM 20,5 mM
<b>Ponceau S-Lösung</b>	Ponceau S HAc	0,1% (w/v) 5% (v/v)
<b>Stripping-Puffer pH 2,0</b>	Glycin SDS Tween 20	25 mM 1% (w/v) 1% (v/v)
<b>TBS 10x</b>	Tris-HCl NaCl	100 mM 1,5 M
<b>TBS-T 20x</b>	Tris-HCl NaCl Tween 20	200 mM 3 M 2% (v/v)
<b>Transferpuffer 20x (für BisTris und Tris-Acetat Gele)</b>	Bicine BisTris EDTA	500 mM 500 mM 20,5 mM
<b>Tris-Acetat-Laufpuffer 20x</b>	Tricine Tris-Base SDS	1 M 1 M 70 mM
<b>Tris-Glycin-Laufpuffer 10x</b>	Glycin Tris-Base SDS	1,91 M 250 mM 1% (w/v)
<b>Tris-Glycin-Transferpuffer 10x</b>	Glycin Tris-Base	1,91 M 250 mM

Tabelle 7 – Bakterienkultur und Lyse-Puffer.

Lösung/Puffer	Inhaltsstoff	Konzentration/ Menge
<b>Ampicillin-Stocklösung</b>	Ampicillin	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
<b>Kanamycin-Stocklösung</b>	Kanamycin	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O

- Material und Methoden -

Lösung/Puffer	Inhaltsstoff	Konzentration/ Menge
<b>LB-Medium</b>	NaCl Tryptophan Hefextrakt ddH <sub>2</sub> O	10 g 10 g 5 g 1 l
<b>RIPA-Basispuffer (1x)</b> pH = 7,5	Tris-HCl NaCl Triton-X100 + Complete Protease Inhibitor	50 mM 150mM 1% (v/v)
<b>RIPA-Detergenz (10x)</b> pH = 7,5	Tris-HCl NaCl Triton-X100 SDS SDC	50 mM 150 mM 1% (v/v) 5% (w/v) 1% (w/v)
<b>RIPA-Lysepuffer</b> pH = 7,5	Tris-HCl NaCl SDS SDC Triton-X100 + Complete Protease Inhibitor (+ PhosStop)	50 mM 150 mM 0,1% (w/v) 0,5% (w/v) 1% (v/v)

### 2.1.3 Chemikalien, Kits und Transfektionsreagenzien

Tabelle 8 – **Verwendete Chemikalien, Kits und Transfektionsreagenzien.**

Name	Hersteller	Katalognummer
<b>Attractene</b>	Qiagen, Venlo, NL	301007
<b>Complete Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free)</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	05892791001
<b>CyTRAK Orange</b>	BioStatus, Shepshed, UK	CO50050
<b>PhosSTOP</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	04906845001
<b>Pierce Bovine Serum Albumin Standard Ampules (2 mg/ml)</b>	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	23209
<b>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</b>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	500-0006
<b>QIAprep Spin Miniprep Kit</b>	Qiagen, Venlo, NL	27106
<b>Slim-Fast ®</b>	Allpharm Vertriebs-GmbH, Messel, DE	02418318
<b>Western Bright ECL/Sirius Chemiluminescent Detection Kit</b>	Advansta Inc., Menlo Park, USA	K-12045-D50/ K-12043-D10

## 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9 – **Verwendete Verbrauchsmaterialien.**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
<b>Amersham Hybond 0.2 µm PVDF Membrane</b>	GE Healthcare Life Science, Amersham, UK	10600022
<b>Amersham Protan Premium 0.2 µm NC Membrane</b>	GE Healthcare Life Science, Amersham, UK	10600004
<b>Amersham Protan 0.45 µm NC Membrane</b>	GE Healthcare Life Science, Amersham, UK	10600002
<b>Cellulose acetate 0.2 µm membrane</b>	GE Healthcare Life Science, Amersham, UK	10404180
<b>Chromatography-papers</b> (Whatman 17CHR, Dicke 0,92 mm)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	7603.1
<b>Microplate 96 well</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE	655101
<b>NuPAGE 4-12% BisTris Precast Gels</b>	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	NP0323PK2
<b>NuPAGE 7% Tris-Acetate Precast Gels</b>	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	EA0355BOX

## 2.1.5 Größenstandards

Tabelle 10 – **Auflistung verwendeter Größenstandards.**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
<b>SeeBlue Plus 2 Standard Marker</b>	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	LC5925
<b>HiMark Pre-Stained Protein Standard</b>	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	LC5699
<b>Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard</b>	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	LC5800

## 2.1.6 Antikörper

Tabelle 11 – **Liste der verwendeten Primärantikörper.** Zur Konservierung wurde das Mikrobiozid Natriumazid in einer Konzentration von 0,02% w/v zugesetzt. n.a. = nicht angegeben. AS = Aminosäure.

<b>Antigen</b> (ggf. Epitop)	<b>Spezies</b>	<b>Klonalität</b> <b>(Klon)</b>	<b>Hersteller</b> <b>(Katalognummer)</b>	<b>Verwendete</b> <b>Verdünnung</b>
<b>Calpain-1</b>	Kaninchen	polyklonal	Abcam, Cambridge, UK (ab39170)	1:1000 in TBS-T
<b>Calpastatin</b>	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Danvers, USA (#4146)	1:1000 in TBS-T + 5% w/v BSA
<b>Citrat-Synthase</b>	Kaninchen	polyklonal	Abcam, Cambridge, UK (ab96600)	1:1000 in TBS-T
<b>FLAG Tag</b>	Maus	monoklonal (n.a.)	Cusabio, Washington DC, USA (MA000021M0m)	1:5.000 in TBS-T
<b>Huntingtin</b> (AS 443-457)	Maus	monoklonal (1HU-4C8)	Millipore, Billerica, USA (MAB2166)	1:1000 in TBS-T
<b>Huntingtin</b> (AS ~ 1220)	Kaninchen	monoklonal (D7F7)	Cell Signaling, Danvers, USA (#5656)	1:1000 in TBS-T + 5% w/v BSA
<b>IP3R1</b>	Kaninchen	polyklonal	Abcam, Cambridge, UK (ab5804)	1:1000 in TBS-T
<b>LC3B</b>	Maus	monoklonal (5F10)	NanoTools (0231-100/LC3-5F10)	1:200 in TBS-T
<b>P70S6 Kinase</b>	Kaninchen	monoklonal (49D7)	Cell Signaling, Danvers, USA (#2708)	1:1000 in TBS-T + 5% w/v BSA
<b>Phospho-P70S6 Kinase</b>	Kaninchen	monoklonal (108D2)	Cell Signaling, Danvers, USA (#9234)	1:1000 in TBS-T + 5% w/v BSA
<b>Phospho-S6 ribosomal protein</b>	Kaninchen	monoklonal (D57.2.2E)	Cell Signaling, Danvers, USA (#4858)	1:1000 in TBS-T + 5% w/v BSA
<b>S6 ribosomal protein</b>	Maus	monoklonal (54D2)	Cell Signaling, Danvers, USA (#2317)	1:500 in TBS-T + 5% w/v BSA
<b>Spectrin alpha II</b>	Maus	monoklonal (AA6)	Millipore, Billerica, USA (MAB 1622)	1:1000 in TBS-T
<b>SQSTM1/p62</b>	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling, Danvers, USA (#5114)	1:1000 in TBS-T + 5% w/v BSA
<b>VDAC1</b>	Kaninchen	polyklonal	Millipore, Billerica, USA (AB10527)	1:10.000 in TBS-T
<b>Vinculin</b>	Kaninchen	monoklonal (E1E9V)	Cell Signaling, Danvers, USA (#13901)	1:1000 in TBS-T + 5% w/v BSA

- Material und Methoden -

Antigen (ggf. Epitop)	Spezies	Klonalität (Klon)	Hersteller (Katalognummer)	Verwendete Verdünnung
<b>β-Actin</b>	Maus	monoklonal (AC-15)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (A5441)	1:10.000 in TBS-T

Tabelle 12 – Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

Antikörper	Hersteller	Katalognummer	Verwendete Verdünnung
<b>IRDye goat anti mouse 680LT</b>	LICOR Biosciences, Lincoln, USA	926-68020	1:5.000 in TBS-T
<b>IRDye goat anti mouse 800CW</b>	LICOR Biosciences, Lincoln, USA	926-32210	1:5.000 in TBS-T
<b>IRDye goat anti rabbit 680RD</b>	LICOR Biosciences, Lincoln, USA	926-68071	1:5000 in TBS-T
<b>IRDye goat anti rabbit 800CW</b>	LICOR Biosciences, Lincoln, USA	926-32211	1:5.000 in TBS-T
<b>Goat anti rabbit IgG H&amp;L (HRP)</b>	Abcam, Cambridge, UK	ab97051	1:5000 in TBS-T
<b>Alexa Fluor 488 donkey anti mouse</b>	Abcam, Cambridge, UK	ab150109	1:500 in DPBS + 1% w/v BSA + 0,5% v/v Triton-X-100

### 2.1.7 Tiergewebeproben

Tabelle 13 – Auflistung der verwendeten sechs Monate alten Wildtyp- und *Hdh*<sup>Q111</sup> knock-in-Mäuse.  
Abkürzungen: w = weiblich; m = männlich; wt = Wildtyp; HDKI = *Hdh*<sup>Q111</sup> knock-in-Maus.

Tierkenn- zeichnung	Geburts- datum	Todes- datum	Geschlecht	Geno- typ	Stamm
H.340.06	12.06.2011	13.12.2011	w	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI- MacD
H.340.08	12.06.2011	13.12.2011	w	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI- MacD
H.341.01	09.06.2011	13.12.2011	m	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI- MacD
H.341.02	09.06.2011	13.12.2011	m	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI- MacD

- Material und Methoden -

Tierkennzeichnung	Geburtsdatum	Todesdatum	Geschlecht	Genotyp	Stamm
H.341.04	09.06.2011	13.12.2011	w	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.341.05	09.06.2011	13.12.2011	w	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.339.01	14.06.2011	13.12.2011	m	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.339.02	14.06.2011	13.12.2011	m	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.339.03	14.06.2011	13.12.2011	m	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.345.03	12.06.2011	13.12.2011	m	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.345.06	12.06.2011	13.12.2011	w	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.356.05	20.06.2011	13.12.2011	m	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD

Tabelle 14 – Auflistung der verwendeten zwölf Monate alten Wildtyp und *Hdh* Q<sup>111</sup> knock-in-Mäuse. Abkürzungen: w = weiblich; m = männlich; wt = Wildtyp; HDKI = *Hdh*<sup>Q111</sup> knock-in-Maus; n.a. = nicht angegeben.

Tierkennzeichnung	Geburtsdatum	Todesdatum	Geschlecht	Genotyp	Stamm
H.340.10	06.07.2011	06.07.2012	m	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.340.11	06.07.2011	06.07.2012	m	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.340.12	06.07.2011	06.07.2012	w	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.340.13	06.07.2011	06.07.2012	w	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.358.04	06.07.2011	06.07.2012	m	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.384.17	05.01.201	16.01.2012	w	wt/wt	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD

- Material und Methoden -

<b>Tierkennzeichnung</b>	<b>Geburtsdatum</b>	<b>Todesdatum</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Stamm</b>
H.355.08	06.07.2011	06.07.2012	w	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.355.09	06.07.2011	06.07.2012	w	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.355.10	06.07.2011	06.07.2012	w	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.358.08	06.07.2011	06.07.2012	w	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.358.10	06.07.2011	06.07.2012	w	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.384.02	02.01.2012	15.01.2012	m	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD
H.385.09	19.02.2012	n.a.	m	HDKI/ HDKI	C57BL6/J- <i>Hdh</i> (111Q)KI-MacD

### 2.1.8 Zellkulturmaterialien

Tabelle 15 – Auflistung der verwendeten Zellkulturmaterialien.

<b>Zellkulturmaterial</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
<b>Antibiotic-Antimycotic (100X)</b> (10.000 µg/ml of penicillin, 10.000 µg/ml of streptomycin, and 25 µg/ml of Fungizone Antimycotic)	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	15240-062
<b>Cell Culture Flask 25 cm<sup>2</sup></b>	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, DE	690160
<b>Cell Culture Flask 75 cm<sup>2</sup></b>	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, DE	658170
<b>Cell CulturePlate 24 well</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10604903
<b>Cell CulturePlate 6 well</b>	Corning Inc., Wiesbaden, DE	3506
<b>DMEM (1x)</b>	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	11965-092
<b>DMEM (1x) + GlutaMAX</b>	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	10566-016
<b>DMSO</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	D2438

- Material und Methoden -

Zellkulturmaterial	Hersteller	Katalognummer
<b>DPBS (1x)</b>	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	14190-094
<b>Fetales Bovines Serum</b>	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA	10500064
<b>Itraconazol</b>	TCI Germany, Frankfurt a.M., DE	10732
<b>MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)</b>	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA	11140050
<b>Opti-MEM serum reduced medium</b>	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA	31985-047
<b>Poly-L-Lysin-Lösung 0,01%</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	P4832
<b>TRO19622 (Olesoxim)</b>	Tocris Bioscience, Bristol, UK	2906
<b>Trypsin-EDTA 0,25%</b>	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA	25200-072
<b>Zellschaber COSTAR</b>	Corning Inc., Wiesbaden, DE	3010

### 2.1.9 Plasmide und esiRNAs

Tabelle 16 – Auflistung und Herkunft der verwendeten Plasmidkonstrukte.

Plasmid (Antibiotika-Resistenz)	Zur Verfügung gestellt von
<b>pCMV-FLAG 4A empty</b> (kanamycinresistent)	Sven Geisler, Laboratory of Functional Neurogenetics, Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen, DE
<b>pCMV-FLAG 4A VDAC1</b> (kanamycinresistent)	Sven Geisler, Laboratory of Functional Neurogenetics, Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen, DE
<b>pclNeo HA-HTT 15QFL</b> (ampicillinresistent)	Hayden Lab, CMMT, University of Vancouver, Kanada
<b>pclNeo HA-HTT 128QFL</b> (ampicillinresistent)	Hayden Lab, CMMT, University of Vancouver, Kanada

Tabelle 17 – Auflistung der verwendeten esiRNAs.

esiRNA	Hersteller	Katalognummer
<b>esiRNA RLUC (200 ng/µl)</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	EHURLUC-20UG
<b>esiRNA CAST (200 ng/µl)</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	EHU096291-20UG
<b>esiRNA VDAC1 (200 ng/µl)</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	EHU109131-20UG

## 2.2 Zellkulturmethoden

Die in diesem Kapitel behandelten Methoden beinhalten eine Beschreibung des methodischen Vorgehens zur Kultivierung und zum Experimentieren mit adhären Zellen. Alle Arbeiten mit lebenden Zellen oder Nährmedien wurden unter einer Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank durchgeführt.

### 2.2.1 Kultivierung von HEK293T und MEF Zellen

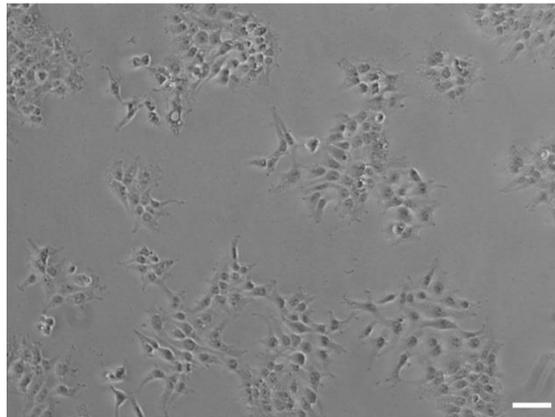
In dieser Arbeit wurden *In-cellulo*-Experimente in HEK293T (ATCC: CRL-11268) und MEF-WT-/VDAC1-Knockout-Zellen (generiert von William J. Craigen, Baylor College of Medicine, Houston, USA) durchgeführt. Diese adhären Monolayer-Kulturen wuchsen in 75 cm<sup>2</sup> großen Gewebekulturflaschen in 10 ml eines entsprechenden Mediums. HEK293T wurden in 1x DMEM mit Zusatz von 10% v/v FBS, 1% v/v NEAA und 1% v/v A/A kultiviert. MEF-WT-/VDAC1-Knockout-Zellen in 1x DMEM + GlutaMAX mit Zusatz von 10% v/v FBS, 1% v/v NEAA und 1% v/v A/A. Die Zellen wurden bei optimalen Bedingungen von 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Der Zustand und die Konfluenz des Zellrasens wurden regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft. Der Verbrauch des Mediums konnte anhand des Indikators Phenolrot beurteilt werden. Dieser verändert die Farbe des Mediums in saurem pH von einem rot-violetten (unverbrauchtes Medium) zu einem zitronengelben Farbton (verbrauchtes Medium). Im Verlauf der Kultivierung der Zellen kommt es zur Anhäufung von sauren Stoffwechselprodukten im Medium, die für die Farbänderung verantwortlich sind.

Bei frisch in Kultur genommenen Zellen kam es vor, dass der Zellrasen noch keine ausreichende Konfluenz erreicht hatte, das Medium aber bereits einen Farbumschlag zeigte. In diesen Fällen wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen vorsichtig mit 4 ml 1x DPBS gewaschen und die Zellen mit 10 ml frischem Medium versorgt.

### 2.2.2 Passagieren von Zellen (Subkultivierung)

Die Zellen wurden in der Regel zweimal pro Woche 1:6 passagiert, wodurch die Zellzahl auf 1/6 reduziert wurde. Die in diesem Abschnitt folgenden Volumenangaben beziehen sich auf eine 1:6 Passage. Bei einem anderen Passageverhältnis wurden die verwendeten Volumina entsprechend angepasst. Der optimale Zeitpunkt für die nächste Passage wurde definiert als Konfluenz des Zellrasens von 70-100%. *Abbildung 6* zeigt eine exemplarische lichtmikroskopische Aufnahme der verwendeten HEK293T Zelllinie mit einer Konfluenz von etwa 50%.



**Abbildung 6 – Beispielhafte lichtmikroskopische Aufnahme der verwendeten HEK293T Zelllinie.** In dieser Arbeit wurden neben HEK293T auch MEF-Wildtyp- und MEF-VDAC1-Knockout-Zellen verwendet (siehe *Abbildung 38*). Die Aufnahme zeigt HEK293T Zellen mit 50%-iger Konfluenz. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgesaugt. Danach wurde verbliebenes Zellkulturmedium mit 4 ml 1x DPBS abgewaschen und wieder abgesaugt. Anschließend wurde 1 ml Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin) auf die Zellen gegeben und für 2 min bei 37°C inkubiert. In der folgenden Reaktion fängt EDTA als Chelatbildner Calcium- und Magnesiumionen ab, wodurch diverse Adhäsionsmoleküle deaktiviert werden. Trypsin spaltet zusätzlich die Zell-Zell-Kontakte, was zur Vereinzelung der Zellen führt. Durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium und das darin enthaltene FBS wurde die Reaktion abgestoppt. Das anschließende Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension erzeugte

Scherkräfte, die die Zellen weiter vereinzeln. Danach wurden 5 ml Zellsuspension abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Mit diesen gewonnenen Zellen konnte entweder experimentiert werden oder sie wurden verworfen. Abschließend wurde 1 ml der Zellsuspension mit 9 ml frischem Zellkulturmedium vermischt und bei 37°C in den Inkubator gebracht.

### 2.2.3 Zellzählung und Aussaat von Zellen

Mit der Zellsuspension, die beim Passagieren übrigblieb oder dabei gezielt gewonnen wurde, konnten Experimente durchgeführt werden. Um Zellen auszusäen, musste vorab die Zellzahl bestimmt werden. Dazu wurde die Zellsuspension auf ein Gesamtvolumen von 20 ml mit 1x DPBS verdünnt. Von den 20 ml der verdünnten Zellsuspension wurden je 10 µl auf beide Seiten einer Neubauer-improved-Zählkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, DE) aufgebracht. Bei dieser Zählkammer handelt es sich um einen speziellen Objektträger, der eine zentrale Kammer mit einer Tiefe von 0,1 mm aufweist. Es wurden bei jeder Zellzählung alle vier Eckquadranten ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Da ein Eckquadrant ein Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> fasst, entspricht der Mittelwert der vier Quadranten multipliziert mit 10<sup>4</sup> der Anzahl an Zellen pro Milliliter Zellsuspension. Da das Gesamtvolumen der Zellsuspension 20 ml betrug entsprach die Gesamtzellzahl also dem zwanzigfachen der ermittelten Zellkonzentration pro Milliliter.

Die 20 ml Zellsuspension wurde 5 min bei 400xg zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit einer entsprechenden Menge an Zellkulturmedium versetzt, sodass eine Stammkonzentration von 10 Millionen Zellen pro Milliliter entstand. Aus dieser Stammkonzentration konnten weitere Verdünnungen angefertigt werden.

#### 2.2.4 Inkulturnahme von Zellen und Anfertigung von Kryostocks

Die MEF-WT- und MEF-VDAC1-Knockout-Zellen wurden aus einem Kryostock in Kultur genommen. Dieser Kryostock wurde freundlicherweise von Sarah Head (Department of Pharmacology and Molecular Sciences, Johns Hopkins School of Medicine, USA) zur Verfügung gestellt. Der Kryostock wurde zunächst im Wasserbad bei 37°C unter vorsichtiger Bewegung aufgetaut. Danach wurde das gesamte Volumen in 5 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt und 5 min bei 400xg zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde auch das typischerweise DMSO-haltige Einfriermedium abgesaugt.

Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml MEF-Zellkulturmedium aufgenommen und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Sobald die Zellen ausreichend inkubiert wurden um bei lichtmikroskopischer Kontrolle 90% Konfluenz zu erreichen, wurden sie für 2 min bei 37°C mit Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin) inkubiert und daraufhin in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt.

Nach erfolgter Expandierung der MEF-WT- und MEF-VDAC1-Knockout-Zellen wurden Kryostocks für zukünftige Experimente angefertigt. Dazu wurden jeweils vier 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen mit ausreichender Konfluenz für 2 min bei 37°C mit Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin) inkubiert und in jeweils 5 ml Zellkulturmedium pro Flasche aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und für 5 min bei 400xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt.

Das Zellpellet wurde danach in 6 ml Einfriermedium (DMEM (+10% v/v FBS + 10% v/v A/A + 10% v/v NEAA) + 10% v/v DMSO) aufgenommen und in 1,5 ml Kryoröhrchen überführt. Anschließend erfolgte das Einfrieren in einer Kühlbox mit einer Temperaturabnahme von 1°C pro Minute im -80°C Gefrierschrank. Die Zellstocks wurden in flüssigen Stickstoff überführt. Der Transport zum Tank mit flüssigem Stickstoff erfolgte auf Trockeneis.

### 2.2.5 Beschichten von Gewebekulturplatten mittels Poly-L-Lysin

In einigen der durchgeführten Versuche wurde das Zellkulturmedium während des Experiments ausgewechselt. Um die verwendeten HEK293T Zellen besser am Untergrund anhaften zu lassen, wurden die 6- bzw. 24-Well-Zellkulturplatten vorab mit Poly-L-Lysin beschichtet.

Die Zellkulturplatten wurden nach Herstellerprotokoll beschichtet, wobei einige Modifikationen vorgenommen wurden (Hersteller empfiehlt 1,0 ml Poly-L-Lysin-Lösung pro 25 cm<sup>2</sup>). In einer 6-Well-Zellkulturplatte wurden für jedes Well 400 µl der Poly-L-Lysin-Lösung verwendet und gleichmäßig verteilt. Nach 5 min Einwirkzeit wurde die Poly-L-Lysin-Lösung abgenommen und in die nächste 6-Well-Zellkulturplatte überführt. Mit 400 µl Poly-L-Lysin-Lösung wurden bis zu vier Wells beschichtet (laut Herstellerprotokoll eigentlich 187 µl pro Well bei einmaliger Applikation). Anschließend wurden die Zellkulturplatten mit sterilem Wasser gewaschen. Die folgende Trocknung fand bei 37°C im Inkubator für 2 h statt. Danach wurden die Platten mit Parafilmband verschlossen und bei 4°C gelagert. Platten, die länger als einen Monat lagerten, wurden verworfen, da nicht mehr sichergestellt sein konnte, dass die Beschichtung noch intakt war.

### 2.2.6 Transfektionen

Transfektionen fanden 24 h nach Aussaat der Zellen unter Verwendung des Transfektionsreagenz Attractene (Qiagen, Venlo, NL) statt. Attractene ist ein nicht-liposomales Lipid, mit welchem Zellen hocheffizient transfiziert werden können. Es wurden (gemäß Protokoll des Herstellers) die in *Tabelle 18* angegebenen Transfektionsansätze durchgeführt und in 1x OptiMEM als Medium angesetzt.

Zunächst wurde die DNA in 1x OptiMEM verdünnt. Das Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz betrug 1:3,75. Es wurde ein 10% höherer Ansatz als benötigt vorbereitet.

Tabelle 18 – **Attractene Transfektionsansätze**. Es wurden die in dieser Tabelle angegebenen Transfektionsansätze durchgeführt.

<b>Anwendung</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Volumen Reagenz [µl]</b>	<b>DNA [µg]</b>	<b>Angesetztes Volumen [µl]</b>	<b>Zellzahl</b>	<b>Kulturvolumen [ml]</b>
<b>Protein-Isolation</b>	Attractene	4,50	1,20	100	750.000	2
<b>Fluoreszenz-Mikroskopie</b>	Attractene	1,13	0,30	50	25.000	0,5

Wurden mehrere Plasmide oder esiRNAs in einer einzelnen Transfektion eingesetzt, so teilte sich die Gesamt-DNA-Menge gleichmäßig auf alle beteiligten Konstrukte auf.

Der vorbereitete Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um genügend Zeit zur Bildung der Transfektionskomplexe zu gewährleisten. Anschließend wurde das angesetzte Volumen auf die zu transfizierenden Zellen aufgetropft und durch leichte Achter-Bewegungen der Zellkulturplatte im Zellkulturmedium verteilt. Danach wurden die Zellen für die gewünschte Zeit bei Standard Zellkulturbedingungen inkubiert.

#### 2.2.7 Olesoxim-Behandlung von mit Huntingtin transfizierten HEK293T Zellen

Die Olesoxim-Behandlung wurde im Laufe der Experimente mehrfach variiert. Unter anderem wurde festgestellt, dass eine Attractene-vermittelte Transfektion der Zellen in Olesoxim-haltigem Zellkulturmedium mit einer geringeren Transfektionseffizienz einhergeht.

Zur Erstellung der Konzentrationsreihe wurden 750.000 HEK293T Zellen pro Ansatz auf Poly-L-Lysin-beschichteten Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die Ansätze mittels Attractene mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin-Plasmid-DNA transfiziert. Nach weiteren 24 h wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch 2 µM, 5 µM und 10 µM Olesoxim-haltiges Zellkulturmedium ersetzt. Ein Kontrollansatz wurde daraufhin mit einem entsprechenden Volumen DMSO

versetzt. 48 h nach Zusatz des Wirkstoffs wurde das Experiment durch Ernten der Zellen beendet.

Nachdem die optimale Olesoxim-Konzentration ermittelt wurde, wurden die anschließenden Experimente in gleicher Vorgehensweise durchgeführt.

#### 2.2.8 Itraconazol-Behandlung von mit Huntingtin transfizierten HEK293T Zellen

Itraconazol-Behandlungen wurden basierend auf den experimentellen Daten von Head et al. (2015) durchgeführt. Dazu wurden 750.000 HEK293T Zellen pro Ansatz für unterschiedliche Zeiten (0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h) mit 5  $\mu$ M Itraconazol behandelt. Ein Kontrollansatz mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium wurde für 4 h mitgeführt.

Anschließend fand, adäquat zur Olesoxim-Behandlung, eine Itraconazol-Behandlung von mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen statt, wobei verschiedene Konzentrationen an Itraconazol eingesetzt wurden (1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M und 5  $\mu$ M). Dazu wurden 750.000 HEK293T Zellen pro Ansatz auf Poly-L-Lysin-beschichteten Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h fand die Attractene-vermittelte Transfektion mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin-Plasmid-DNA statt. Nach weiteren 24 h wurde das Zellkulturmedium durch Itraconazol-haltiges Zellkulturmedium in den oben angegebenen Konzentrationen ersetzt. Ein DMSO-haltiger Ansatz diente als Kontrolle. Das Experiment wurde nach 48 h Itraconazol-Behandlung beendet.

Nachdem die optimale Itraconazol-Konzentration ermittelt wurde, wurden die anschließenden Experimente in gleicher Vorgehensweise durchgeführt.

#### 2.2.9 Fluoreszenzmikroskopische Aggregatanalyse

Zur fluoreszenzmikroskopischen Aggregatanalyse wurden zunächst 25.000 HEK293T Zellen pro Ansatz in 500  $\mu$ l Zellsuspension in einer 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Platten wurden vorab mit Poly-L-Lysin beschichtet.

Nach 24 h wurden die Zellen Attractene-vermittelt mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin-Plasmid-DNA und esiRNA für CAST und RLUC transfiziert. Nach 72 h wurde dann mit der Fixierung und Färbung der Zellen weiterverfahren.

Dazu fand zunächst eine Präfixierung mit 0,4% w/v PFA im Medium statt. Die Zellen wurden in dieser Konzentration im Inkubator für 10 min inkubiert. Um das PFA-haltige Zellkulturmedium zu entfernen wurden die Zellen vorsichtig mit 250 µl 1x DPBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen anschließend für 15 min mit 200 µl 4%-iger PFA-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser und alle folgenden Schritte fanden auf einem Taumelschüttler statt, der eine gleichmäßige Verteilung der zugesetzten Reagenzien und Benetzung der Zellen sicherstellte. Nach Ablauf der PFA-Fixierung wurde die PFA-Lösung aus den Ansätzen entfernt und es wurde 3 Mal für jeweils 5 min mit 500 µl 1x DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Ansätze mit 200 µl Block- und Permeabilisierungslösung (10% w/v BSA und 0,5% v/v Triton-X-100 in 1x DPBS) für 1 h bei Raumtemperatur geblockt und die Zellen permeabilisiert. Nach Ablauf der 1 h wurde die Lösung abgesaugt und es wurden 150 µl des Primärantikörpers (anti-Huntingtin Klon 1HU-4C8 in Verdünnung 1:1000 in 1x DPBS mit Zusatz von 1% w/v BSA und 0,5% v/v Triton-X-100) zugesetzt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper fand über Nacht bei 4°C statt. Am darauffolgenden Tag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Zellen wurden 4 Mal für jeweils 5 min mit 500 µl 1x DPBS gewaschen. Daraufhin wurden 150 µl des Fluoreszenz-Sekundärantikörpers (Alexa Fluor 488 in Verdünnung 1:500 in 1x DPBS mit Zusatz von 1% v/v BSA und 0,5% v/v Triton-X-100) zugesetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der 1 h wurden die Zellen erneut 4 Mal für jeweils 5 min mit 500 µl 1x DPBS gewaschen.

Zur Gegenfärbung der Nuklei und des Zytoplasmas wurde eine CyTRAK Orange (Biostatus, Speshed, UK) Färbung durchgeführt. Dazu wurden jedem Well 200 µl einer 5 µM CyTRAK Orange-Lösung in 1x DPBS zugesetzt. Die Inkubation fand für 30 min bei Raumtemperatur statt.

Die Platten wurden anschließend lichtgeschützt in Aluminiumfolie bei 4°C gelagert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Wells nicht austrockneten. Zum

Schutz vor äußeren Einflüssen wurden die Zellkulturplatten zusätzlich von außen mit Parafilm verschlossen.

Die Mikroskopie fand für alle Zellen gemeinsam an einem Tag statt. Dazu wurde das Mikroskop Eclipse TS100 (Nikon, Tokyo, JP) mit der Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss, Jena, DE) bei 100-facher Vergrößerung verwendet. Aufnahmen wurden mittels der Software AxioVision LE (AxioVs40 4.8.2.0., Zeiss, Jena, DE) durchgeführt.

Es wurden aus jedem Ansatz fünf Aufnahmen der Größe 200x140 µm aus verschiedenen, zufällig ausgewählten Bereichen des Präparats, aufgenommen. Schließlich wurden die Aufnahmen mittels des *cell-counter* Plug-Ins der Software ImageJ manuell ausgewertet (Schneider et al. 2012). Dabei wurden zytoplasmatische und nukleäre Aggregate sowie die Zahl der 128QFL-Huntingtin-überexprimierenden Zellen gezählt.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Protein-Isolierung aus kultivierten Zellen

Zunächst müssen die kultivierten Zellen geerntet werden. Da in dieser Arbeit vorrangig proteolytische Prozesse untersucht wurden, wurde vorsorglich auf den Einsatz der Protease Trypsin beim Ernten der Zellen verzichtet.

Stattdessen wurde das Zellkulturmedium abgenommen und der Zellrasen zunächst vorsichtig mit 1 ml 1x DPBS gewaschen. Danach wurde ein bestimmtes Volumen 1x RIPA-Lysepuffer hinzugesetzt, das anhand der lichtmikroskopisch abgeschätzten Zellzahl bestimmt wurde (meist 100 µl pro Well einer 6-Well-Zellkulturplatte). Zur Unterbindung proteolytischer Prozesse wurde dem RIPA-Lysepuffer ein Protease-Inhibitor (Complete, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und in einigen Versuchen zusätzlich ein Phosphatase-Inhibitor (PhosSTOP, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) zugesetzt, falls Phosphorylierung beurteilt werden sollte.

Der Lysepuffer wurde zügig hinzugegeben, damit die Zellen nicht trocken lagen. Anschließend wurde die 6-Well-Zellkulturplatte auf Eis gestellt, und die Zellen wurden mittels eines Zellschabers vom Untergrund abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Nach erfolgtem Ernten der Zellen wurde die Zellsuspension zunächst durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Danach wurden die Proben 15 min auf Eis inkubiert und dabei alle 5 min gevortext. Das Vortexen unterstützt den Lyseprozess zusätzlich. Zur Gewinnung von Homogenaten wurde anschließend eine Ultraschall-Behandlung mit einem UW2200 Ultraschallhomogenisator (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE) für 10 s bei 50% Ultraschallanwendung und mit 10% der maximalen Energie durchgeführt. Sollten aus einem Experiment Homogenate und Lysate hergestellt werden, wurde das fertige Homogenat 1:4 geteilt. Der kleinere Anteil wurde daraufhin mit 10% Glycerin als Schutzmittel gegen Schädigung der Proteine beim Einfrierprozess versetzt und als Homogenat für weitere Aggregatanalysen in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß bei -80°C gelagert. Der größere Anteil wurde zur Generierung eines Lysats für

10 min bei 4°C und 16.100xg zentrifugiert. Der Überstand, der nun das Lysat enthielt, wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dem Lysat wurden 10% Glycerin zugesetzt. Die Proben wurden danach bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.3.2 Protein-Isolierung aus Tiergewebe

Gehirne von 12 Monate alten Wildtypen und homozygoten *Hdh*<sup>Q111</sup> knock-in-Mäusen wurden zunächst in vorgekühlte 14 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde 1x RIPA-Basispuffer im Volumen-zu-Gewicht-Verhältnis 7,5:1 zugesetzt und das Gewebe mittels eines Ultra-Turrax (VWR International, Radnor, USA) bei Intensität 6 für 45 s homogenisiert. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Ultra-Turrax mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und gereinigt. Anschließend wurde das Homogenat auf zwei 2 ml Kryoreagenzgefäße aufgeteilt. Das erste Reagenzgefäß wurde 25 min auf Eis inkubiert und dabei alle 5 min gevortext. Anschließend wurden 10% Glycerin zugesetzt, und das Homogenat wurde bei -80°C verwahrt. Dem zweiten Reagenzgefäß wurde im Verhältnis 1:10 10x RIPA-Detergenz zugesetzt und ebenfalls für 25 min auf Eis inkubiert, wobei auch hier alle 5 min gevortext wurde. Danach wurde das Homogenat für 15 min bei 4°C und 16.100xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10% Glycerin versetzt und für weitere Verwendung als Lysat bei -80°C gelagert.

### 2.3.3 Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay

Um Protein-Expressionen vergleichen zu können, ist es elementar wichtig, gleiche Protein-Mengen einzusetzen. Dazu wurde mit den generierten Proben eine Protein-Konzentrationsbestimmung unter Verwendung der Bradford-Methode durchgeführt (Bradford 1976). Es handelt sich dabei um einen kolorimetrischen Protein-Assay.

Das Bradford-Assay basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G-250. Bei einem sauren pH-Wert verschiebt sich dieses durch Bindung an basische Aminosäuren (bspw. Arginin, Lysin und Histidin) von 465 nm zu 595 nm. Änderungen in der Absorption werden photometrisch bestimmt. Diese Absorptionsänderungen lassen über eine BSA-Standardkurve Rückschlüsse auf die Protein-Konzentration zu.

Zur Bestimmung der Standardreihe wurden verschiedene Mengen BSA 1 µg/µl (0 µl; 1,25 µl; 2,5 µl; 5 µl; 7,5 µl; 10 µl; 12,5 µl und 15 µl) in 800 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Von den Protein-Lysaten wurden jeweils 2 µl in 800 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt, wobei Gewebe-Lysate und -Homogenate zunächst 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O vorverdünnt wurden. Durch Zugabe von 200 µl eines 5-fach konzentrierten Bradford-Reagenzes wurde die Reaktion gestartet. Die Proben wurden gevortext und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Standardverdünnungen sowie die Proben in Replikaten von jeweils 100 µl auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Hiernach wurde die Absorption photometrisch mittels eines Synergy HT Plattenphotometers (BioTek U.S., Winooski, USA) bestimmt. Anhand der Standardkurve wurden die gemessenen Werte in die Protein-Konzentrationen der Proben umgerechnet.

#### 2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Volllängen-Proteine und ihre proteolytischen Fragmente wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Mit dieser Methode werden Proteine in einem elektrischen Feld ihrer Molekülmasse nach in einer Polyacrylamid (PAA)-Gelmatrix aufgetrennt (Laemmli 1970). Dies wird durch den Zusatz von SDS (bzw. LDS), einem anionischen Detergenz, ermöglicht, welches die Eigenladungen der Proteine überdeckt und ihnen eine gleichmäßige, negative Ladung verleiht, die mit ihrer Protein-Masse korreliert.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem PAA-Gel. Derartige Gele sind als Precast-Variante erhältlich und werden im Materialteil aufgelistet. Wie im Folgenden beschrieben, können PAA-Gele aber auch selbst hergestellt werden.

PAA-Gele wurden aus einer wässrigen Lösung von Acrylamid- und Bisacrylamid-Monomeren, letztere zur Herstellung von Quervernetzungen im Gel, im Verhältnis 29:1 unter Zuhilfenahme des Katalysators TEMED und des Oxidationsmittels und Radikalbildners Ammoniumpersulfat (APS) hergestellt.

Zum Gießen der Gele wurde ein Mini-Protean-Casting-Module (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) verwendet. Eine der beiden Glasplatten, zwischen die das Gel gegossen wird, wurde vorab auf der Innenseite imprägniert, sodass das Gel später nicht mehr an dieser Seite anhaftet. Zunächst wurde die Apparatur wie vorgesehen aufgebaut und auf Dichtigkeit überprüft. Es wurde mit der Herstellung des Trenngels begonnen, welches als erstes gegossen wurde. Die für das Trenngel benötigten Substanzen wurden in der Reihenfolge, wie in *Tabelle 19* dargestellt, in ein 50 ml Röhrchen pipettiert. Die Prozentualität des herzustellenden Gels wurde anhand der nachzuweisenden Proteine gewählt. Für hochmolekulare, große Proteine wurde ein geringerer Prozentsatz gewählt, während für niedrigmolekulare, kleine Proteine ein höherer Prozentsatz verwendet wurde.

Tabelle 19 – BisTris-Gel Zusammensetzung für ein Trenngel. Nach Timothy W. Corson (Neklesa et al. 2011).

Inhaltsstoff	8%	10%	12%	15%
3,5 x Puffer [ml]	1,42	1,42	1,42	1,42
30% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1) [ml]	1,34	1,67	2,0	2,5
ddH <sub>2</sub> O [ml]	2,24	1,91	1,58	1,08
TEMED [µl]	7	7	7	7
10% (v/v) APS [µl]	25	25	25	25

Die Zugabe von Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, TEMED und APS erfolgte, aufgrund der Giftigkeit der Substanzen und deren Flüchtigkeit, unter dem Abzug. Nach Zusatz von APS als letzte Komponente zum Starten der Polymerisation wurde die Lösung ohne größeren Zeitverlust in den für das Gel bestimmten 1 mm breiten Spalt zwischen den Glasplatten gegossen. Durch Überschichtung mit 300 µl 70%-iger Isopropanol-Lösung wurde ein für die Polymerisation wichtiger Luftabschluss und eine gerade obere Gelkante erreicht. Nach 15 min

Polymerisation wurde die Isopropanol-Lösung abgenommen und Reste wurden mit einem Filterpapier aufgesaugt.

Daraufhin wurde das Sammelgel entsprechend *Tabelle 20* vorbereitet und zügig über das auspolymerisierte Trenngel gegeben. Zur Bildung von Probenaschen im Sammelgel wurde ein passender Kamm vorsichtig von oben eingesetzt. Nach weiteren 15 min Polymerisation war das Gel für die anschließende Elektrophorese bereit.

Tabelle 20 – BisTris-Gel Zusammensetzung für ein Sammelgel. Nach Timothy W. Corson (Neklesa et al. 2011).

Inhaltsstoff	Eingesetztes Volumen
3,5 x Puffer [ml]	0,5
30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) [ml]	0,23
ddH <sub>2</sub> O [ml]	1,02
TEMED [µl]	20
10% (v/v) APS [µl]	10

Alternativ zu BisTris-Gelen wurden Tris-Glycin-Gele in gleicher Methodik anhand der in *Tabelle 21* aufgelisteten Rezeptur gegossen.

Tabelle 21 – Tris-Glycin-Gel Zusammensetzung für Sammel- und Trenngel.

Für 1 Gel	Sammelgel (3%)	Trenngel (10%)
ddH <sub>2</sub> O [ml]	3,2	2,0
0,5 M Tris HCl (pH 6,8) [ml]	1,25	-
1,5 M Tris HCl (pH 8,8) [ml]	-	1,25
30% Acrylamid/bisacrylamid (29:1) [ml]	0,5	1,65
TEMED [µl]	8	4
10 % (v/v) APS [µl]	50	50

Für die Gelelektrophorese wurde den zu untersuchenden Protein-Lysaten jeweils ein Protein-Äquivalent von 25 µg entnommen. Dieses Protein-Äquivalent wurde mit 4x LDS-Ladepuffer im Verhältnis 3:1 vermischt und mit 0,1 M Dithiothreitol (DTT) versetzt. DTT dient dabei der Reduktion und Aufspaltung von Disulfidbrücken innerhalb der Proteine. Die Proben wurden 10 min bei 70°C

inkubiert um Wasserstoffbrücken aufzubrechen und so die Proteine zu denaturieren.

Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt, kurz anzentrifugiert und dann in die Taschen des PAA-Gels pipettiert. Zusätzlich wurde in die äußeren Taschen ein geeigneter Größenstandard geladen. In BisTris-Gelen wurde für die bessere Auftrennung von Proteinen > 28 kDa 1x MOPS-Laufpuffer und < 28 kDa 1x MES-Laufpuffer verwendet. Die Gelelektrophoresen mit Tris-Acetat- und Tris-Glycin-Gelen wurden mit den entsprechenden Laufpuffern durchgeführt.

Zunächst wurde eine Spannung von 60-80 V angelegt, durch welche die Protein-Proben in das Sammelgel hineinliefen. Danach wurde die Spannung für die eigentliche gelelektrophoretische Auftrennung auf 120-160 V erhöht. Nach ungefähr 1,5 h wurde die Elektrophorese gestoppt und das PAA-Gel für den Western Blot vorbereitet.

#### 2.3.5 Western Blot

Nach Abschluss der SDS-PAGE und damit dem Auftrennen der Proteine im PAA-Gel wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen, die die nachfolgende Immundetektion der Zielproteine erlaubt. Für diesen sogenannten Western Blot wurde das Gel aus der Gelkassette bzw. den Glasplatten herausgelöst und auf eine in Transferpuffer äquilibrierte Nitrocellulose (NC) oder Methanol-aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran gelegt. Beide verwendeten Membranen zeichnen sich durch eine hohe Protein-Bindekapazität aus. Des Weiteren wurden Membranen verwendet, die eine niedrige Eigenfluoreszenz aufweisen, um gegebenenfalls eine fluoreszenzbasierte Immundetektion zu ermöglichen. Die Auswahl der geeigneten Membran erfolgte in Anbetracht der Zielproteine, die auf dieser nachgewiesen werden sollten.

Beim Zusammensetzen des sogenannten Blotting-Sandwiches ist darauf zu achten, dass Membran und PAA-Gel stets angefeuchtet bleiben und keine Luftblasen zwischen ihnen eingeschlossen werden. Das PAA-Gel und die

Membran wurden zwischen eine Lage in Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt und alles anschließend in eine Transferkassette überführt. Diese wurde in einen Transfertank eingesetzt, der mit Transferpuffer (mit 10-20% v/v Methanol) gefüllt wurde. Es war darauf zu achten, dass das PAA-Gel zur Kathode und die proteinbindende Membran zur Anode gerichtet waren. Anschließend wurden die Proteine vom Gel auf die Membran bei 80 V bzw. maximal 250 mA für 1,5 h (BisTris- und Tris-Glycin-Gele) bzw. 2 h (Tris-Acetat-Gele) bei 4°C transferiert. Nach dem Transfer wurden die Markerbanden mit Bleistift auf der Membran vermerkt, da diese in den folgenden Schritten eventuell abgewaschen werden könnten. Mit Hilfe einer unspezifischen Ponceau-S-Gesamtprotein-Färbung konnten die übertragenen Protein-Banden auf der Membran zur Qualitätskontrolle sichtbar gemacht werden (Beispielfärbung siehe *Abbildung 7*).

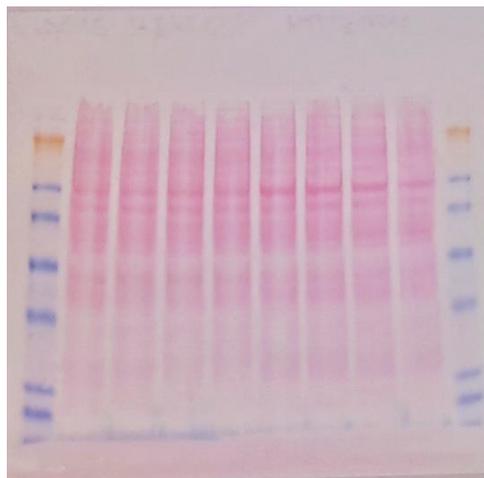


Abbildung 7 – Beispiel einer Ponceau-S-Gesamtprotein-Färbung einer NC-Membran.

Die Membran wurde anschließend mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit TBS wieder entfärbt.

### 2.3.6 Immundetektionen

Zum Nachweis der auf der Membran gebundenen Proteine wurde die indirekte Immundetektion verwendet. Bei diesem Verfahren bindet ein spezifischer Primärantikörper zunächst das Protein des Interesses auf der Membran. In einem

zweiten Schritt wird die Membran dann mit einem Meerrettichperoxidase- (engl.: horseradish peroxidase, HRP) oder Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert, der speziesspezifisch an den konstanten Fc-Teil des primären Antikörpers bindet. Durch ein entsprechendes Aufnahmesystem kann dieser Sekundärantikörper dann durch Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrates (Luminol- und  $H_2O_2$ -haltige Lösung) oder durch Anregung der Fluoreszenzgruppe des sekundären Antikörpers detektiert werden. In *Abbildung 8* ist das Prinzip der indirekten Immundetektion beispielhaft mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt. Die Chemilumineszenz kann deutlich sensitiver als fluoreszenzbasierte Detektionen sein, jedoch ist sie durch die Substratverfügbarkeit und die Stabilität der Enzymaktivität limitiert.

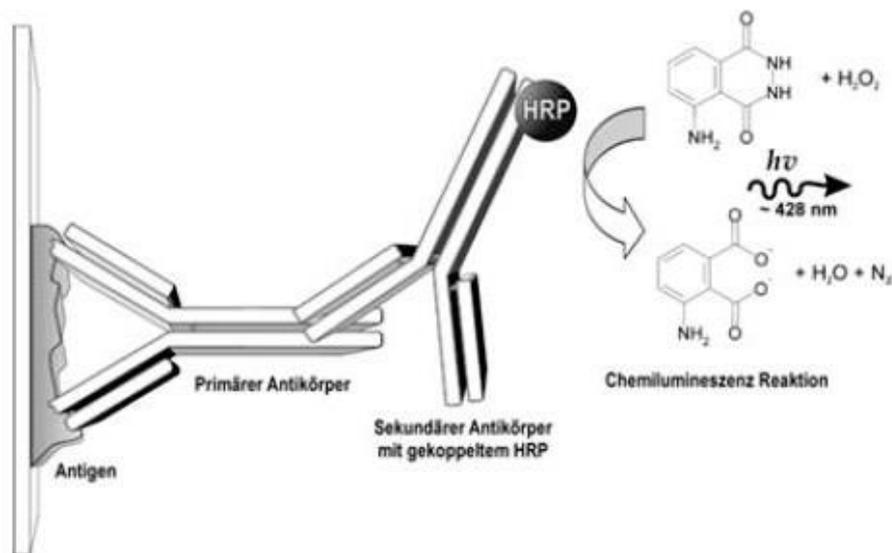


Abbildung 8 – **Prinzip der indirekten Immundetektion mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper.** Abgebildet ist das Prinzip der indirekten Immundetektion, bei der ein Epitop-spezifischer Primärantikörper an das Zielantigen bindet. Ein (in diesem Fall HRP-gekoppelter) Sekundärantikörper bindet in einem zweiten Schritt an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Durch Zugabe von Luminol kommt es unter basischen Bedingungen und bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zur Oxidation mit konsekutiver Emission eines Lichtquants. Alternativ kann an den Fc-Teil des Primärantikörpers in gleicher Weise ein fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper binden. Abbildung siehe „Schema der Immundetektion“; Autor: Jan R; 2005; Bildlizenz: CC BY-SA 3.0.

Im Folgenden werden die weiteren Prozessierungsschritte im Anschluss an den Western Blot Transfer beschrieben. Alle hier aufgeführten Inkubationsschritte fanden auf einem Rollmischer statt.

Um freie Protein-Bindungsstellen auf der Membran abzudecken, wurde die Membran nach dem Transfer zunächst in ein 50 ml Röhrchen überführt und dann mit Blocking-Puffer (5% w/v SlimFast® in TBS) für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Sollten Phosphoproteine nachgewiesen werden, wurde ein alternativer Blockingpuffer (5% w/v BSA in TBS) verwendet.

Nach dem Blocking wurde die Membran 3 Mal für 5 min mit TBS-T gewaschen und mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Membran 3 Mal für 5 min mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bei fluoreszenzbasierten Sekundärantikörpern fand die Inkubation vor Licht geschützt statt. Anschließend wurde die Membran erneut 3-5 Mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines LI-COR Odyssey Fc Dual-Mode Imaging System (LI-COR Bioscience, Lincoln, USA). Dazu wurde die Membran auf einen entsprechenden Träger überführt. Für die Chemilumineszenzdetektion wurde die Membran mit dem Substrat für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einem Klarsichtfolienzuschnitt bedeckt. Überschüssiges Substrat und mögliche Luftblasen wurden herausgestrichen. Membranen, die mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern detektiert wurden, wurden lediglich mit dem Klarsichtfolienzuschnitt bedeckt und übriges TBS-T herausgestrichen. Markerbanden des Größenstandards wurden auf der Folie mit einem blauen Permanentmarker angezeichnet, der bei 800 nm visualisiert werden kann. Die Aufnahmedauer wurde für jedes Protein bzw. jeden Primärantikörper angepasst.

Sollten auf einer Membran verschiedene Zielproteine nacheinander nachgewiesen werden, wurde die Membran zum Entfernen des Primär- und Sekundärantikörpers nach jeder Detektion 4 Mal für 5 min in Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4 Mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für 5 min in TBS inkubiert und für 1 h

in Blocking-Puffer geblockt. Mit der so behandelten Membran konnten weitere Immundetektion durchgeführt werden.

Eine densitometrische Quantifizierung der detektierten Protein-Banden erfolgte mit der Software Image Studio Lite V 5.2. (LI-COR Bioscience, Lincoln, USA).

### 2.3.7 Aggregatanalyse mittels Filter-Retardation-Assay

In dieser Arbeit wurden Aggregatanalysen mittels Filter-Retardation-Assay durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Methode, mit der SDS-unlösliche Aggregate nachgewiesen werden können (Scherzinger et al. 1997).

Für den Ansatz wurden zwischen 5 µg und 12,5 µg eines Protein-Homogenats verwendet und auf ein Endvolumen von 100 µl mit 1x DPBS und Zusatz von 2% w/v SDS und 50 mM DTT aufgefüllt. Daraufhin erfolgte eine Hitzedenaturierung für 5 min bei 95°C. Anschließend wurden die Ansätze bei Raumtemperatur abgekühlt, um ein Ausfallen des SDS zu verhindern. Zum Aufbau des für den Filter-Retardation-Assay verwendeten Minifold II Slot Blot Systems (Schleicher & Schuell, Dassel, DE) wurden zwischen die beiden Geräteplatten zwei 3 MM Whatman Filterpapiere und eine 0,45 µm NC-Membran (alternativ eine 0,2 µm Celluloseacetat-Membran) gelegt. Die Millivac Vakuumpumpe (Millipore GmbH, Schwalbach, DE) wurde angeschlossen und angeschaltet, um ein Vakuum zu erzeugen. Zunächst wurde die NC-Membran mit 100 µl 1x DPBS mit 0,1% w/v SDS pro Slot äquilibriert. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben durch die Membran gesaugt. Die Slots wurden danach zweimal mit 100 µl 1x DPBS gewaschen.

Die Membran wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und zweimal für jeweils 5 min mit TBS gewaschen. Es erfolgte ein Blocking und eine Immundetektion wie vorangegangen beschrieben.

## 2.4 Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA

In den Experimenten wurde eine Überexpression von VDAC1 und 15QFL-/128QFL-Huntingtin in HEK293T Zellen durchgeführt. Dazu wurde Plasmid-DNA, die die respektive cDNA enthielt, verwendet, die zunächst amplifiziert und isoliert werden musste.

Zur Gewinnung der Plasmide wurden Übernachtskulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$ , die mit den Plasmiden transformiert waren, angesetzt. Es wurden 8 ml LB-Medium verwendet, welches vorab mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt wurde. Danach wurde aus den Bakterienglycerinkryostock eine geringe Menge Bakterien entnommen und das LB-Medium angeimpft. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 220 rpm und 37°C in einen Schüttelinkubator verbracht.

Zum Erstellen eines neuen Bakterienglycerinkryostock wurden 600  $\mu$ l der Bakteriensuspension mit 300  $\mu$ l sterilem 86%-igen Glycerin in einem 1,5 ml Kryoreaktionsgefäß versetzt und nach gründlichem Durchmischen bei -80°C eingelagert. Die (restliche) Bakteriensuspension wurde bei 3.220xg für 5 min pelletiert und der Mediumüberstand wurde verworfen.

Die Isolierung der Plasmide aus der Bakterienkultur wurde mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Venlo, NL) gemäß der Vorgehensweise des Herstellers durchgeführt. Alle im Protokoll genannten zeitlich variablen Zentrifugationsschritte wurden für 60 s durchgeführt. Die Plasmide wurden in Elutionspuffer (elution buffer; EB) eluiert und bei 4°C gelagert. Zur Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration wurden 1,25  $\mu$ l des Eluats unter Verwendung eines BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, DE) und einer  $\mu$ Cuvette G1.0 (Eppendorf AG, Hamburg, DE) photometrisch analysiert. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm. Der Quotient  $\lambda 260$  nm/ $\lambda 280$  nm diente als Maß für die Reinheit der Probe und sollte bei  $\geq 1,9$  liegen. Bei niedriger Reinheit wurde das Plasmidisolat verworfen.

## 2.5 Statistische Auswertung und Ausschlusskriterien

Für die statistische Auswertung der Messergebnisse wurde die Software GraphPad Prism 6.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Wenn zwei normalverteilte Stichprobengruppen vergleichend betrachtet wurden (Tierversuche, Aggregatanalysen), wurde zur Testung statistischer Signifikanz der *Student's t-Test* verwendet. In Experimenten mit insgesamt vier Stichproben-Gruppen bei zwei Variablen (Genotyp und Behandlung) wurde zur Testung der statistischen Signifikanz ein *repeated measurements Two-Way-ANOVA Test* mit *Holm-Sidak's post-hoc-Test* verwendet. Dabei wurde (im Sinne eines „*randomized block*“) der Genotyp (15QFL-Huntingtin und 128QFL-Huntingtin) gematched. Der Vergleich fand zwischen „unbehandelt“ (bspw. RLUC, Leervektor, DMSO) und „behandelt“ (bspw. esiCAST, VDAC1 cDNA, Olesoxim) statt. *P*-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

In den durchgeführten Experimenten kam es in einzelnen Versuchsreihen zu technischen Problemen, durch die Daten entweder nicht methodisch korrekt erlangt werden konnten oder das erlangte Ergebnis unschlüssig war. Daher mussten in diesen Experimenten einzelne Ansätze oder einzelne Versuchstiere aus technischen Problemen oder als statistische Ausreißer aus den Analysen ausgeschlossen werden (spezifische Angaben siehe Ergebnisteil). Statistische Ausreißer wurden mittels ROUT-Test mit einer maximalen Falscherkennungsrate von  $Q = 1\%$  ermittelt (Motulsky und Brown 2006). Als technische Kriterien für den Ausschluss eines Versuchsansatzes wurde eine unspezifische Fragmentierung der untersuchten Proteine (bspw.  $\alpha$ -Spektrin) definiert, durch welche die zu analysierenden Zielfragmente nicht mehr zuverlässig bestimmt werden konnten. Zudem mussten das Auftrennungsverhalten im Western Blot, ein veränderter Hintergrund in der Detektion und möglicherweise im Transfer aufgetretene Gradienten berücksichtigt werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *In-vivo*-Analyse von MAM-Komponenten und von Markern des Calpain-Systems in HDKI-Mäusen

Um frühere Erkenntnisse über die Calpain-Aktivierung in (transgenen) HD-Tiermodellen zu überprüfen und zu bestätigen (Clemens et al. 2015; Cowan et al. 2008; Dau et al. 2014; Gafni und Ellerby 2002; Weber et al. 2016) wurden zu Beginn der Arbeit Protein-Lysate aus dem Striatum und dem Cortex sechs Monate alter *Hdh*<sup>Q111</sup> knock-in-Mäuse (HDKI-Mäuse) durch Western Blot-Analyse untersucht.

Überprüft wurden dabei Veränderungen in den spezifischen Markern des Calpain-Systems. Dazu zählt die Auto-Prozessierung von Calpain-1 sowie die Prozessierung des Calpain-Substrates  $\alpha$ -Spektrin.  $\alpha$ -Spektrin wird durch Calpaine in zwei 145/150 kDa große Fragmente geschnitten. Aufgrund ihrer elementaren Rolle in der Calcium-Homöostase und einer möglichen Beteiligung an der Calpain-Aktivierung wurden die MAM-Komponenten VDAC1 und IP3R1 analysiert. Diese zeigten in vorangegangenen Analysen in HDKI-Mäusen bereits Veränderungen (Weber et al. 2016).

##### 3.1.1 Calpaine sind im Striatum, nicht aber im Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse überaktiviert

Die Analysen wurden an Protein-Lysaten aus dem Cortex und dem Striatum von sechs Monate alten HDKI-Mäusen mittels Western Blot durchgeführt. Die Genotypen der Mäuse wurden durch den Nachweis von Wildtyp- und Polyglutamin-expandiertem Huntingtin mittels des anti-Huntingtin Antikörpers D7F7 überprüft und bestätigt (*Abbildung 9a*). HDKI-Mäuse wiesen das zu erwartende, expandierte mutierte Huntingtin auf.

Im Cortex der untersuchten HDKI-Mäuse konnte keine veränderte Calpain-Aktivität festgestellt werden. Sowohl das auto-prozessierte Calpain-1 als auch

dessen Substrat  $\alpha$ -Spektrin zeigten keine Anzeichen für eine Calpain-Aktivierung (Abbildung 9a, b).

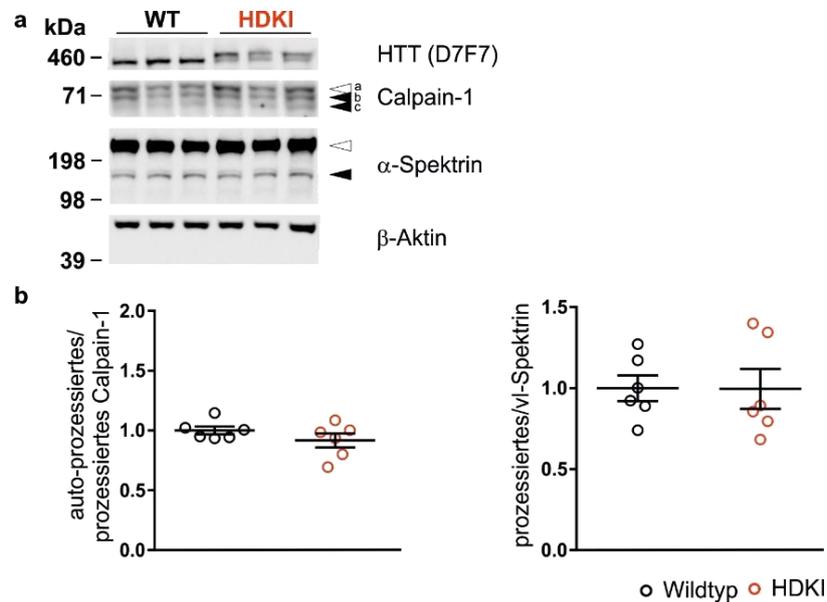


Abbildung 9 – Es finden sich keine Anzeichen für eine vermehrte Calpain-Aktivierung im Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse. (a) Protein-Lysate aus dem Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen Huntingtin (Klon D7F7), Calpain-1 und  $\alpha$ -Spektrin inkubiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Weiße Pfeile zeigen das Volllängen-Protein an. Schwarze Pfeile zeigen auf die auto-prozessierten Formen von Calpain-1 („b“ und „c“) und die prozessierte Form von  $\alpha$ -Spektrin. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von sechs Tieren pro Genotyp dar. vl = Volllängen-Protein.

Im Striatum zeigte sich eine signifikant erhöhte  $\alpha$ -Spektrin-Prozessierung ( $P < 0,001$ ) und eine stark erhöhte Calpain-1-Auto-Prozessierung ( $P = 0,054$ ). Diese Parameter weisen auf eine Überaktivierung des Calpain-Systems im Striatum von sechs Monate alten HDKI-Mäusen hin (Abbildung 10a, b). In der Analyse der  $\alpha$ -Spektrin-Prozessierung wurde ein Tier aus der Wildtyp-Gruppe (Tierkennzeichnung: H.340.06) aus technischen Gründen und als statistischer Ausreißer ausgeschlossen.

## - Ergebnisse -

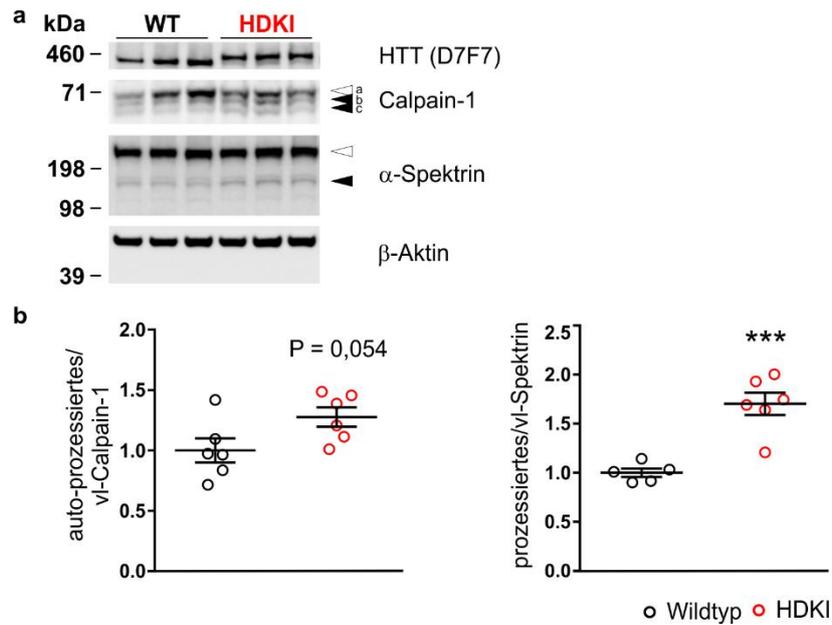


Abbildung 10 – **Calpaine sind im Striatum von sechs Monate alten HDKI-Mäusen überaktiviert.** (a) Protein-Lysate aus dem Striatum sechs Monate alter HDKI-Mäuse wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen Huntingtin (Klon D7F7), Calpain-1 und  $\alpha$ -Spektrin inkubiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Weiße Pfeile zeigen das Volllängen-Protein an. Schwarze Pfeile weisen auf die auto-prozessierten Formen von Calpain-1 („b“ und „c“) und die prozessierte Form von  $\alpha$ -Spektrin. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von sechs Tieren pro Genotyp dar. Statistische Signifikanz und *P*-Wert wurden mittels Student's *t*-Test ermittelt. \*\*\**P* < 0,001. vl = Volllängen-Protein.

### 3.1.2 VDAC1 ist im Striatum, nicht aber im Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse herabreguliert

Die Komponenten der MAM wurden ebenfalls im Cortex und Striatum sechs Monate alter Wildtyp- und HDKI-Mäuse analysiert.

Es zeigten sich keine Veränderungen der Expressions-Level von VDAC1 und IP3R1 im Cortex der HDKI-Mäuse (*Abbildung 11a, b*). In der Analyse zu den Expressions-Leveln von IP3R1 wurde ein Tier aus der Wildtyp-Gruppe (Tierkennzeichnung: H.341.01) aus technischen Gründen und ein Tier aus der HDKI-Gruppe (Tierkennzeichnung: H.339.02) als statistischer Ausreißer ausgeschlossen.

- Ergebnisse -

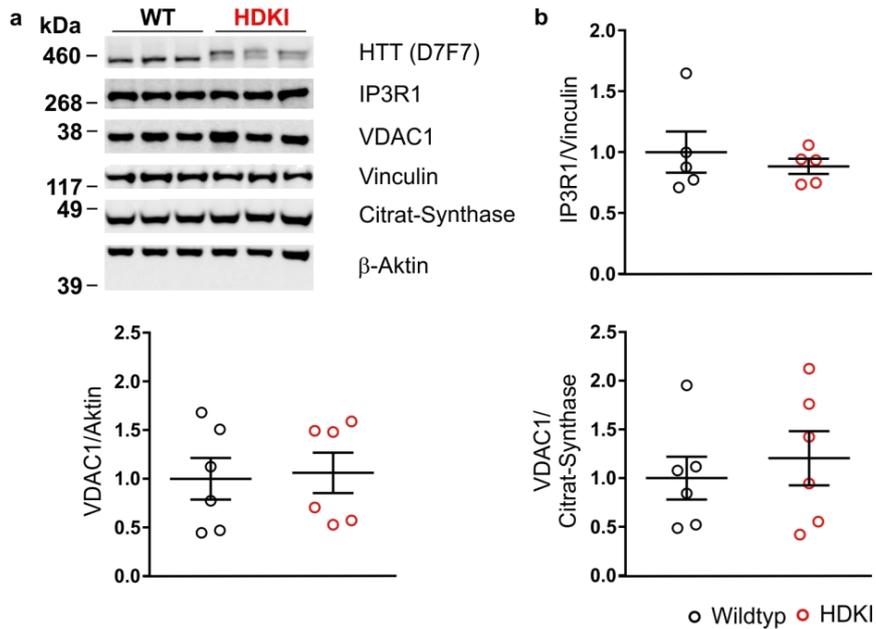


Abbildung 11 – Die MAM-Komponenten weisen im Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse keine Veränderungen auf. (a) Protein-Lysate aus dem Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen Huntingtin (Klon D7F7), IP3R1 und VDAC1 inkubiert. Vinculin, Citrat-Synthase und  $\beta$ -Aktin dienten als Ladekontrollen. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von sechs Tieren pro Genotyp dar.

Im Striatum der HDKI-Mäuse fand sich hingegen eine signifikant erniedrigte Expression von VDAC1 (*Abbildung 12a, b*). Um zu überprüfen, ob diese auf eine verminderte Anzahl von Mitochondrien oder auf verminderte Expression von VDAC1 zurückzuführen ist, wurden die Expressions-Level von VDAC1 zusätzlich zum Zellstrukturprotein  $\beta$ -Aktin auf die mitochondriale Ladekontrolle Citrat-Synthase bezogen. Dabei zeigte sich, dass VDAC1 in beiden Fällen signifikant reduziert ist ( $P < 0,05$ ). Es ist also davon auszugehen, dass die verminderte Expression von VDAC1 nicht an einer verminderten Anzahl an Mitochondrien liegt, sondern an einer verringerten Präsenz von VDAC1 in der äußeren Mitochondrienmembran (*Abbildung 12b*).

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Level von IP3R1 im Striatum ebenfalls erniedrigt sind (*Abbildung 12a, b*). Das Signifikanzniveau konnte allerdings nicht erreicht werden.

- Ergebnisse -

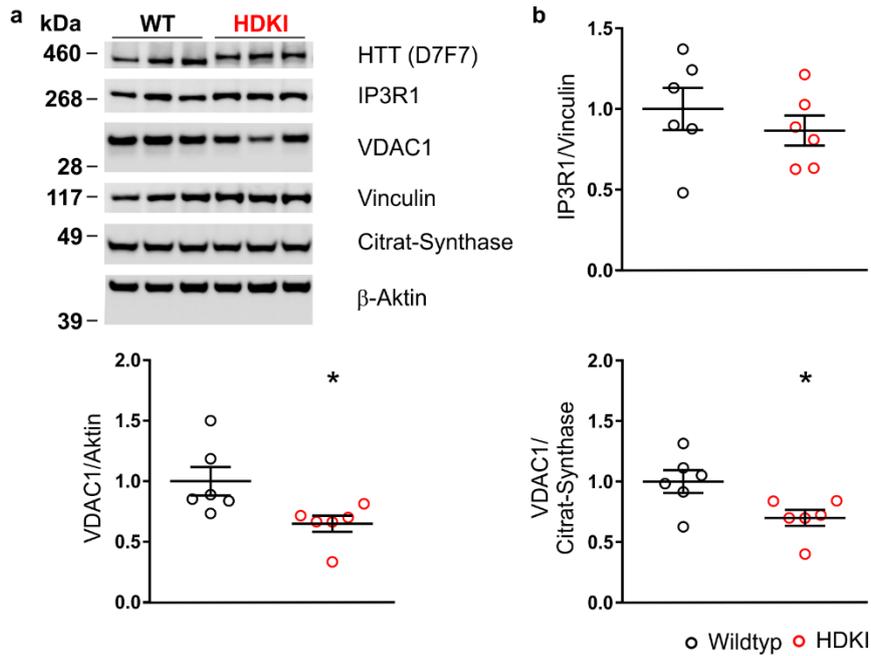


Abbildung 12 – Die Expression von VDAC1 und IP3R1 ist im Striatum von sechs Monate alten HDKI-Mäusen verringert. (a) Protein-Lysate aus dem Striatum sechs Monate alter HDKI-Mäuse wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen Huntingtin (Klon D7F7), IP3R1 und VDAC1 inkubiert. Vinculin, Citrat-Synthase und β-Aktin dienten als Ladekontrollen. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert ± SEM von sechs Tieren pro Genotyp dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. \**P* < 0,05.

### 3.1.3 In Gesamthirn-Lysaten 12 Monate alter HDKI-Mäuse sind keine Effekte auf das Calpain-System nachweisbar

Aufgrund der signifikanten Veränderungen der Calpain-Aktivierung und der Komponenten der MAM im Striatum sechs Monate alter HDKI-Mäuse wurden ganze Gehirne von 12 Monate alten HDKI-Mäusen lysiert und ebenfalls durch Western Blot-Analyse überprüft. Dabei fanden sich keine Veränderungen der analysierten Marker α-Spektrin und VDAC1 (Abbildung 13a, b). In der Analyse zur Prozessierung von α-Spektrin musste ein HDKI-Tier (Tierkennzeichnung: H.385.09) aus technischen Gründen ausgeschlossen werden.

- Ergebnisse -

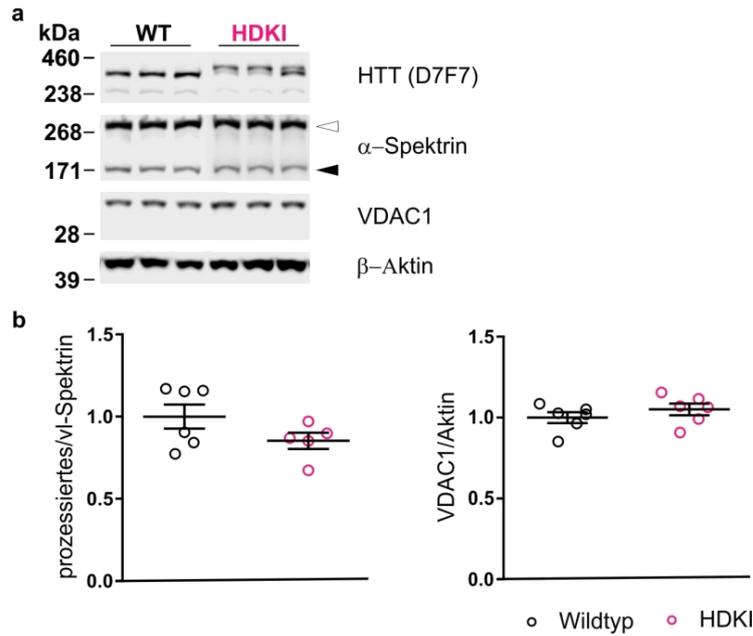


Abbildung 13 – In Gesamtgehirn-Lysaten von 12 Monate alten HDKI-Mäusen zeigen sich keine Hinweise auf veränderte Calpain-Aktivierung und Expression von VDAC1. (a) Protein-Lysate von Gesamtgehirnen zwölf Monate alter HDKI-Mäuse wurden mittels Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen Huntingtin (Klon D7F7),  $\alpha$ -Spektrin und VDAC1 inkubiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Der weiße Pfeil zeigt das Volllängen-Protein  $\alpha$ -Spektrin an. Der schwarze Pfeil deutet auf die prozessierte Version von  $\alpha$ -Spektrin. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von sechs Tieren pro Genotyp dar. vl = Volllängen-Protein.

### 3.1.4 Hypothese der Verbindung zwischen MAM und Calpain-Aktivierung als Grundlage weiterer Experimente

In der Western Blot-Analyse des Striatum sechs Monate alter HDKI-Mäuse wurde eine vermehrte Calpain-Aktivierung sowie eine verminderte Expression von VDAC1 nachgewiesen (Abbildung 10a, b; Abbildung 12a, b). Da das Striatum eines der in der HD am meisten betroffenen Hirnareale ist (Bohanna et al. 2011), könnte eine mögliche Interaktion von mutiertem Huntingtin mit dem mitochondrialen Kanal VDAC vorliegen (Review siehe Karachitos et al. 2015). Diese soll im Weiteren eingehend analysiert werden.

### 3.2 Generierung eines *In-cellulo*-Modelles einer Calpain-Überaktivierung

Ausgehend von aus dem HD-Tiermodell gewonnenen Erkenntnissen über Calpain-Aktivierung und Veränderungen in den MAM-Komponenten wurde ein *In-cellulo*-Modell erzeugt, in dem durch Herabregulation des endogenen Calpain-Inhibitors Calpastatin (CAST) Calpaine überaktiviert sind. Um Auswirkungen auf die Huntingtin-Fragmentierung und -Aggregation beurteilen zu können, wurde eine Behandlungszeit von 72 Stunden in mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin kotransfizierten HEK293T Zellen gewählt.

Es gelang eine durchschnittliche Herabregulation der CAST-Expression mittels esiRNA-Knockdown um 53,2% in mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Zellen und um 54,7% in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen (*Abbildung 14a, b*).

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden in Weber et al. (2018) veröffentlicht.

#### 3.2.1 Calpaine werden durch eine Herabregulation von CAST überaktiviert

Eine Herabregulation von CAST unter Verwendung von CAST-esiRNA führte zu signifikant erhöhter Auto-Prozessierung von Calpain-1 und vermehrter Spaltung von  $\alpha$ -Spektrin in 15QFL-Huntingtin- und 128QFL-Huntingtin-überexprimierenden HEK293T Zellen im Vergleich zu mit *Renilla*-Luciferase (RLUC)-esiRNA transfizierten Kontrollzellen (*Abbildung 14a, b*).

Durch die Reduzierung der Expression von CAST kam es somit zu einer erhöhten Aktivität des Calpain-Systems. Zu bemerken ist allerdings, dass die Grundlevel der Calpain-Aktivierung keine Veränderungen zwischen mit 15QFL-Huntingtin und 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen aufwiesen (*Abbildung 14b*).

- Ergebnisse -

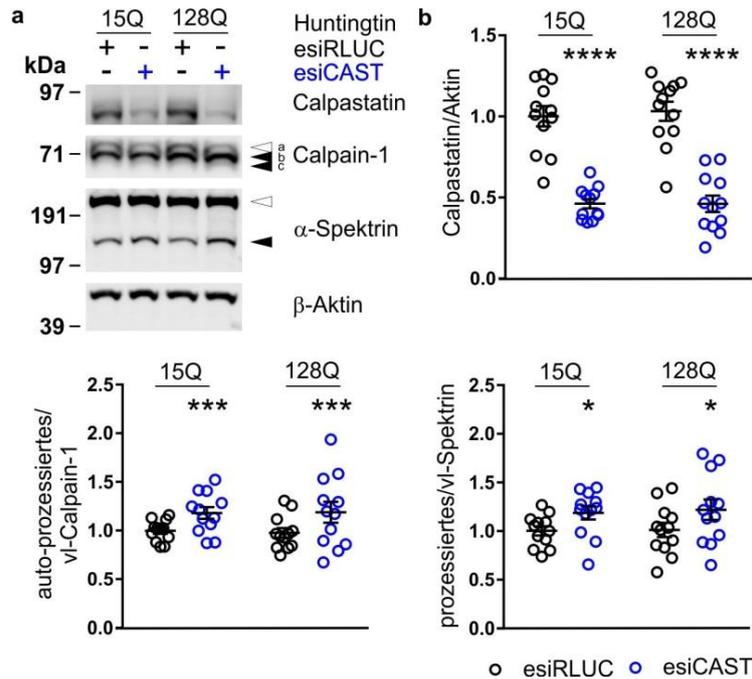
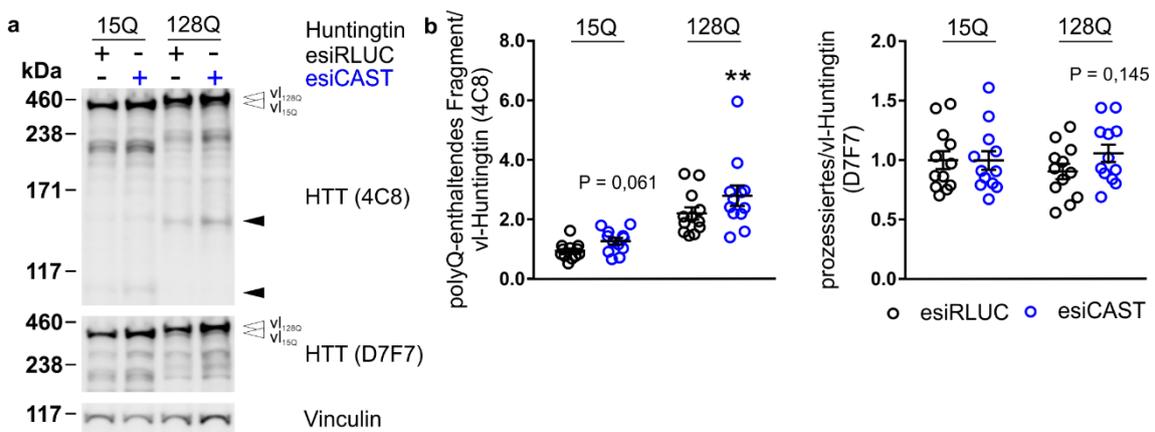


Abbildung 14 – Eine *In-cellulo*-Herabregulation von CAST führt zu vermehrter Auto-Prozessierung von Calpain-1 und zu vermehrter Prozessierung von  $\alpha$ -Spektrin. (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie RLUC- oder CAST-esiRNA transfiziert. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen CAST, Calpain-1 und  $\alpha$ -Spektrin inkubiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen das Volllängen-Protein an. Schwarze Pfeile zeigen auf die auto-prozessierten Formen von Calpain-1 („b“ und „c“) und dieprozessierte Form von  $\alpha$ -Spektrin. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 12 unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Two-Way-ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test ermittelt. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ . vl = Volllängen-Protein. Modifiziert nach Weber et al. (2018).

### 3.2.2 Eine Herabregulation von CAST führt zu vermehrter Spaltung von mutiertem Huntingtin und zu vermehrter zytosolischer und nukleärer Huntingtin-Aggregation

Es wurde untersucht, ob eine durch Herabregulation der Expression von CAST vermittelte Überaktivierung des Calpain-Systems auch zu vermehrter Spaltung von mutiertem Huntingtin führt. Dazu wurden aus den CAST-Knockdown-Versuchen gewonnene Protein-Lysate mittels Western Blot analysiert und mit den Huntingtin-spezifischen Antikörpern 4C8 (Epitop zwischen Aminosäure 443 und 457) und D7F7 (Epitop in der Umgebung von Aminosäure 1220) inkubiert. In der Immundetektion mit dem anti-Huntingtin Antikörper 4C8 fielen Polyglutamin-enhaltende, N-terminale Fragmente auf, die durch eine CAST-Herabregulation in 128QFL-Huntingtin-überexprimierenden Zellen signifikant häufiger auftraten

( $P < 0,01$ ; *Abbildung 15a, b*). Dieser Effekt wurde ebenfalls in 15QFL-Huntingtin-überexprimierenden Zellen beobachtet ( $P = 0,061$ ). Die Polyglutamin-unabhängige Fragmentierung, die mit dem Antikörper D7F7 gemessen wurde, zeigte einen Trend hin zu vermehrter Fragmentierung in 128QFL-Huntingtin-überexprimierenden Zellen ( $P = 0,145$ ). In 15QFL-Huntingtin-überexprimierenden Zellen wurde kein Effekt in der Polyglutamin-unabhängigen Fragmentierung beobachtet (*Abbildung 15a, b*).



**Abbildung 15 – In 128QFL-Huntingtin-überexprimierenden Zellen treten Polyglutamin-enthaltende Fragmente durch eine Herabregulation von CAST signifikant häufiger auf.** (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie RLUC- oder CAST-esiRNA transfiziert. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen Huntingtin (Klon 4C8 und D7F7) inkubiert. Vinculin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen auf das Volllängen-Protein Huntingtin ( $v1_{15Q}$  und  $v1_{128Q}$ ). Die schwarzen Pfeile zeigen auf die Polyglutamin-enthaltenden Fragmente, die mit dem anti-Huntingtin Antikörper 4C8 detektiert wurden. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von 12 unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Two-Way-ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test ermittelt.  $**P < 0,01$ .  $v1$  = Volllängen-Protein; polyQ = Polyglutamin. Modifiziert nach Weber et al. (2018).

N-terminale Huntingtin-Fragmente neigen zu vermehrter Aggregation im Vergleich zum Volllängen-Protein (Cooper et al. 1998; S. H. Li und Li 1998). Aufgrund der vermehrt auftretenden Polyglutamin-enthaltenden Huntingtin-Fragmente wurde weiter untersucht, inwieweit es durch die vermehrte Fragmentierung von mutiertem Huntingtin auch zu vermehrter Huntingtin-Aggregation kommt. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich unter Verwendung des anti-Huntingtin Antikörpers 4C8 eine vermehrte Formation von

N-terminalen zytosolischen ( $P < 0,0001$ ) und nukleären ( $P < 0,05$ ) Huntingtin-Aggregaten durch eine Herabregulation der Expression von CAST (*Abbildung 16a*). Dabei lag die Anzahl zytosolischer Aggregate etwa 10-fach höher als die Anzahl nukleärer Aggregate (*Abbildung 16b*).

Diese Ergebnisse wurden durch Filter-Retardation-Assay bestätigt. Die analysierten CAST-Knockdown-Protein-Homogenate zeigten eine signifikante Zunahme an SDS-unlöslichen Huntingtin-Aggregaten ( $P < 0,05$ ) unter Verwendung des N-terminalen, anti-Huntingtin Antikörpers 4C8 (*Abbildung 16c, d*).

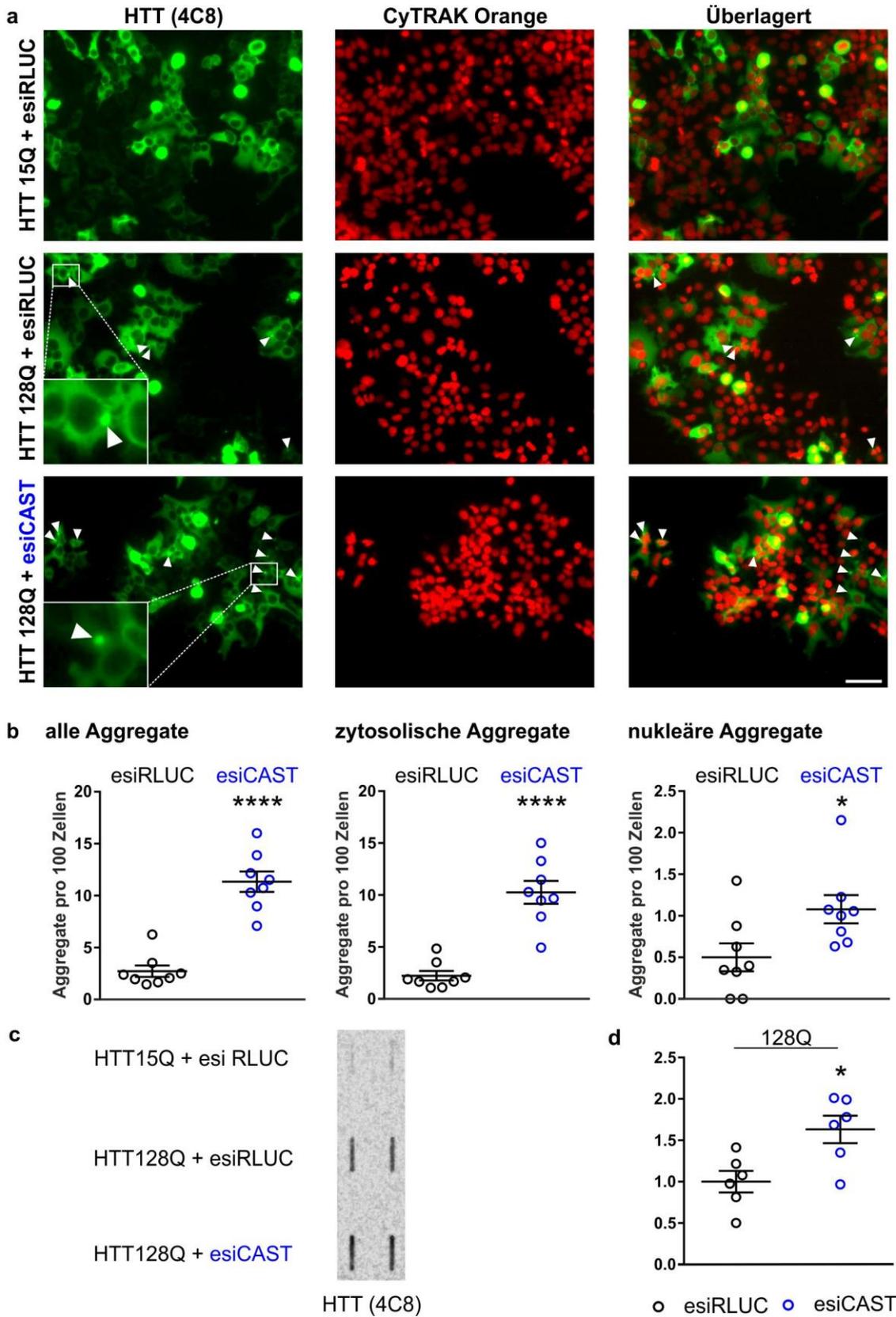


Abbildung 16 – Die nukleäre und zytosolische Aggregation von mutiertem Huntingtin wird signifikant gesteigert durch eine Herabregulation von CAST. (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie RLUC- oder CAST-esiRNA transfiziert. Es fand eine immunzyto-

## - Ergebnisse -

chemische Färbung mit dem anti-Huntingtin Antikörper 4C8 statt. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor 488 verwendet. Zur nukleären Gegenfärbung wurde weiterhin eine CyTRAK Orange Färbung durchgeführt. Die weißen Pfeile deuten auf Aggregate von mutiertem Huntingtin. Der Maßstab entspricht 50 µm. (b) Mittels des *cell-counter* Plug-Ins der Software ImageJ wurde die Zellzahl der 128QFL-Huntingtin-überexprimierenden Zellen sowie die Zahl der nukleären und zytosolischen Aggregate manuell ausgezählt. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von acht unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. \* $P < 0,05$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ . (c) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie RLUC- oder CAST-esiRNA transfiziert. Protein-Homogenate (5 µg pro Ansatz) wurden mittels Filter-Retardation-Assay analysiert. Zurückgebliebene, SDS-unlösliche Aggregate wurden mit dem anti-Huntingtin Antikörper 4C8 inkubiert. (d) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von sechs unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. \* $P < 0,05$ . Modifiziert nach Weber et al. (2018).

Menzies et al. (2015) konnten zeigen, dass eine Überexpression von CAST in einem HD-Mausmodell zu einer verringerten Calpain-Aktivität führt, die ihrerseits die Level an Autophagosomen und die Autophagie-Rate erhöht. In Anbetracht dieser Resultate wurden die Protein-Lysate auf p62 und LC3-II, zwei spezifische Marker des Autophagie-Systems, überprüft. p62 ist ein Autophagie-Adaptor-Protein, das im Zuge einer vermehrten Autophagie zunehmend abgebaut werden würde. LC3-II wird häufig als Marker für die Anzahl an Autophagosomen herangezogen, da es als modifizierte Variante von LC3 bei erhöhter Autophagie gehäuft auftritt.

In den durchgeführten Grundlevel-Analysen an Protein-Lysaten der durchgeführten CAST-Knockdown Experimente fanden sich keine Veränderungen in den Autophagie-Markern p62 und LC3-II, die auf eine reduzierte Autophagie-Induktion hinweisen könnten (*Abbildung 17a, b*).

- Ergebnisse -

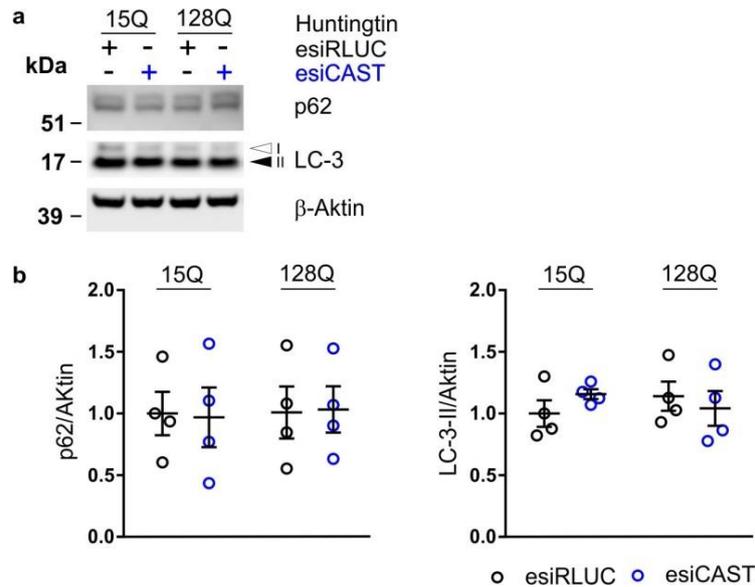


Abbildung 17 – Eine Herabregulation von CAST bewirkt keine veränderte Grundaktivität typischer Autophagie-Markerproteine. (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie RLUC- oder CAST-esiRNA transfiziert. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen p62 und LC3 inkubiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Der weiße Pfeil zeigt auf die Variante LC3-I, der schwarze Pfeil auf die Variante LC3-II. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von vier unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Modifiziert nach Weber et al. (2018).

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass eine Herabregulation des endogenen Calpain-Inhibitors CAST zu einer vermehrten Aktivierung des Calpain-Systems und konsekutiv zu vermehrter Calpain-vermittelter Huntingtin-Prozessierung und Huntingtin-Aggregation führt. Diese Effekte können wahrscheinlich nicht auf eine verringerte Autophagie-Rate zurückgeführt werden.

### 3.3 Untersuchung der *In-cellulo*-Wirkung von Olesoxim und der *In-cellulo*-Effekte einer genetischen und pharmakologischen Beeinflussung von VDAC1

VDAC1 spielt eine wichtige Rolle in der Calcium-Homöostase sowie in einigen regulatorischen Funktionen der Zelle (Review siehe Karachitos et al. 2015). Aufgrund dieser elementaren Bedeutung könnte VDAC1 ein geeignetes Ziel-Protein sein, um den in 3.2 beobachteten, Calpain-vermittelten molekularen HD-Phänotyp zu verbessern.

Olesoxim (TRO19622), ein Cholesterol-Derivat, das an die beiden Kanäle VDAC1 und TSPO in der äußeren Mitochondrienmembran bindet (Bordet et al. 2007), zeigte bei *In-vivo*-Versuchen an der BACHD-Ratte bereits positive Effekte auf die Pathogenese der HD. Es kam zu einem verbesserten Verhaltens- und neuropathologischen Phänotyp sowie zu einer verminderten molekularen Spaltung von mutiertem Huntingtin und einer verminderten Calpain-Aktivierung (Clemens et al. 2015). Der genaue Wirkmechanismus von Olesoxim ist allerdings weiterhin unklar.

Diese *In-vivo*-Effekte wurden nun auch *in cellulo* untersucht. Um den Wirkmechanismus von Olesoxim weiter zu untersuchen, wurden die Effekte einer pharmakologischen Inhibition von VDAC1 mittels Itraconazol und die Effekte einer genetischen Überexpression bzw. Herabregulation von VDAC1 überprüft und mit den Auswirkungen einer Olesoxim-Behandlung verglichen.

#### 3.3.1 Etablierung einer Olesoxim-Behandlung in HEK293T Zellen

In Betrachtung der verwendeten Olesoxim-Dosierungen in vorangegangenen *In-cellulo*-Experimenten (Bordet et al. 2007; Eckmann et al. 2014; Magalon et al. 2012; Rovini et al. 2010) wurde zunächst eine Olesoxim-Dosisfindung in Form einer Konzentrationsreihe durchgeführt. Dazu wurden HEK293T Zellen nach 24 Stunden mit 15QFL- und 128QFL-Huntingtin-Plasmid-DNA transfiziert. 24 Stunden nach erfolgter Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch Olesoxim-haltiges Zellkulturmedium ersetzt. Dabei wurden Konzentrationen von

- Ergebnisse -

2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  gewählt. Im Folgenden sollte der Fragmentierungsgrad von mutiertem Huntingtin mittels des anti-Huntingtin Antikörpers 4C8 evaluiert werden (*Abbildung 18*).

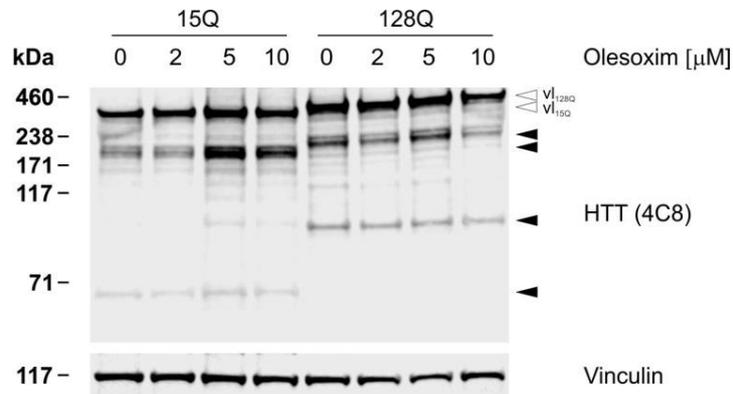


Abbildung 18 – **Dosisfindung für eine 48-stündige Olesoxim-Behandlung *in cellulo***. HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch DMSO-, bzw. Olesoxim-haltiges Zellkulturmedium in der jeweiligen Konzentration ausgetauscht. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit dem anti-Huntingtin Antikörper 4C8 inkubiert. Vinculin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen auf das Volllängen-Protein Huntingtin (vl<sub>15Q</sub> und vl<sub>128Q</sub>). Die schwarzen Pfeile zeigen auf beispielhafte Polyglutamin-enthaltende Fragmente. vl = Volllängen-Protein.

Mittels Densitometrie wurde das Volllängen-Huntingtin (weiße Pfeile in *Abbildung 18*) sowie die Gesamtheit der Huntingtin-Fragmente quantifiziert. Anschließend wurde ein Quotient aus der gemessenen Fragmentierung und der Expression des zugehörigen Volllängen-Proteins gebildet. Die Quotienten wurden normalisiert auf die jeweilige DMSO-Kontrolle und in *Abbildung 19* dargestellt.

- Ergebnisse -

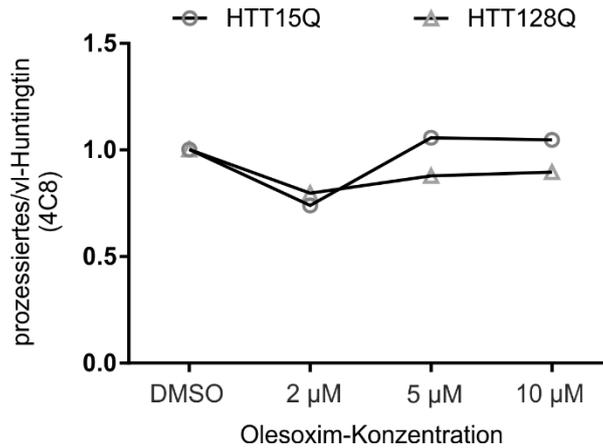


Abbildung 19 – **Prozessiertes/vl-Huntingtin bei verschiedenen Olesoxim-Konzentrationen.** HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch DMSO-, bzw. Olesoxim-haltiges Zellkulturmedium in der jeweiligen Konzentration ausgetauscht. Das Experiment wurde nach 48 h Olesoxim-Behandlung beendet. Der Quotient prozessiertes/vl-Huntingtin wurde auf die jeweilige DMSO-Kontrolle normalisiert.

Die Huntingtin-Fragmentierung konnte in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen in allen Olesoxim-Konzentrationen vermindert werden (im Vergleich zur DMSO-Kontrolle). Der Effekt einer Reduktion der Huntingtin-Fragmentierung in mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Zellen fand sich lediglich bei einer Olesoxim-Konzentration von 2 μM. Im Folgenden wurde mit dieser Konzentration weiter verfahren.

### 3.3.2 Auswirkungen einer Olesoxim-Behandlung *in cellulo* auf das Calpain-System und auf die Prozessierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin

Im Gegensatz zu der durch Olesoxim-Behandlung stark ansteigenden VDAC1-Expression in der BACHD-Ratte (Clemens et al. 2015) konnten bei der durchgeführten 48-stündigen Behandlung von HEK293T Zellen mit 2 μM Olesoxim keine signifikanten Veränderungen der Expressions-Level von VDAC1 festgestellt werden (*Abbildung 20a, b*). Es wurde lediglich ein Trend hin zu einer durch 2 μM Olesoxim gering vermehrten VDAC1-Expression in 15QFL-Huntingtin-überexprimierenden Zellen ( $P = 0,149$ ) und ein schwacher Trend hin zu einer verminderten VDAC1-Expression in 128QFL-Huntingtin-

- Ergebnisse -

überexprimierenden Zellen ( $P = 0,136$ ) beobachtet (Abbildung 20a, b). Es kam zu keinen signifikanten Veränderungen in den Aktivitätsmarkern des Calpain-Systems (Abbildung 20a, b). In den Auswertungen zur Calpain-Auto-Prozessierung und  $\alpha$ -Spektrin-Prozessierung wurde jeweils eine DMSO-Kontrolle bei 15QFL-Huntingtin (Versuchsreihe A vom 13.02.2017) und 128QFL-Huntingtin (Versuchsreihe B vom 13.02.2017) aus technischen Gründen ausgeschlossen.

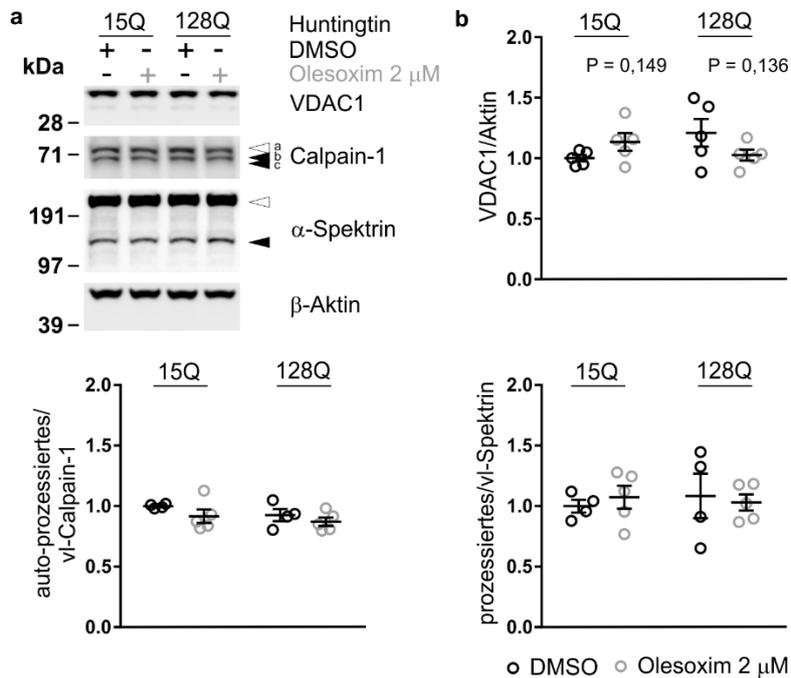
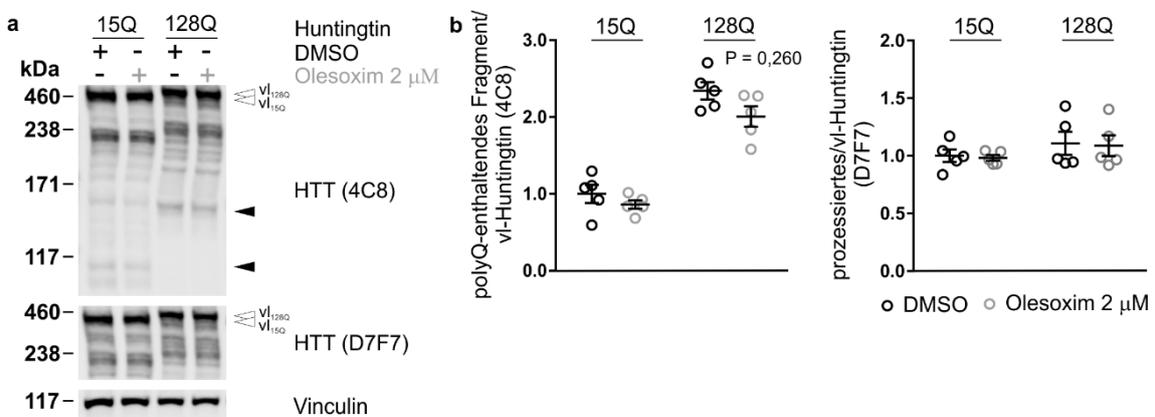


Abbildung 20 – **Eine Olesoxim-Behandlung *in cellulo* führt zu keinen signifikanten Veränderungen in der Aktivität des Calpain-Systems.** (a) HEK293T Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin für 48 h mit 2  $\mu$ M Olesoxim-haltigem Medium, bzw. einer DMSO-haltigen Kontrolle behandelt. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen VDAC1, Calpain-1 und  $\alpha$ -Spektrin inkubiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen das Volllängen-Protein an. Schwarze Pfeile zeigen auf die auto-prozessierten Formen von Calpain-1 („b“ und „c“) und die prozessierte Form von  $\alpha$ -Spektrin. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von vier unabhängig durchgeführten Experimenten dar.  $P$ -Werte wurden mittels Two-Way-ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test ermittelt. vl = Volllängen-Protein.

In der BACHD-Ratte wurde eine durch Olesoxim-Behandlung verminderte Fragmentierung von mutiertem Huntingtin beobachtet (Clemens et al. 2015). Um diese Ergebnisse *in cellulo* zu überprüfen, wurden die Protein-Lysate via Western Blot analysiert und mit spezifischen anti-Huntingtin Antikörpern (Klon 4C8 und

D7F7) inkubiert. In der Detektion mit dem N-terminalen anti-Huntingtin Antikörper 4C8 fielen bereits zuvor in 3.2.2 beobachtete Polyglutamin-enhaltende, N-terminale Fragmente auf (schwarze Pfeile *Abbildung 21a*). Diese zeigten einen Trend hin zu verminderter Fragmentierung in Olesoxim-behandelten Zellen ( $P = 0,260$  in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen). Die Polyglutamin-unabhängige Fragmentierung, die mit dem Antikörper D7F7 gemessen wurde, konnte weder durch Überexpression von 128QFL-Huntingtin noch durch eine Olesoxim-Behandlung beeinflusst werden (*Abbildung 21a, b*).



**Abbildung 21 – Eine Olesoxim-Behandlung *in cellulo* führt zu keinen signifikanten Veränderungen in der Huntingtin-Fragmentierung.** (a) HEK293T Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin für 48 h mit 2 µM Olesoxim-haltigem Medium, bzw. einer DMSO-haltigen Kontrolle behandelt. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen Huntingtin (Klon 4C8 und D7F7) inkubiert. Vinculin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen auf das Volllängen-Protein Huntingtin ( $vI_{150}$  und  $vI_{128Q}$ ). Die schwarzen Pfeile zeigen auf die Polyglutamin-enhaltenden Fragmente, die mit dem Antikörper 4C8 detektiert wurden. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von fünf unabhängig durchgeführten Experimenten dar.  $P$ -Werte wurden mittels Two-Way-ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test ermittelt. vI = Volllängen-Protein; polyQ = Polyglutamin.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Olesoxim-Behandlung *in cellulo* zu veränderter Aggregation von mutiertem Huntingtin führt. Dazu wurde ein Filter-Retardation-Assay durchgeführt. Interessanterweise zeigte sich ein leichter Trend hin zu vermehrter Formierung von SDS-unlöslichen Huntingtin-Aggregaten (*Abbildung 22a, b*).

- Ergebnisse -

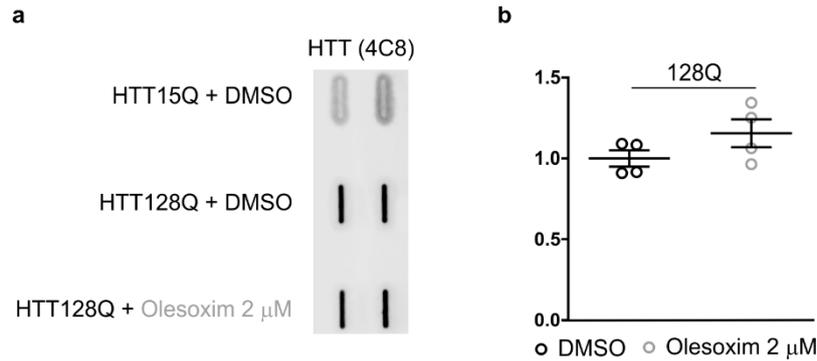


Abbildung 22 – Eine Olesoxim-Behandlung *in cellulo* führt zu keinen signifikanten Veränderungen in der Huntingtin-Aggregation. (a) HEK293T Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin für 48 h mit 2 µM Olesoxim-haltigem Medium, bzw. einer DMSO-haltigen Kontrolle behandelt. Protein-Homogenate (12,5 µg pro Ansatz) wurden mittels Filter-Retardation-Assay analysiert. Zurückgebliebene, SDS-unlösliche Aggregate wurden mit dem anti-Huntingtin Antikörper 4C8 nachgewiesen. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert ± SEM von vier unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

In den durchgeführten Versuchen wurden keine signifikanten Effekte einer Olesoxim-Behandlung auf das Calpain-System oder auf die Fragmentierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin beobachtet.

### 3.3.3 Etablierung einer VDAC1-Überexpression in HEK293T Zellen

Um die Effekte einer genetischen Überexpression von VDAC1, einem pharmakologischen Target von Olesoxim, zu untersuchen, sollte eine 72-stündige Überexpression mit zwei FLAG-Octapeptid-markierten DNA-Plasmiden für VDAC1 durchgeführt werden.

Klon 1 zeigte dabei deutlich höhere Expressions-Level als Klon 2, wie man an der erhöhten Fluoreszenz des FLAG-Antikörpers erkennen kann (*Abbildung 23*). Ein Vergleich der VDAC1- mit der FLAG-Detektion lässt den Schluss zu, dass die Überexpression für beide Klone im Vergleich zu den Leveln des endogenen VDAC1 sehr schwach ausfiel. In den folgenden Versuchen wurde mit Klon 1 weiter verfahren.

- Ergebnisse -

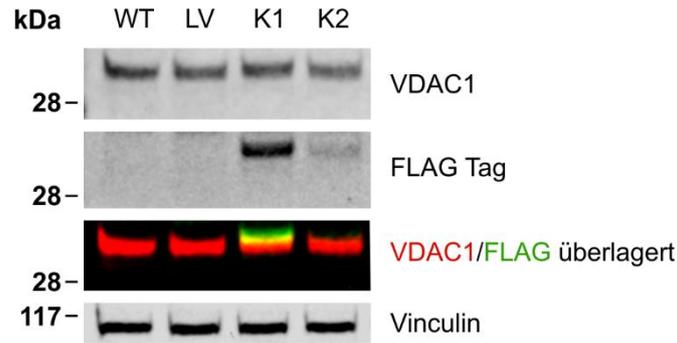


Abbildung 23 – **Klontestung von FLAG-markierten VDAC1-DNA-Konstrukten.** HEK293T Zellen wurden für 72 h mit zwei DNA-Plasmid-Klonen kodierend für FLAG-markiertes VDAC1 (K1 und K2) sowie mit einem Leervektor (LV) als Kontrolle transfiziert. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen VDAC1 und FLAG inkubiert. Vinculin diente als Ladekontrolle.

### 3.3.4 Auswirkungen einer Überexpression von VDAC1 *in cellulo* auf das Calpain-System und auf die Prozessierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin

Um die Bedeutung einer VDAC1-Überexpression im HD-Kontext besser zu verstehen, wurden HEK293T Zellen für 72 Stunden mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin-Plasmid-DNA und einem Leervektor- oder VDAC1-Plasmid-DNA kotransfiziert.

Es zeigten sich keine Veränderungen in der Prozessierung von Calpain-1 und in der Spaltung des Calpain-1-spezifischen Substrates  $\alpha$ -Spektrin (Abbildung 24a, b). Die Calpain-Aktivität konnte weder durch Einbringen von 128QFL-Huntingtin, noch durch VDAC1-Überexpression verändert werden.

- Ergebnisse -

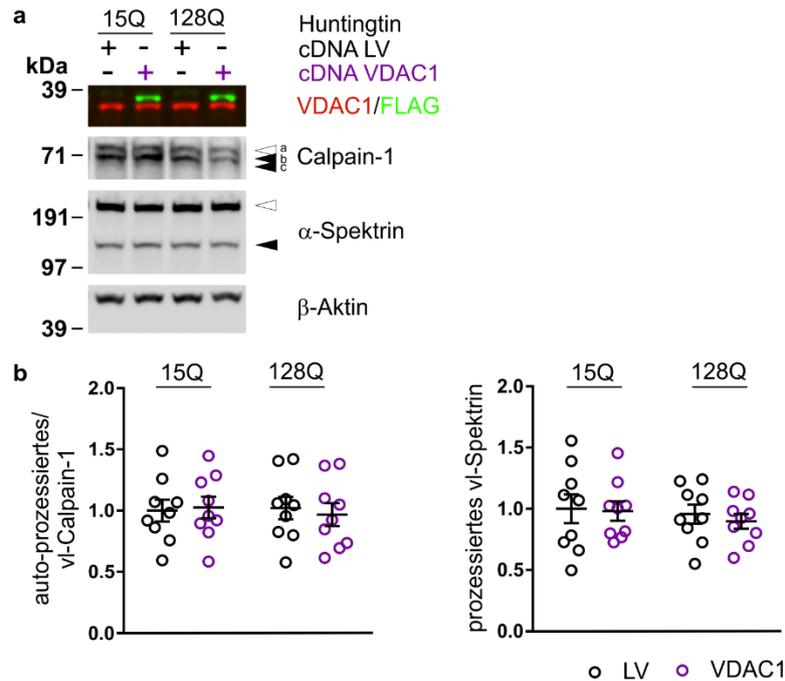


Abbildung 24 – Eine Überexpression von VDAC1 *in cellulo* führt zu keinen Veränderungen in der Aktivität des Calpain-Systems. (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie Leervektor- (LV) und FLAG-markierter VDAC1-DNA kotransfiziert. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen VDAC1, FLAG, Calpain-1 und  $\alpha$ -Spektrin inkubiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Weiße Pfeile zeigen das Volllängen-Protein an. Schwarze Pfeile zeigen auf die auto-prozessierten Formen von Calpain-1 („b“ und „c“) und die prozessierte Form von  $\alpha$ -Spektrin. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von neun unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Statistische Signifikanz und *P*-Werte wurden mittels Two-Way-ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test ermittelt. vl = Volllängen-Protein.

Weiterhin wurden die Protein-Lysate auf Veränderungen in der Huntingtin-Fragmentierung untersucht. Dazu wurden die anti-Huntingtin Antikörper 4C8 und D7F7 verwendet. Interessanterweise konnte ein Trend hin zu einer verminderten Spaltung von 15QFL-Huntingtin sowohl im Huntingtin-spezifischen Antikörper 4C8 ( $P = 0,067$ ) als auch im Huntingtin-spezifischen Antikörper D7F7 ( $P = 0,091$ ) beobachten werden (Abbildung 25a, b). In 128Q-Huntingtin transfizierten Zellen fand sich keine veränderte Huntingtin-Prozessierung. Die Volllängen-Level von Huntingtin wurden durch die VDAC1-Überexpression nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

- Ergebnisse -

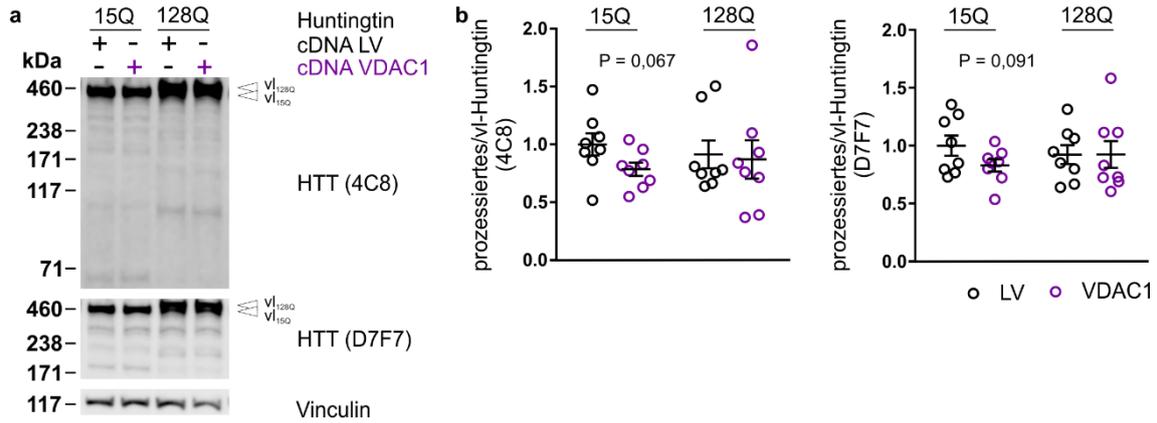


Abbildung 25 – **Eine Überexpression von VDAC1 *in cellulo* bewirkt keine signifikanten Änderungen in der Huntingtin-Fragmentierung.** (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie Leervektor- (LV) und FLAG-markierter VDAC1-DNA kotransfiziert. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit anti-Huntingtin Antikörpern (Klon 4C8 und D7F7) inkubiert. Vinculin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen auf das Vollängen-Protein Huntingtin (vl<sub>15Q</sub> und vl<sub>128Q</sub>). (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von neun unabhängig durchgeführten Experimenten dar. *P*-Werte wurden mittels Two-Way-ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test ermittelt. vl = Vollängen-Protein; polyQ = Polyglutamin.

Abschließend wurden die Auswirkungen einer Überexpression von VDAC1 auf die Huntingtin-Aggregation untersucht. Dabei wurde im Filter-Retardation-Assay ein signifikanter Effekt gefunden ( $P < 0,05$ ), demzufolge eine Überexpression von VDAC1 zur gesteigerten Bildung SDS-unlöslicher Huntingtin-Aggregate führt (Abbildung 26a, b).

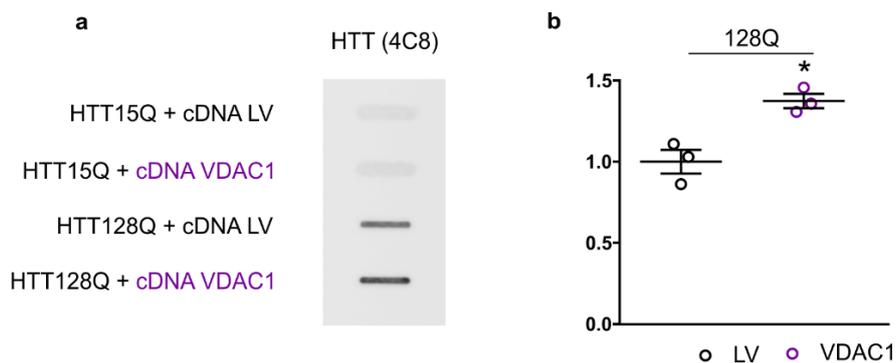


Abbildung 26 – **Eine Überexpression von VDAC1 *in cellulo* führt zu vermehrter Huntingtin-Aggregation.** (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie Leervektor- (LV) und FLAG-markierter VDAC1-DNA kotransfiziert. Protein-Homogenate (12,5  $\mu$ g pro Ansatz) wurden mittels Filter-Retardation-Assay analysiert. Zurückgebliebene, SDS-unlösliche Aggregate wurden mit dem Antikörper Huntingtin 4C8 inkubiert. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. \* $P < 0,05$ .

Das Bild, das sich aus den durchgeführten VDAC1-Überexpressions-Versuchen zeichnet, ist nicht eindeutig. Als einzig signifikanter Effekt wurde eine vermehrte Aggregation von mutiertem Huntingtin festgestellt. Allerdings konnte keine vermehrte Calpain-Aktivierung detektiert werden.

### 3.3.5 Etablierung einer VDAC1-Herabregulation in HEK293T Zellen

In den Tiergewebeproben wurde beobachtet, dass VDAC1 im Striatum sechs Monate alter HDKI-Mäuse schwächer exprimiert wird (vgl. 3.1.2). Da es sich dabei um eine regulatorische, anti-apoptotische Funktion der Zelle handeln könnte, sollte die Auswirkung einer *In-cellulo*-Herabregulation von VDAC1 auf das Calpain-System in 15QFL-/128QFL-Huntingtin-überexprimierenden HEK293T Zellen untersucht werden.

In der Etablierung der optimalen Behandlungsdauer zur maximalen Herabregulation von VDAC1 wurden HEK293T Zellen mit RLUC- und VDAC1-esiRNA für verschiedene Zeiträume transfiziert (*Abbildung 27*).

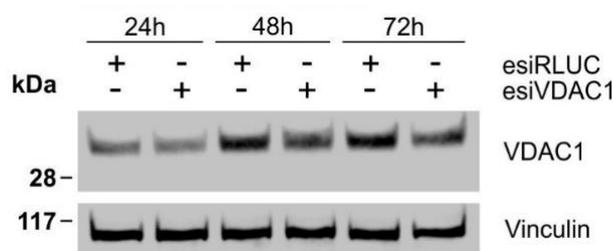


Abbildung 27 – Etablierung einer esiRNA-vermittelten Herabregulation von VDAC1 *in cellulo*. HEK293T Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit VDAC1- und RLUC-esiRNA transfiziert. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit einem anti-VDAC1 Antikörper inkubiert. Vinculin diente als Ladekontrolle.

In dieser ersten Etablierung wurde eine esiRNA-vermittelte VDAC1-Herabregulation von 16% nach 24 h, 14% nach 48 h und 11% nach 72 h erreicht. Da die Effizienz für alle Behandlungszeiträume vergleichbar war, wurde mit einer Transfektionsdauer von 72 Stunden weiter verfahren, womit auch ausreichend Zeit zur Bildung von Huntingtin-Aggregaten gegeben war.

### 3.3.6 Auswirkungen einer Herabregulation von VDAC1 *in cellulo* auf das Calpain-System und auf die Prozessierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin

Da Effekte auf das Calpain-System im HD-Kontext beurteilt werden sollten, wurden HEK293T Zellen für 72 Stunden mit RLUC-/VDAC1-esiRNA und 15QFL-/128QFL-Huntingtin-Plasmid-DNA kotransfiziert. Die Herabregulation der Expression von VDAC1 gelang mit durchschnittlich 42,4% für mit 15QFL-Huntingtin transfizierte Zellen und 48,1% für mit 128QFL-Huntingtin transfizierte Zellen (*Abbildung 28a, b*).

Es wurde eine tendenziell verminderte Aktivierung des Calpain-Systems durch VDAC1-Herabregulation in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen beobachtet (*Abbildung 28a, b*). Diese äußerte sich sowohl in einer verminderten Prozessierung von Calpain-1 ( $P = 0,380$ ) als auch in verringerter Spaltung des Calpain-Substrates  $\alpha$ -Spektrin ( $P = 0,060$ ). Es fand sich eine leichte Steigerung im Grundlevel der Calpain-Aktivität im Vergleich von mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Zellen zu mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen. Insgesamt zeigten die Daten allerdings eine große Streuung.

- Ergebnisse -

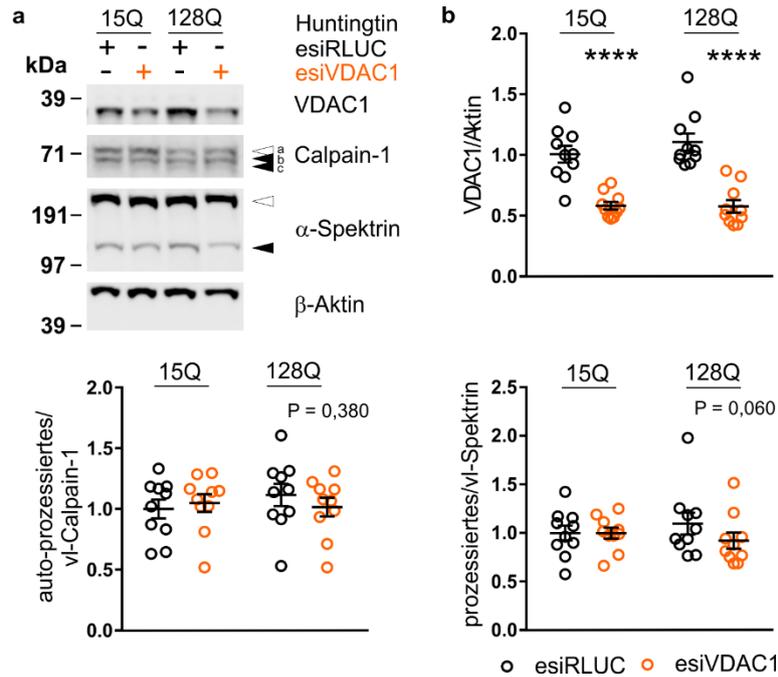


Abbildung 28 – Eine Herabregulation von VDAC1 *in cellulo* führt zu keinen signifikanten Veränderungen in der Aktivität des Calpain-Systems. (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie RLUC- und VDAC1-esiRNA kotransfiziert. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen VDAC1, Calpain-1 und α-Spektrin inkubiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen das Volllängen-Protein an. Schwarze Pfeile zeigen auf die auto-prozessierten Formen von Calpain-1 („b“ und „c“) und die prozessierte Form von α-Spektrin. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert ± SEM von zehn unabhängig durchgeführten Experimenten dar. *P*-Werte wurden mittels Two-Way-ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test ermittelt. vl = Volllängen-Protein.

Die Prozessierung von mutiertem Huntingtin wurde durch Analyse der anti-Huntingtin Antikörper D7F7 und 4C8 überprüft (Abbildung 29a, b). Dabei zeigte sich eine signifikante Verminderung der Huntingtin-Prozessierung durch reduzierte Expression von VDAC1 in mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Zellen ( $P < 0,01$ ). Dieser Effekt ließ sich in beiden Huntingtin-spezifischen Antikörpern nachweisen. Interessanterweise war die Huntingtin-Prozessierung im Grundlevel (bezogen auf die jeweilige Expression des Volllängen-Proteins) in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen niedriger als in mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Zellen.

- Ergebnisse -

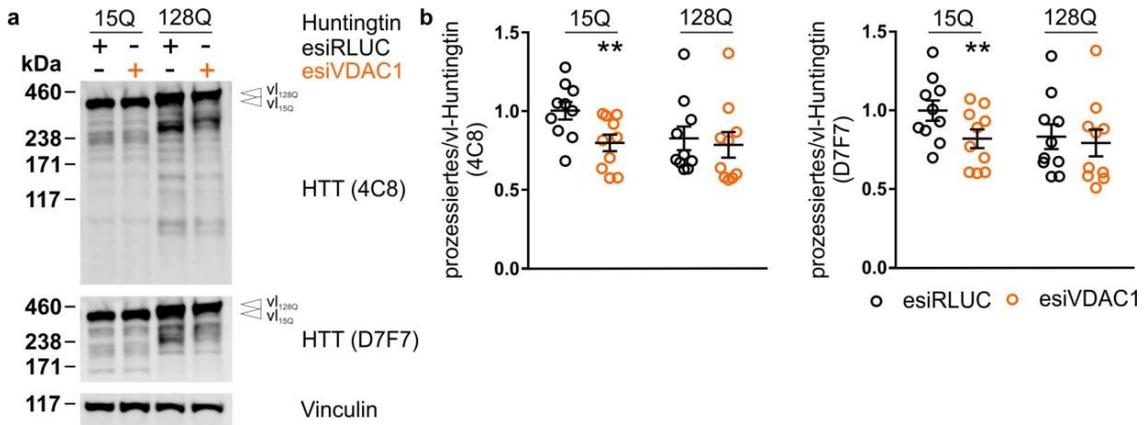


Abbildung 29 – Eine Herabregulation von VDAC1 *in cellulo* führt zu einer signifikant niedrigeren Huntingtin-Prozessierung in mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Zellen. (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie RLUC- und VDAC1-esiRNA transfiziert. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit anti-Huntingtin Antikörpern (Klon 4C8 und D7F7) inkubiert. Vinculin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen das Vollängen-Protein Huntingtin ( $v_{15Q}$  und  $v_{128Q}$ ) an. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von neun unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Two-Way-ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test ermittelt.  $**P < 0,01$ . vl = Vollängen-Protein.

Mit Hilfe des Filter-Retardation-Assay wurden durch VDAC1-Herabregulation vermittelte Veränderungen im Aggregationsverhalten des mutierten Huntingtin untersucht. Dabei zeigte sich ein schwacher Trend hin zu einer reduzierten Aggregationsneigung (Abbildung 30a, b).

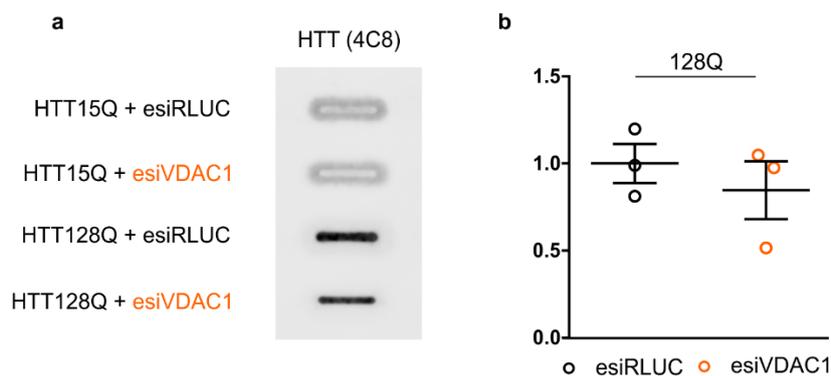


Abbildung 30 – Eine Herabregulation von VDAC1 *in cellulo* zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Huntingtin-Aggregation. (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin sowie RLUC- und VDAC1-esiRNA transfiziert. Protein-Homogenate (12,5  $\mu$ g pro Ansatz) wurden mittels Filter-Retardation-Assay analysiert. Zurückgebliebene, SDS-unlösliche Aggregate wurden mit dem anti-Huntingtin Antikörper 4C8 inkubiert. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

Eine Herabregulation von VDAC1 führte zu einer leicht verminderten Calpain-Aktivität in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen. Diese verminderte Aktivierung von Calpain resultierte allerdings in keiner verringerten Huntingtin-Prozessierung in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen und führte folglich auch zu keiner veränderten Huntingtin-Aggregation. Obwohl keine Veränderung der Calpain-Aktivität in mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Zellen nachgewiesen werden konnte, kam es zu einer signifikant verringerten Huntingtin-Fragmentierung in mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Zellen.

### 3.3.7 Etablierung einer pharmakologischen VDAC1-Inhibition mittels Itraconazol in HEK293T Zellen

Itraconazol ist ein im Jahre 1984 entwickeltes (Espinel-Ingroff et al. 1984), systemisch wirksames Antimykotikum. Die antimykotische Wirkung resultiert dabei aus einer verminderten Ergosterolsynthese in den Zellen des Pilzes und einer damit einhergehenden gesteigerten Permeabilität der Zellmembranen (Goad et al. 1989).

Head et al. (2015) stellten darüber hinaus fest, dass Itraconazol an den mitochondrialen Kanal VDAC1 bindet und diesen inhibiert. Dadurch kommt es zu einer reduzierten ATP-Freisetzung aus dem Mitochondrium. Die daraus resultierenden Effekte auf den AMPK-Signalweg wurden mittels des Phosphorylierungsgrades der P70S6-Kinase via Western Blot analysiert.

Im mTOR-Signalweg phosphoryliert das aktive mTOR die P70S6-Kinase und aktiviert diese dadurch. Die phosphorylierte p-P70S6-Kinase phosphoryliert wiederum das S6-ribosomale Protein (Sarbasov et al. 2005).

In einem ersten Schritt sollten diese Ergebnisse reproduziert werden, um Itraconazol als effektiven VDAC1-Inhibitor zu evaluieren. Dazu wurden HEK293T Zellen für verschiedene Zeiten mit 5  $\mu$ M Itraconazol-haltigem Zellkulturmedium behandelt. Anschließend wurden die Effekte auf die P70S6-Kinase und ihre phosphorylierte Form sowie auf das Substrat, S6 und seine phosphorylierte Form mittels Western Blot-Analyse untersucht (*Abbildung 31*).

- Ergebnisse -

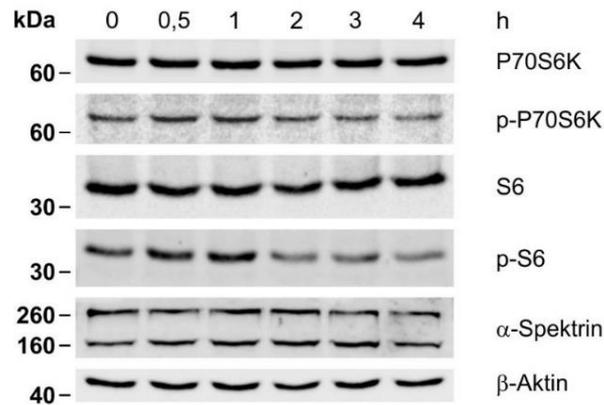


Abbildung 31 – *In-cellulo*-Effekte einer 5 µM Itraconazol-Behandlung auf die P70S6-Kinase, S6 und auf α-Spektrin zu verschiedenen Zeitpunkten. HEK293T Zellen wurden für 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h mit 5 µM Itraconazol-haltigem Zellkulturmedium behandelt. Eine DMSO-Kontrolle wurde für 4 h vergleichend mitgeführt. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen P70S6-Kinase, p-P70S6-Kinase, S6, p-S6 und α-Spektrin inkubiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Die Effekte konnten reproduziert werden, und es zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung der P70S6-Kinase und konsekutiv eine verminderte Phosphorylierung von S6 nach 2 h, 3 h und 4 h (*Abbildung 31*). Effekte auf die Calpain-vermittelte Prozessierung von α-Spektrin wurden in diesem ersten Experiment nicht beobachtet (*Abbildung 31*).

Da in der vorliegenden Arbeit auch die Aggregation von mutiertem Huntingtin untersucht werden sollte, musste eine längere Inkubation mit dem Wirkstoff erfolgen, sodass es zu einer ausreichenden Bildung von Huntingtin-Aggregaten kommen konnte. Um die optimale Dosis für eine Itraconazol-Langzeitbehandlung in HEK293T Zellen zu finden, wurden diese mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion fand eine 48-stündige Itraconazol-Behandlung in den Konzentrationen 1 µM, 2 µM und 5 µM statt. Zusätzlich wurde eine DMSO-haltige Kontrolle mitgeführt (*Abbildung 32*).

- Ergebnisse -

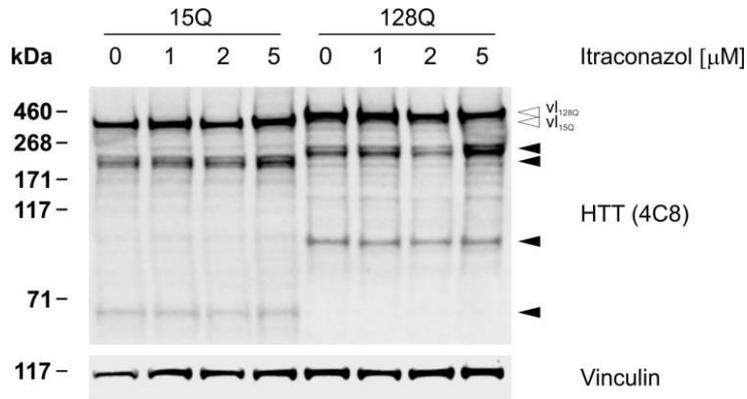


Abbildung 32 – **Dosisfindung für eine 48-stündige Itraconazol-Behandlung *in cellulo***. HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch DMSO-, bzw. Itraconazol-haltiges Zellkulturmedium in der jeweiligen Konzentration ausgetauscht. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit dem anti-Huntingtin Antikörper 4C8 inkubiert. Vinculin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen auf das Volllängen-Protein Huntingtin in seiner 15QFL und 128QFL Variante. Die schwarzen Pfeile zeigen auf beispielhafte Polyglutamin-enthaltende Fragmente.

Unter Verwendung der Densitometrie wurden die Banden der Huntingtin-Volllängen-Proteine (weiße Pfeile in *Abbildung 32*) sowie die Gesamtheit der Huntingtin-Fragmente quantifiziert. Der daraufhin gebildete Quotient aus der gemessenen Fragmentierung und der Expression des zugehörigen Volllängen-Proteins wurde auf die jeweilige DMSO-Kontrolle normalisiert und in *Abbildung 33* dargestellt.

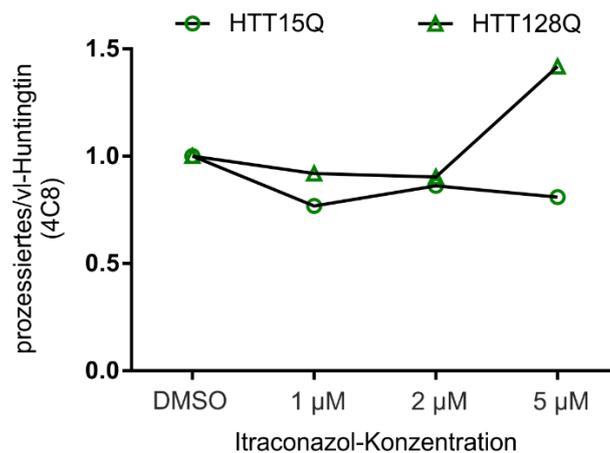


Abbildung 33 - **Prozessiertes/vl-Huntingtin bei verschiedenen Itraconazol-Konzentrationen**. HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch DMSO-, bzw. Itraconazol-haltiges Zellkulturmedium in der jeweiligen Konzentration ausgetauscht. Das Experiment wurde nach 48 h beendet. Der Quotientprozessiertes/vl-Huntingtin wurde normalisiert auf die jeweilige DMSO-Kontrolle.

- Ergebnisse -

Eine Dosis von 5  $\mu\text{M}$  Itraconazol für 48 Stunden zeigte eine deutliche Erhöhung der Huntingtin-Fragmentierung in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen. Diese toxische Wirkung wurde auch durch einen fehlenden Farbumschlag des Indikatorfarbstoffs Phenolrot in den Itraconazol-behandelten Wells der Zellkulturplatte untermauert (*Abbildung 34*). Der fehlende Farbumschlag kann entweder in einem Wachstumsarrest oder in Apoptose begründet sein. Lichtmikroskopische Betrachtung der Zellen lieferte allerdings Hinweise auf apoptotische Vorgänge in den Zellen (Aufnahmen nicht gezeigt). Das Zellsoma zeigte sich geschwollen und die Nuklei wurden kompakter. Vermutlich wirkt sich Itraconazol in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  bei längerer Behandlung auf die Viabilität der Zellen aus und führt zu deren Untergang.

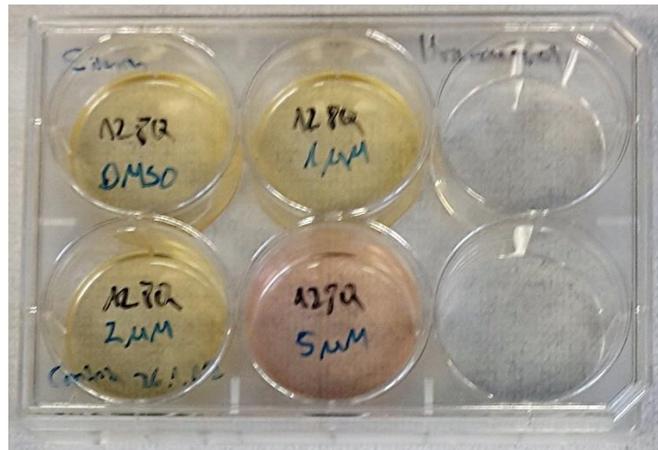


Abbildung 34 – **Zellkulturplatte der Itraconazol-Dosisfindung 48 h nach Beginn der Itraconazol-Behandlung.** HEK293T Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin-Plasmid-DNA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch Itraconazol- bzw. DMSO-haltiges Zellkulturmedium ersetzt. Das Experiment wurde 48 h nach Itraconazol-Behandlung beendet. Zu diesem Zeitpunkt wurde die vorliegende Fotografie aufgenommen.

Die Huntingtin-Fragmentierung konnte in allen mit Itraconazol behandelten und mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Ansätzen reduziert werden (*Abbildung 33*). Die erfolgreichste Reduktion der Huntingtin-Fragmentierung in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen zeigte sich bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  Itraconazol. In der Gesamtschau wurde für die folgenden Experimente eine Itraconazol-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  gewählt.

### 3.3.8 Auswirkungen einer Itraconazol-Behandlung *in cellulo* auf das Calpain-System und auf die Prozessierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin

Mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin-Plasmid-DNA transfizierte HEK293T Zellen wurden für 48 Stunden mit 1  $\mu$ M Itraconazol oder einem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels DMSO behandelt.

Durch Itraconazol-Behandlung zeigte sich ein Trend hin zu einer verminderten Auto-Prozessierung von Calpain-1 ( $P = 0,205$ ) in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten HEK293T Zellen (*Abbildung 35a, b*). Die Grundlevel der Calpain-Aktivität stiegen durch Transfektion mit 128QFL-Huntingtin etwas an. Die durch das eingebrachte 128QFL-Huntingtin gesteigerte Calpain-1-Auto-Prozessierung konnte durch 48-stündige Itraconazol-Behandlung wieder fast auf das Aktivierungslevel der mit 15QFL-Huntingtin transfizierten DMSO-Kontrolle reduziert werden. Im Calpain-1-spezifischen Substrat  $\alpha$ -Spektrin konnte in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen eine durch Itraconazol-Behandlung signifikant verminderte Prozessierung beobachtet werden ( $P < 0,05$ ). Diese weist möglicherweise darauf hin, dass durch eine Behandlung mit Itraconazol und damit einhergehende VDAC1-Inhibition die Calpain-Aktivität in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen verringert wird.

- Ergebnisse -

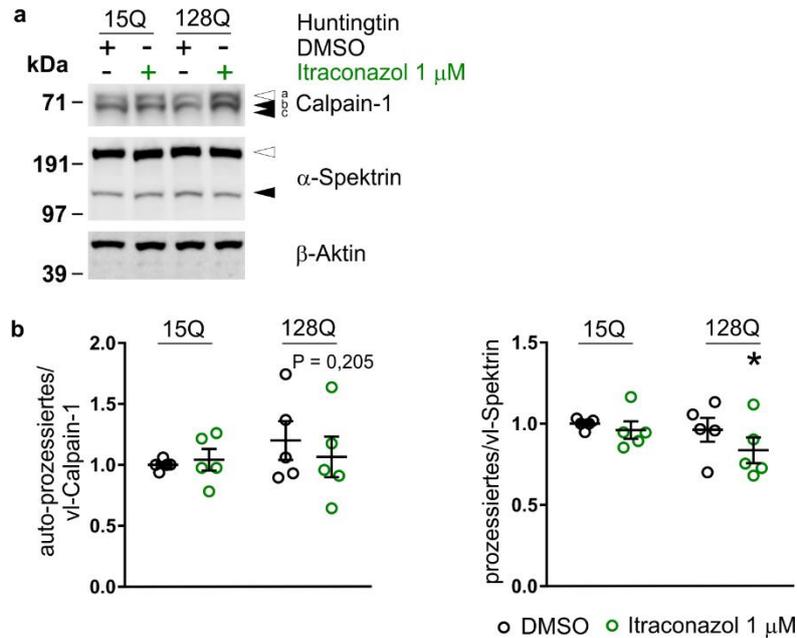


Abbildung 35 – Eine Itraconazol-Behandlung *in cellulo* führt zu einer verminderten Calpain-vermittelten Prozessierung von  $\alpha$ -Spektrin in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen. (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch 1  $\mu$ M Itraconazol-haltiges Zellkulturmedium ersetzt. Vergleichend wurde eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Die Behandlung wurde nach 48 h beendet. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen Calpain-1 und  $\alpha$ -Spektrin inkubiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen das Volllängen-Protein an. Schwarze Pfeile zeigen auf die Auto-Prozessierten Formen von Calpain-1 („b“ und „c“) und die prozessierte Form von  $\alpha$ -Spektrin. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von fünf unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Statistische Signifikanz und *P*-Werte wurden mittels Two-Way-ANOVA mit Holm-Sidak's Post-Hoc-Test ermittelt. \**P* < 0,05. vl = Volllängen-Protein.

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die veränderte Calpain-Aktivität auf die Prozessierung von mutiertem Huntingtin auswirkt. Dazu wurden mit dem anti-Huntingtin Antikörper 4C8 detektierte, Polyglutamin-enhaltende N-terminale Huntingtin-Fragmente betrachtet, die durch Calpaine gespalten werden. Weiterhin wurde die Huntingtin-Fragmentierung unter Verwendung des anti-Huntingtin Antikörpers D7F7 betrachtet. Es zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen der Huntingtin-Fragmentierung bei Itraconazol-Behandlung (Abbildung 36a, b).

- Ergebnisse -

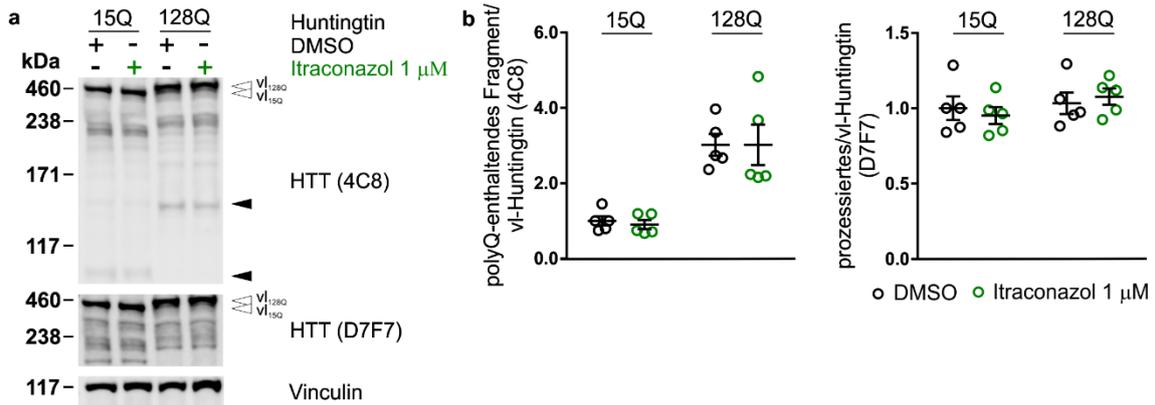


Abbildung 36 – Eine Itraconazol-Behandlung *in cellulo* bewirkt keine signifikanten Änderungen in der Huntingtin-Fragmentierung. (a) HEK293T Zellen wurden für 72 h mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch 1 μM Itraconazol-haltiges Zellkulturmedium ersetzt. Vergleichend wurde eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Die Behandlung wurde nach 48 h beendet. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit anti-Huntingtin Antikörpern (Klon 4C8 und D7F7) inkubiert. Vinculin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen auf das Volllängen-Protein Huntingtin (vl<sub>15Q</sub> und vl<sub>128Q</sub>). Die schwarzen Pfeile zeigen auf die Polyglutamin-enthaltenden Fragmente, die mit dem Huntingtin-Antikörper 4C8 detektiert wurden. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert ± SEM von fünf unabhängig durchgeführten Experimenten dar. vl = Volllängen-Protein; polyQ = Polyglutamin.

Abschließend wurde untersucht, ob sich Itraconazol auf die Aggregationsneigung von mutiertem Huntingtin auswirkt. Im Filter-Retardation-Assay zeigte sich keine Veränderung in der Menge von SDS-unlöslichen Huntingtin-Aggregaten in Protein-Homogenaten der durchgeführten Itraconazol-Behandlungen (Abbildung 37a, b).

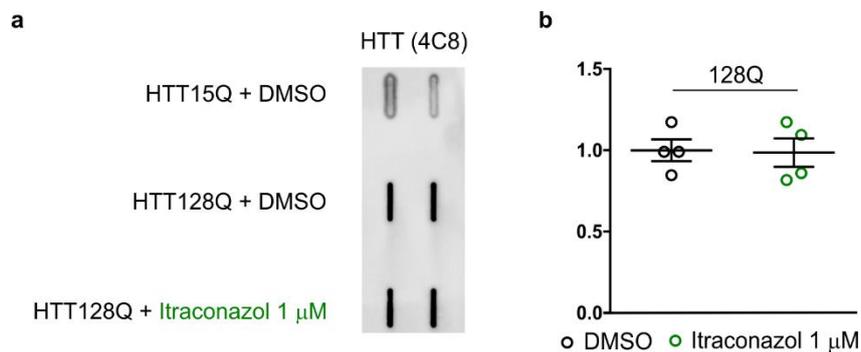


Abbildung 37 – Eine Itraconazol-Behandlung *in cellulo* führt zu keinen Veränderungen in der Huntingtin-Aggregation. (a) HEK293T Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit 15QFL-/128QFL-Huntingtin für 48 h mit 1 μM Itraconazol-haltigem Medium, bzw. einer DMSO-haltigen Kontrolle behandelt. Protein-Homogenate (12,5 μg pro Ansatz) wurden mittels Filter-Retardation-Assay analysiert. Zurückgebliebene, SDS-unlösliche Aggregate wurden mit dem anti-Huntingtin Antikörper 4C8 inkubiert. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert ± SEM von vier unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

Eine Beeinflussung des Calpain-Systems durch pharmakologische Inhibition von VDAC1 mittels Itraconazol gelang nur bedingt. In mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen konnte eine durch Itraconazol-Behandlung signifikant verminderte Calpain-vermittelte Spaltung von  $\alpha$ -Spektrin festgestellt werden. Diese verminderte Calpain-Aktivität hatte allerdings weder Auswirkungen auf die Prozessierung von mutiertem Huntingtin noch auf dessen Aggregation.

### 3.3.9 Analyse des Calpain-Aktivierungsmusters in MEF-VDAC1-Knockout-Zellen

Die in Kultur genommenen MEF-VDAC1-Knockout- und MEF-Wildtyp-Zellen unterschieden sich sowohl morphologisch als auch in ihrem Proliferationsverhalten. Morphologisch zeigten die wildtypischen MEFs ein schlankeres Zellsoma und längere Ausläufer. Die MEF-VDAC1-Knockout-Zellen hingegen zeigten einen sehr großen Nucleus und eine flächigere Struktur (*Abbildung 38a, b*). Zudem proliferierten die MEF-VDAC1-Knockout-Zellen langsamer.

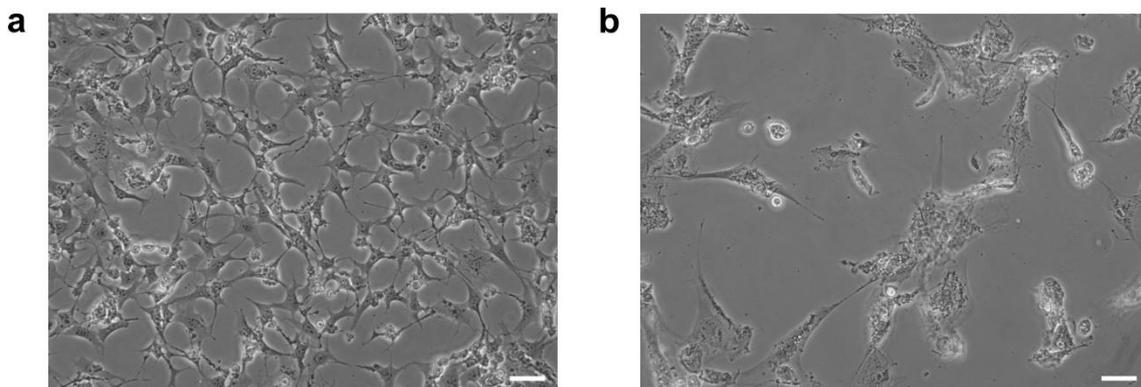


Abbildung 38 – Lichtmikroskopische Aufnahme der verwendeten MEF-Wildtyp- (a) und MEF-VDAC1-Knockout-Zellen (b). Der Maßstab entspricht 50  $\mu$ m.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden 300.000 MEF-Wildtyp- und 500.000 MEF-VDAC1-Knockout-Zellen pro Ansatz für 72 Stunden inkubiert. Die unterschiedliche Zellzahl wurde gewählt, um am Erntezeitpunkt vergleichbare Zellzahlen und Protein-Mengen in den Zell-Lysaten zu erhalten.

- Ergebnisse -

Die erzeugten Zell-Lysate wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht. Es konnte eine signifikante Zunahme der Calpain-vermittelten Spaltung von  $\alpha$ -Spektrin festgestellt werden ( $P < 0,001$ ; *Abbildung 39a, b*). Überraschenderweise zeigte sich keine veränderte Auto-Prozessierung von Calpain-1 (*Abbildung 39a, b*).

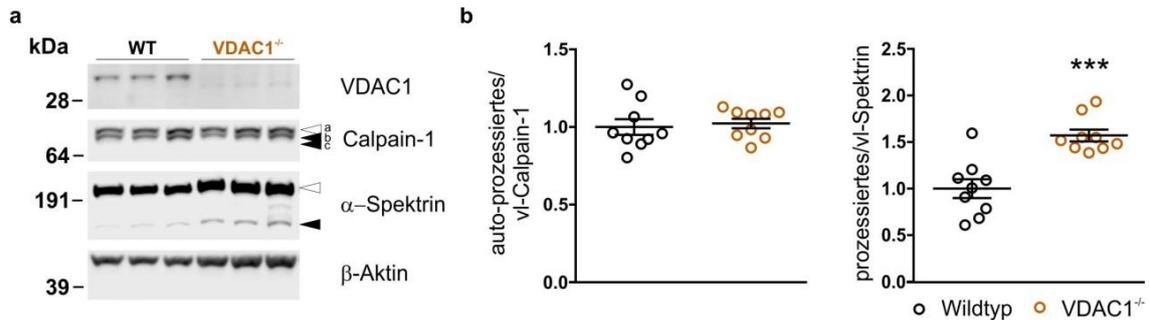


Abbildung 39 – **MEF-VDAC1-Knockout-Zellen zeigen eine signifikant erhöhte Prozessierung von  $\alpha$ -Spektrin ohne Aktivierung von Calpain-1.** (a) MEF-Wildtyp Zellen (300.000 pro Ansatz) und MEF-VDAC1-Knockout-Zellen (500.000 pro Ansatz) Zellen wurden für 72 h inkubiert. Protein-Lysate wurden via Western Blot analysiert und mit Antikörpern gegen VDAC1, Calpain-1 und  $\alpha$ -Spektrin inkubiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Die weißen Pfeile zeigen das Volllängen-Protein an. Schwarze Pfeile zeigen auf die auto-prozessierten Formen von Calpain-1 („b“ und „c“) und die prozessierte Form von  $\alpha$ -Spektrin. (b) Protein-Level wurden densitometrisch mittels der Image Studio Software quantifiziert. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM von neun unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. \*\*\* $P < 0,001$ . vl = Volllängen-Protein.

Im Weiteren wurde versucht, die MEF-Zelllinien durch unterschiedliche Transfektionsverfahren mit den in dieser Arbeit verwendeten 15QFL-/128QFL-Huntingtin-Plasmid-DNA-Konstrukten zu transfizieren. Die Zellen erwiesen sich allerdings als schwer transfizierbar, und es konnte kein überexprimiertes Huntingtin im Western Blot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.10 Zusammenschau der durchgeführten *In-vitro*-Experimente

Um einen Überblick über alle im Zellsystem HEK293T durchgeführten Experimente zu gewinnen wurden relevante Effekte in *Tabelle 22* vereinfacht zusammengefasst.

**Tabelle 22 – Zusammengefasste Auflistung der Ergebnisse aller in HEK293T Zellen durchgeführten *In-vitro*-Experimente.** Pfeile zeigen signifikante Veränderungen in der Protein-Expression an. Pfeile die in Klammern (↑/↓) gesetzt wurden zeigen deutliche Effekte an, die das Signifikanzniveau allerdings nicht erreichen konnten. Für die Huntingtin-Fragmentierung wurden nur Effekte aufgenommen, die mit Hilfe des anti-Huntingtin Antikörpers 4C8 detektiert wurden. Für die Calpain-Aktivierung wurden die Effekte nur dargestellt, wenn sowohl die Calpain-1-Auto-Prozessierung, als auch die Calpain-abhängige  $\alpha$ -Spektrin-Prozessierung synergistische Effekte zeigten. Die angegebenen *P*-Werte beziehen sich bei diesen Experimenten auf die  $\alpha$ -Spektrin-Prozessierung. Die hier dargestellte vereinfachte Aufstellung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und soll nur als orientierende Übersicht dienen. k.V. = „keine Veränderung“; Mikroskop. = „mikroskopisch untersucht“; FRA = „Filter-Retardation-Assay“.

Experiment	Calpain-Aktivierung		Huntingtin-Fragmentierung		Huntingtin-Aggregation
	15QFL-HTT	128QFL-HTT	15QFL-HTT	128QFL-HTT	
<b>Calpastatin-Herabregulation</b>	↑ <i>P</i> < 0,05	↑ <i>P</i> < 0,05	(↑) <i>P</i> = 0,061	↑ <i>P</i> < 0,01	↑ <i>P</i> < 0,0001 (Mikroskop.) ↑ <i>P</i> < 0,05 (FRA)
<b>Olesoxim-Behandlung</b>	k.V.	k.V.	k.V.	(↓) <i>P</i> = 0,260	k.V.
<b>VDAC1-Überexpression</b>	k.V.	k.V.	(↓) <i>P</i> = 0,067	k.V.	↑ <i>P</i> < 0,05
<b>VDAC1-Herabregulation</b>	k.V.	(↓) <i>P</i> = 0,060	↓ <i>P</i> < 0,01	k.V.	k.V.
<b>Itraconazol-Behandlung</b>	k.V.	↓ <i>P</i> < 0,05	k.V.	k.V.	k.V.

## 4 Diskussion

Die molekularen Mechanismen, die bei HD eine Rolle spielen, werden immer besser verstanden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da ein gründlich verstandener Pathomechanismus als Grundlage für eine künftige kausale Therapie Anwendung finden könnte.

Der mitochondriale Kanal VDAC hat bedeutende Funktionen im ATP-Transport, der Formierung der mPTP, der Apoptose-Induktion und im Calcium-Haushalt der Zelle (Boehning et al. 2005; De Stefani et al. 2011; Rasola und Bernardi 2007; Tait und Green 2010). Da Neuronen im Besonderen auf eine ausgeglichene und stabile Calcium-Homöostase sowie einen adäquaten Energie-Metabolismus angewiesen sind, erscheint es naheliegend, dass VDAC eine besondere Rolle im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen spielen könnte (Review siehe Karachitos et al. 2015). So wurde beispielsweise in einem Tiermodell für Morbus Alzheimer gezeigt, dass eine Reduktion von VDAC1 typische Krankheitsmarker wie die synaptische Defizienz oder die mitochondriale Dysfunktion verbessern konnte (Manczak et al. 2013).

Mitochondriale Dysfunktion ist auch ein wichtiges Charakteristikum der HD. Verschiedene Bestrebungen gehen in die Richtung einer kausalen Therapie durch Verbesserung der mitochondrialen Funktion. Aufgrund der vielen Funktionen, welche die Mitochondrien innerhalb der Zelle einnehmen und für die VDAC repräsentativ steht, ist in manchen Fällen aber noch unklar, über welche mitochondriale Funktion es zu einer Verbesserung des molekularen Phänotyps kommt. Es wurde festgestellt, dass die mitochondriale Membranfluidität bei HD erhöht ist (Eckmann et al. 2014), was mögliche Auswirkungen auf die Membranpermeabilität und damit auf die zelluläre Calcium-Homöostase und auf die Aktivierung des Calpain-Systems haben könnte. BACHD-Ratten, die mit dem an VDAC bindenden Medikament Olesoxim behandelt wurden, zeigen einen verbesserten Phänotyp sowie eine verringerte Calpain-vermittelte Huntingtin-Prozessierung (Bordet et al. 2007; Clemens et al. 2015). Die verringerte Anzahl

an toxischen Huntingtin-Fragmenten könnte im Weiteren zu einer geringeren Bildung von Huntingtin-Aggregaten führen.

In dieser Arbeit wurde das Calpain-System im Kontext der HD *in vivo* und *in cellulo* untersucht. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf eine mögliche Beeinflussung des Calpain-Systems durch VDAC1 gelegt.

In einem ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass das Calpain-System im Striatum (nicht aber im Cortex) sechs Monate alter **HDKI-Mäuse** überaktiviert ist. Diese Erkenntnisse bestätigen Effekte, die schon früher im selben Tiermodell beobachtet wurden (Weber et al. 2016). Ähnliche Analysen wurden auch an 13 Monate alten BACHD-Ratten durchgeführt. Bei diesen Tieren zeigte sich allerdings ein entgegengesetztes Muster, da es zu einer vermehrten Calpain-Aktivierung im Cortex (nicht aber im Striatum) kam (Clemens et al. 2015). Interessanterweise kam es in vorangegangenen Studien an diesen beiden HD-Tiermodellen in eben den Hirnregionen zu einer vermehrten Huntingtin-Aggregation, in denen Calpaine verstärkt aktiviert waren. So zeigen vier Monate alte HDKI-Mäuse nur im Striatum nukleäre Mikroaggregate und im weiteren Verlauf auch NII (Menalled et al. 2002), während die Huntingtin-Aggregation in der BACHD-Ratte vorwiegend im cerebralen Cortex auftrat (Yu-Taeger et al. 2012). Frühere Studien konnten außerdem zeigen, dass die erhöhte Calpain-Aktivität in beiden Tiermodellen zu einer vermehrten Fragmentierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin führt (Clemens et al. 2015; Weber et al. 2016).

Ein möglicher Grund für die vermehrte Calpain-Aktivität könnte in einer Dysbalance der Calcium-Homöostase liegen. Als bedeutende Regulatoren der Calcium-Homöostase könnten die MAM-Komponenten VDAC1 und IP3R1 ursächlich an diesem Prozess beteiligt sein. IP3R1 wird durch mutiertes Huntingtin hypersensitiviert und ist damit in die Störung der Calcium-Homöostase involviert (Tang et al. 2003). Zudem wurde festgestellt, dass eine Inhibition von IP3R1 mittels Enoxaparin vor Glutamat-induzierter Apoptose in striatalen, mittelgroßen dornentragenden Neuronen schützt und damit neuroprotektiv wirkt (Tang et al. 2005).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der VDAC1- und IP3R1-Expression im Cortex sechs Monate alter HDKI-Mäuse zeigte keine Unterschiede zum Wildtyp auf. Allerdings wurde im Striatum dieser Tiere eine verminderte Expression von VDAC1 beobachtet. Durch Bezug dieser verminderten Expressions-Level sowohl auf das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin als auch auf das mitochondriale Protein Citrat-Synthase konnte gezeigt werden, dass die verminderte Expression wahrscheinlich an einer verminderten Präsenz von VDAC1 in der äußeren Mitochondrienmembran und nicht an einer geringeren Zahl an Mitochondrien in HDKI-Mäusen liegt. Eine vorangegangene Analyse von Hirnhemisphären drei Monate alter HDKI-Mäuse zeigte eine signifikant erhöhte Expression von VDAC1 und IP3R1 (Weber et al. 2016). In der BACHD-Ratte wurden keine signifikanten Expressions-Unterschiede von VDAC1 und IP3R1 im Striatum 13 Monate alter Tiere gefunden (Clemens et al. 2015). Die Expression von IP3R1 war allerdings im Cortex dieser Tiere deutlich erhöht (Clemens et al. 2015). Bisher in HD-Tiermodellen beobachtete Expressions-Veränderungen von VDAC1 und IP3R1 wurden in *Tabelle 23* zusammengefasst.

**Tabelle 23 – Zusammenfassung der bisherigen Untersuchungen zu Expressions-Leveln von VDAC1 und IP3R1 im Kontext der HD.** Pfeile zeigen signifikante Veränderungen in der Protein-Expression an. Pfeile die in Klammern ( $\uparrow/\downarrow$ ) gesetzt wurden zeigen deutliche Effekte an, die das Signifikanzniveau allerdings nicht erreichen konnten. k.V. = „keine Veränderung“; n.u. = „nicht untersucht“.

Studie	Gewähltes Tiermodell	Untersuchtes Gewebe (Alter der Tiere)	VDAC1	IP3R1
<b>Eigene Untersuchungen</b>	HDKI-Maus	Striatum (6 Monate)	↓	(↓)
		Cortex (6 Monate)	k.V.	k.V.
		Ganzes Gehirn (12 Monate)	k.V.	k.V.
<b>Weber et al. (2016)</b>	HDKI-Maus	Halbes Gehirn (3 Monate)	↑	↑
<b>Clemens et al. (2015)</b>	BACHD-Ratte	Striatum (13 Monate)	(↑)	k.V.
		Cortex (13 Monate)	k.V.	↑
<b>Lou et al. (2016)</b>	HD R6/2-Maus	Striatum (9 Wochen)	↓	n.u.
		Cortex (9 Wochen)	k.V.	n.u.

Die in dieser Arbeit beobachtete verminderte Expression von VDAC1 im Striatum sechs Monate alter HDKI-Mäuse steht nicht im Gegensatz zu früheren

Erkenntnissen. Zum einen wurde in den hier durchgeführten Experimenten nur das Striatum untersucht und nicht eine gesamte Hirnhemisphäre (Vergleich Weber et al. 2016), zum anderen unterscheidet sich auch das Alter der HDKI-Mäuse. Untersuchungen an neun Wochen alten HD R6/2-Mäusen zeigen ähnliche Ergebnisse, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurden (Lou et al. 2016). So wurden im Striatum der HD R6/2-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringerte VDAC1-Level gemessen, während im Cortex dieser Tiere keine Veränderung nachweisbar war (Lou et al. 2016).

Inwieweit eine verminderte Expression von VDAC1 in Zusammenhang mit der beobachteten vermehrten Calpain-Aktivität gebracht werden kann, ist unklar. Da Huntingtin-Fragmente jedoch häufig mit den Mitochondrien kolokalisieren (Choo et al. 2004; Gellerich et al. 2008; A. L. Orr et al. 2008) könnte dies zu einer veränderten Aktivität von VDAC1 und IP3R1 führen. Daher kann hypothetisiert werden, dass es sich bei der verminderten Expression von VDAC1 um einen kompensatorischen Effekt handelt. So könnte die zelluläre Dysbalance in der Calcium-Homöostase zu einer verringerten Expression der MAM-Komponenten VDAC1 und IP3R1 führen. Diese Theorie steht im Einklang mit früheren Erkenntnissen, wonach eine Reduktion von VDAC zu einer verringerten mitochondrialen Calcium-Konzentration führt, während eine Überexpression von VDAC gegenteilige Effekte hat (Madesh und Hajnoczky 2001; Rapizzi et al. 2002).

Die überprüften Gehirne von 12 Monate alten HDKI-Mäusen wiesen weder eine veränderte Calpain-Aktivität, noch eine veränderte Expression von VDAC1 auf. Dies kann an einer Hirnregionen-Spezifität der Überaktivierung von Calpainen und Dysregulation der MAM-Komponenten liegen. Die im Striatum sechs Monate alter HDKI-Mäuse beobachteten Effekte könnten sich auf das gesamte Gehirn herausmitteln, sodass ein im Striatum möglicherweise weiterhin vorhandener Effekt im gesamten Gehirn nicht mehr nachweisbar ist. Weiterhin wurden Gehirne verwendet, die vor Beginn der Anfertigung von Lysaten und dem damit einhergehenden Zusatz von Protease-Inhibitoren, seit über vier Jahren bei -80°C gelagert wurden, sodass es nicht auszuschließen ist, dass die Proben durch diese lange Lagerung an Qualität verloren haben. Eine selektive Analyse des

Striatum 12 Monate alter HDKI-Mäuse war aufgrund fehlenden Materials nicht möglich. Eine dritte mögliche Erklärung besteht in der Attenuierung der Calpain-Aktivität ab einem gewissen Alter. In YAC128-HD-Mäusen wurde im Alter von 1,5 Monaten eine gesteigerte Calpain-Aktivität festgestellt, die im Alter von vier Monaten wieder auf das Grundlevel gesenkt war (Dau et al. 2014).

In den anschließenden *In-cellulo*-Experimenten sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der im Tierversuch beobachteten Expressions-Veränderung von VDAC1 und der erhöhten Calpain-Aktivität weiter untersucht werden. Da in dem gewählten Zellmodell HEK293T eine Calpain-Aktivierung im Grundlevel durch Präsenz von 128QFL-Huntingtin nicht erreicht werden konnte, sollten zunächst die Auswirkungen einer induzierten Calpain-Überaktivierung auf die Fragmentierung und Aggregation von mutiertem Huntingtin untersucht werden. Dazu wurde der endogene Calpain-Inhibitor Calpastatin (CAST) mittels esiRNA herabreguliert, um dadurch Calpaine verstärkt zu aktivieren (Murachi 1989). Ein CAST-Knockout demonstrierte bereits an HDKI-Mäusen (Weber et al. 2018), aber auch an Tiermodellen für SCA3 (Hubener et al. 2013) einen verstärkten molekularen Phänotyp. In gleicher Weise zeigte sich in Tiermodellen für Morbus Parkinson (Diepenbroek et al. 2014; Simoes et al. 2012), Morbus Alzheimer (Rao et al. 2008), ALS (Rao et al. 2016) und HD (Menzies et al. 2015), dass eine Überexpression von CAST zu einem verbesserten molekularen Phänotyp in allen krankheitsspezifischen Tiermodellen führte.

In den durchgeführten Versuchen wurde eine esiRNA-vermittelte **Herabregulation der CAST-Level** um über 50% erreicht. Diese Herabregulation führte zu einer vermehrten Aktivierung von Calpain-1 und einer erhöhten Spaltung des Calpain-Substrates  $\alpha$ -Spektrin (Weber et al. 2018). Die beobachteten Effekte sind bereits vorbeschrieben (Nakajima et al. 2014). Ferner führte eine Herabregulation der CAST-Expression auch zu einer verstärkten Transkription von Calpain-1 mRNA (Ba et al. 2015).

Die Calpain-Aktivierung wirkte sich auf die Fragmentierung von mutiertem Huntingtin aus. Unter Verwendung des anti-Huntingtin Antikörpers D7F7 (Epitop in der Umgebung von Aminosäure 1220) zeigte sich eine leicht vermehrte

Huntingtin-Fragmentierung im mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Ansatz ( $P = 0,145$ ). Im selben Ansatz zeigte der anti-Huntingtin Antikörper 4C8 (Epitop zwischen Aminosäure 443 und 457) eine signifikante Zunahme der Polyglutamin-enhaltenden N-terminalen Huntingtin-Fragmente. Aufgrund ihrer Größe entstanden diese Spaltprodukte am wahrscheinlichsten durch Calpain-abhängige Proteolyse an den früher beschriebenen Spaltstellen um die Aminosäuren 513 oder 536 (Gafni et al. 2004). Eine Rolle von Calpainen in der Proteolyse von mutiertem Huntingtin wird schon lange diskutiert (Clemens et al. 2015; Gafni und Ellerby 2002; Gafni et al. 2004; Weber et al. 2018). Die hier beobachteten Ergebnisse unterstützen diese These weiter. Das vermehrte Auftreten N-terminaler Fragmente, wie es auch in dieser Arbeit beobachtet wurde, ist schon früher als Auslöser für vermehrte Aggregation beschrieben worden (Cooper et al. 1998; Hackam et al. 1998).

Damit im Einklang steht die in dieser Arbeit beobachtete vermehrte Aggregatbildung. Durch CAST-Herabregulation kam es zu einer Zunahme der zytoplasmatischen Huntingtin-Aggregation um etwa das 10-fache und einer Zunahme der nukleären Huntingtin-Aggregation um etwa das doppelte. Die absolute Zahl zytoplasmatischer Aggregate lag dabei 10-fach höher als die Zahl nukleärer Aggregate. Die vermehrte Aggregation konnte auch im Filter-Retardation-Assay bestätigt werden. Hier zeigte sich eine 1,5-fache Zunahme der Aggregation. Diese Beobachtung bestätigt frühere Studien, in denen gezeigt wurde, dass größere Fragmente eher dazu neigen, vermehrt zytoplasmatisch zu aggregieren, während kleinere (bspw. Exon-1-Fragmente) vermehrt NII bilden (Davies et al. 1997; Hackam et al. 1998; Landles et al. 2010). Übereinstimmend mit der hier gewonnenen Erkenntnis, dass eine Herabregulation von CAST die Anzahl an Huntingtin-Aggregaten erhöht, konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CAST *in vitro* zu verminderter Huntingtin-Aggregation führte (Menzies et al. 2015). Eine vermehrte Huntingtin-Aggregation in Folge einer vermehrten Aktivierung des Calpain-Systems wurde ebenfalls in der BACHD-Ratte und der HDKI-Maus beschrieben (Clemens et al. 2015; Weber et al. 2016). Ein CAST-Knockout in HDKI-Mäusen führte ferner zu einer vermehrten Huntingtin-Fragmentierung und -Aggregation (Weber et al. 2018). Diese

Ergebnisse zeigen deutlich, wie gravierend die Aktivierung des Calpain-Systems zur Bildung von Huntingtin-Aggregaten beiträgt. In *Abbildung 40* sind die beschriebenen Zusammenhänge übersichtlich dargestellt.

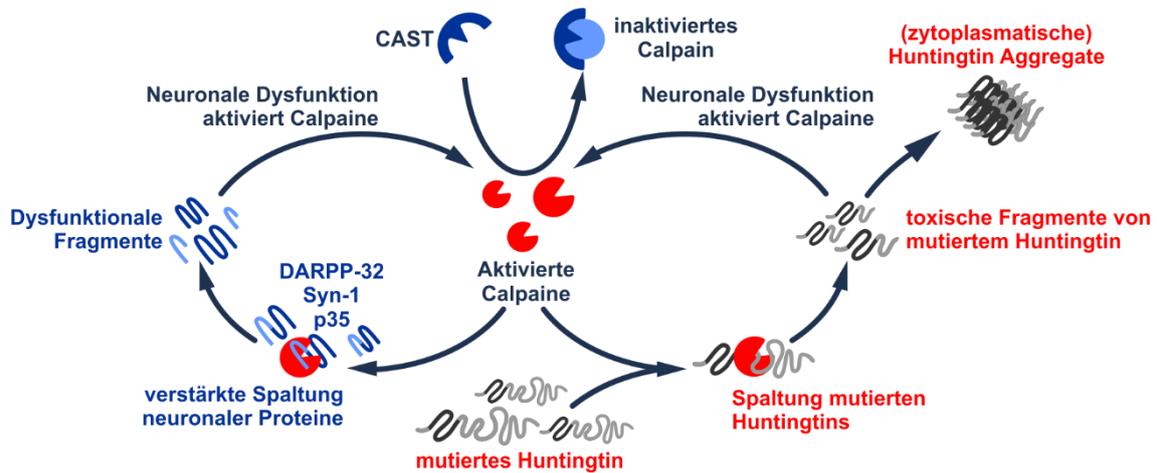


Abbildung 40 – **Darstellung der Prozesse Calpain-vermittelter Neurodysfunktion bei HD.** Aktivierte Calpaine prozessieren mutiertes Huntingtin (mHTT) und führen zur vermehrten Formierung toxischer mHTT Fragmente. Diese N-terminalen Fragmente neigen zu vermehrter Aggregation. Darüber hinaus führen sie zu neuronalen Dysfunktionen, die zu einer weiteren Calpain-Aktivierung beitragen. Calpaine sind auch in die verstärkte Spaltung neuronaler Proteine involviert, wie beispielsweise DARPP-32, p35 oder Synapsin-1. Calpain-abhängige Fragmente dieser Proteine sind dysfunktional und können ihre zellulären Aufgaben nicht mehr ausführen. Über verstärkte neuronale Dysfunktion führt auch dieser Pathway zu verstärkter Calpain-Aktivierung. Der endogene Calpain-Inhibitor CAST könnte diese Prozesse unterbinden. Abbildung übersetzt nach Weber et al. (2018).

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass aktive Calpaine Autophagie reduzieren und dadurch den Abbau von Huntingtin-Aggregaten verhindern (Martinez-Vicente et al. 2010; Menzies et al. 2015; Russo et al. 2011; Williams et al. 2008; Yousefi et al. 2006). Die beobachtete Zunahme der Huntingtin-Aggregation könnte also durchaus auch auf Calpain-vermittelte Autophagie-Hemmung zurückzuführen sein. Um diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen wurden die Proben auf die Autophagie-Marker p62 und LC3-II untersucht. Diese wiesen allerdings keine Veränderungen auf und lassen die Vermutung zu, dass die in dieser Arbeit beobachteten Effekte nicht durch eine reduzierte Autophagie verursacht wurden. Zu bemerken ist allerdings, dass in einigen der durchgeführten Autophagie-Studien eine Inhibierung der Autophagie mittels Bafilomycin A1 durchgeführt wurde (bspw. Russo et al. 2011). Bafilomycin

A1 verhindert die Fusion von Autophagosom und Lysosom und schaltet damit den schnellen Autophagie-Fluss aus (Yamamoto et al. 1998; Yoshii und Mizushima 2017). Unterschiede im Grundzustand treten dadurch möglicherweise deutlicher hervor. Die fehlende Bafilomycin A1-Behandlung kann daher als Limitation der in dieser Arbeit durchgeführten *In-cellulo*-Autophagie-Experimente angesehen werden.

Es gilt als gesichert, dass Veränderungen in der Autophagie eine bedeutende Rolle in der molekularen Pathogenese der HD haben. So wurde ein Defekt in der „cargo recognition“ ausgemacht, der möglicherweise für die veränderte Autophagie bei HD verantwortlich ist (Martinez-Vicente et al. 2010). Ein CAST-Knockout in HDKI-Mäusen deutete in Richtung einer Autophagie-Induktion (Weber et al. 2018). Dabei könnte es sich um einen *In-vivo*-Effekt zur Kompensation der Huntingtin-Aggregation handeln, was in einer Linie mit der beobachteten Störung autophagischer Prozesse in YAC128-HD-Mäusen steht (Lee et al. 2012).

Ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen über Huntingtin-Fragmentierungsmuster und Huntingtin-Aggregationsverhalten bei Calpain-Aktivierung im gewählten Zellmodell wurde im Folgenden versucht, VDAC1 durch verschiedene genetische und pharmakologische Methoden zu beeinflussen, um dadurch mögliche Effekte auf die Calcium-Homöostase und schließlich auf das Calpain-System beurteilen zu können.

Der potentiell neuroprotektive Wirkstoff **Olesoxim** bindet an VDAC (Bordet et al. 2007) und zeigte positive Auswirkungen auf molekulare Marker in der BACHD-Ratte und der HDKI-Maus (Clemens et al. 2015; Weber et al. 2016). In der BACHD-Ratte konnte darüber hinaus auch eine positive Beeinflussung des Phänotyps der Tiere festgestellt werden (Clemens et al. 2015). In diesen Arbeiten wurde eine Calpain-vermittelte Reduktion der Fragmentierung von mutiertem Huntingtin nachgewiesen. Basierend hierauf wurde hypothetisiert, dass diese reduzierte Calpain-Aktivität durch eine verringerte zytoplasmatische Calcium-Konzentration verursacht ist. Aufgrund der Calcium-Leitfähigkeit von VDAC wurde dieser Kanal daher als primärer Wirkungsort der beiden Olesoxim-

Bindungsstellen VDAC und TSPO ausgemacht (Bordet et al. 2007; Gincel et al. 2001).

Anders als im Tierversuch zeigten Olesoxim-behandelte Zellen bei den durchgeführten Experimenten keine Veränderungen in der Aktivität des Calpain-Systems und keine veränderte Huntingtin-Fragmentierung oder -Aggregation. Dies kann an einer generell anderen Wirkung von Olesoxim in den verwendeten HEK293T Zellen liegen, die schon in früheren Experimenten eine geringe Reaktion auf Änderungen der Calcium-Homöostase zeigten (unveröffentlichte Daten von Lukas Klumpp, Experimentelle Radioonkologie, Universität Tübingen). Olesoxim wurde zuvor in einer murinen striatalen HD-Zelllinie (*STHdh* Q7/Q111), in murinen Zellen aus dem Spinalganglion und in menschlichen neuronalen sowie menschlichen Krebszellen getestet (Eckmann et al. 2014; Magalon et al. 2012; Rovini et al. 2010). Dabei wurden Effekte auf die mitochondriale Membranfluidität, die Myelinisierung von Nervenscheiden und die neuronale Aussprossung beobachtet. Olesoxim wurde *in cellulo* in Konzentrationen verwendet, die den in den Etablierungsversuchen dieser Arbeit verwendeten entsprachen.

Der genaue Wirkmechanismus, durch den Olesoxim seine Effekte im HD-Tierversuch (Clemens et al. 2015; Weber et al. 2016) oder auch in den klinischen Studien an SMA-Patienten (Bertini et al. 2017) erreicht, bleibt weiterhin unklar. Neben VDAC bindet Olesoxim auch an TSPO in der äußeren Mitochondrienmembran (Bordet et al. 2007). TSPO hat eine bedeutende Rolle in der Neuroinflammation inne (Liu et al. 2014). Es wird breit diskutiert, inwieweit sich eine „mixed binding affinity“ verschiedener Cholesterol-Derivate auf den Wirkmechanismus von Olesoxim und weiterer potentiell neuroprotektiver Cholesterol-Derivate auswirkt (Review siehe T. Kim und Pae 2016). Die Bindung von Olesoxim an TSPO sollte in jedem Fall weiter untersucht werden, da TSPO nicht nur mit VDAC interagiert, sondern auch eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Calcium-Homöostase und bei zellulären Stresssignalkaskaden einnimmt (Gatliff et al. 2017). Diese Eigenschaften könnten einen erheblichen Anteil an den neuroprotektiven Effekten von Olesoxim haben.

Der Versuch einer **VDAC1-Überexpression** mit den zur Verfügung stehenden DNA-Plasmid-Vektoren funktionierte nur eingeschränkt. Das FLAG-markierte VDAC1 konnte zwar mit einem anti-FLAG Antikörper, nicht aber mit einem anti-VDAC1 Antikörper nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die durch Überexpression eingebrachte Menge von VDAC1 im Verhältnis zu den endogenen VDAC1-Leveln sehr gering war. In *Drosophila melanogaster* wurde festgestellt, dass sich die 1B-VDAC-mRNA, eine Spleiß-Variante von VDAC1-mRNA, mit einer 18S rRNA zusammenlagern kann und dadurch die Translation von VDAC1 moduliert bzw. unterdrückt (Leggio et al. 2018). Ein derartiger Mechanismus könnte als regulatorischer Schutzmechanismus der Zelle gegen zu hohes VDAC verstanden werden und könnte auch als Erklärung für die verhältnismäßig schwache VDAC1-Überexpression in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten dienen. Die genaue Bedeutung dieses Mechanismus im Kontext der zahlreichen regulatorischen Funktionen von VDAC ist aber unklar. In dieser Arbeit gelang es durch VDAC-Überexpression weder die Calpain-Aktivierung zu beeinflussen noch die Huntingtin-Fragmentierung. Der signifikante Effekt einer vermehrten Huntingtin-Aggregation durch VDAC1-Überexpression wurde nur an einer Versuchszahl von  $n = 3$  beobachtet. Aufgrund der unschlüssigen Ergebnisse ist es möglich, dass es sich dabei um eine zufällige Signifikanz handelt (Simmons et al. 2011). Weiterhin wäre es möglich, dass die Überexpression des VDAC-FLAG Konstruktes zu einer unbekanntem Interaktion mit mutiertem Huntingtin führt, die dann zur vermehrten Huntingtin-Aggregation beiträgt.

Eine **Herabregulation der VDAC1-Expression** gelang mit ca. 45%-iger Effizienz in einem esiRNA-vermittelten Ansatz (Knockdown). Es fand sich ein durch VDAC1-Herabregulation vermittelter Trend hin zu einer verringerten Calpain-vermittelten  $\alpha$ -Spektrin-Prozessierung in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen ( $P = 0,060$ ). Obwohl die VDAC1-Herabregulation keinen Effekt auf das Calpain-System in mit 15QFL-Huntingtin transfizierten Zellen zeigte, kam es zu einer signifikant verringerten 15QFL-Huntingtin-Prozessierung. Die Fragmentierung und Aggregation von 128QFL-Huntingtin blieb unbeeinträchtigt. Die Herabregulation von VDAC1 war in dieser Versuchsreihe

erfolgreich. Diese scheint aber keinen durchschlagenden Einfluss auf das Calpain-System zu haben. Interessant wäre hier eine Messung der zytosolischen Calcium-Konzentration, um dadurch tiefgreifende Erkenntnisse über die Bedeutung von VDAC im Calcium-Haushalt zu erlangen. Weiterhin ist ungeklärt, wodurch die verringerte 15QFL-Huntingtin-Prozessierung zu Stande kam. Aufgrund einer fehlenden Calpain-1-Aktivierung könnte dieser Effekt auch durch andere Proteasen verursacht sein (vgl. 1.5).

Eine **pharmakologische Inhibition von VDAC** sollte durch den Wirkstoff Itraconazol erreicht werden. Itraconazol bindet VDAC und beeinträchtigt die Leitfähigkeit des Kanals (Head et al. 2015). Die beobachteten Auswirkungen auf die P70S6-Kinase, die durch eine AMPK-Aktivierung aufgrund einer VDAC-vermittelten verringerten mitochondrialen ATP-Freisetzung verursacht sind, konnten in einem ersten Schritt reproduziert werden (Head et al. 2015). In der anschließenden 48-stündigen Behandlung im HD-Zellmodell fand sich eine durch Itraconazol-Behandlung signifikant verringerte Calpain-abhängige Spaltung von  $\alpha$ -Spektrin in mit 128QFL-Huntingtin transfizierten Zellen. Diese scheinbar verringerte Calpain-Aktivität wirkte sich allerdings weder auf die Huntingtin-Fragmentierung noch auf die Huntingtin-Aggregation aus. Aus dem klinischen Bereich ist keine positive Wirkung des 1984 entwickelten Medikaments Itraconazol im Kontext der HD bekannt. Es kann ferner nicht sicher davon ausgegangen werden, dass die VDAC-Inhibition auch bei der längeren Behandlungsdauer effektiv funktioniert hat. Dies könnte auch an einer hohen Serum-Bindung von Itraconazol liegen, die vor allem bei längeren Behandlungen eine Itraconazol-Wirkung erschweren könnte (Arredondo et al. 1994; Arredondo et al. 1999). Eine Korrespondenz mit der Autorin Sarah Head (Department of Pharmacology and Molecular Sciences, Johns Hopkins School of Medicine, USA) brachte darüber hinaus Hinweise auf eine fehlende VDAC-Langzeitinhibition in HEK293 Zellen. Demnach wurde eine VDAC-Langzeitinhibition (>24 Stunden) nur in HUVEC Zellen (Nabelschnurvenen-Endothelzellen; mit 2% Serum im Medium) und nicht in HEK293 Zellen (mit 10% Serum im Medium) beobachtet. Eine Wiederholung der Experimente in einer anderen Zelllinie, die möglicherweise auch eine geringere Serum-Konzentration

im Medium verträgt, könnte also durchaus vielversprechend sein. Ein anderer Ansatz wäre die Testung eines anderen pharmakologischen VDAC-Inhibitors wie DIDS oder G3139 (vgl. *Tabelle 1*). DIDS zeigte in früheren Studien bereits eine zytoprotektive Eigenschaft und verminderte die mitochondriale Superoxid-freisetzung (Shoshan-Barmatz und Ben-Hail 2012). G3139 ist ein Bcl-2 Antisense-Oligonukleotid, das die Leitfähigkeit von VDAC unterbindet und die Caspase-abhängige Apoptose induziert (Lai et al. 2006).

Die durchgeführten Messungen an **MEF-VDAC1-Knockout-Zellen** zeigen eine vermehrte Calpain-abhängige Prozessierung von  $\alpha$ -Spektrin. Allerdings kam es zu keinen Veränderungen in der Calpain-1-Auto-Prozessierung. Möglicherweise ist die vermehrte  $\alpha$ -Spektrin-Prozessierung jedoch auch auf andere Proteasen zurückzuführen. Das Auftreten eines möglichen 120 kDa-Fragmentes, das durch Caspase-3-abhängige  $\alpha$ -Spektrin-Prozessierung entsteht und bei apoptotischen Zellen gehäuft auftritt (Harris et al. 1988; S. J. Martin et al. 1995), wurde allerdings nicht verstärkt beobachtet. Stattdessen kam es zu verstärkter, diffuser  $\alpha$ -Spektrin-Prozessierung. In jedem Fall steht die Vergleichbarkeit der MEF-Wildtyp-Zellen und MEF-VDAC1-Knockout-Zellen in Frage (Vergleich: *Abbildung 38*). Die verminderte Proliferation und morphologische Unterschiede lassen möglicherweise auf ablaufende Apoptose-Prozesse in den MEF-VDAC1-Knockout-Zellen schließen. Eine Mykoplasmen-Infektion wurde in den Routine-Überprüfungen des Labors ausgeschlossen. Auf Nachfrage konnte Sarah Head (Department of Pharmacology and Molecular Sciences, Johns Hopkins School of Medicine, USA), von der die Zellen zur Verfügung gestellt wurden, von einem ähnlichen Proliferationsverhalten der Zellen in ihren Versuchen berichten.

Insgesamt konnte diese Arbeit erneut zeigen, welche Bedeutung Calpaine für die molekulare Pathogenese der HD haben. Eindeutige Hinweise auf eine modulierende Funktion von VDAC1 in diesem System wurden jedoch nicht gefunden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Beeinflussung der Calpain-vermittelten Proteolyse in den Olesoxim-Tierversuchsreihen (Clemens et al. 2015; Weber et al. 2016) möglicherweise nicht durch eine Veränderung der Calcium-Leitfähigkeit von VDAC verursacht war und damit der Wirkmechanismus von Olesoxim in einem anderen Zusammenhang zu suchen ist. Dass VDAC eine

wichtige Rolle in der HD spielt, wird indes nicht nur durch die veränderten Expressions-Level bei HD-Tiermodellen gezeigt. Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass schon die Expression von mutiertem Huntingtin zu einer veränderten Calcium-Leitfähigkeit von VDAC *in vitro* führt (Karachitos et al. 2016). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Expression von mutiertem Huntingtin die Leitfähigkeit des offenen Zustandes von VDAC verringert (Karachitos et al. 2016). Ferner könnte die Präsenz von mutiertem Huntingtin sogar zu einem Schließen von VDAC führen und so die Selektivität von VDAC gegenüber Kationen verändern (Benz 1994; Colombini et al. 1996; Karachitos et al. 2016). Inwieweit diese Veränderung in der Kationen-Leitfähigkeit eine Änderung der Calcium-Leitfähigkeit und eine Änderung zytoplasmatischer Calcium-Level nach sich zieht, kann nur spekuliert werden. Eine Messung der zytoplasmatischen Calcium-Level und der VDAC-vermittelten Calcium-Ströme bei verstärkter und verminderter Aktivierung von VDAC würde hier Klarheit schaffen und sollte in künftigen Arbeiten angegangen werden.

Es ist nach wie vor möglich, dass die Calcium-Dyshomöostase und Calpain-Überaktivierung, die beide bei HD auftreten, auch mit Veränderungen an VDAC in Zusammenhang stehen. Die anfängliche Vermutung, dass die Ergebnisse durch einen Hungerzustand (engl. starvation) der Zellen beeinflusst werden, wurde durch Wiederholung der Experimente unter täglichem Auswechseln des Mediums ausgeräumt (Ergebnisse nicht dargestellt). Starvation ist als Calpain-Aktivator bekannt, auch wenn noch immer über die Bedeutung der Calpaine im Hungerzustand diskutiert wird (Hou et al. 2008; Salem et al. 2005; Y. Wang et al. 2013). Das Zellmodell HEK293T, das in dieser Arbeit verwendet wurde, ist robust gegenüber geringen Schwankungen in der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration (unveröffentlichte Daten von Lukas Klumpp, Experimentelle Radioonkologie, Universität Tübingen). Dadurch könnten schwache Effekte, die möglicherweise auftraten, nicht durchschlagen und zu einer Calpain-Aktivierung führen. Weiterhin handelt es sich bei HEK293T Zellen um tumorähnliche Zellen, die stark proliferieren und daher einem gewissen Selektionszwang unterliegen. Untersuchungen von Dr. med. Ulrike Mau-Holzmann (Zytogenetische Diagnostik, Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik, Universität Tübingen)

zeigten eine ausgeprägte Hypertriploidie oder gar Tetraploidie sowie weitere Chromosomenaberrationen bei HEK293T Zellen in fortgeschrittener Passage (> 65). Solche chromosomalen Veränderungen sind bereits als Störfaktoren in der *STHdh*-Zelllinie beschrieben (Singer et al. 2017). In jedem Fall ist daher ein erneutes Durchführen der Versuche in einer Calcium-sensitiveren, am besten sogar neuronalen Zelllinie, angezeigt (bspw. PC12/PC6.3/Neuronen aus IPS). Um die Durchführung von Kotransfektionen (bspw. RLUC-/CAST-esiRNA und 15QFL-/128QFL-Huntingtin-DNA) zu vermeiden und eine stabile Expression von mutiertem Huntingtin zu erreichen, sollten die künftig verwendeten Zellen stabil transfiziert sein. Idealerweise sollte auf den Einsatz eines Transfektionsreagenz wie Attractene verzichtet werden, da dieses in bis zu 5% der Fälle zytotoxisch wirkt und die Zell-Viabilität somit beeinträchtigt (Gharaati-Far et al. 2017). Ein CRISPR/Cas9-vermittelter Knockout von VDAC in einer neuronalen, stabil mit mutiertem Huntingtin transfizierten Zelllinie, würde ein geeigneteres Modell darstellen, um die Bedeutung von VDAC im Kontext der HD zu erforschen. Eine Olesoxim-Testung an dieser Zelllinie könnte zudem wegweisend für die Entschlüsselung des exakten Wirkmechanismus dieses Medikaments sein. Um zusätzlich den Selektionsdruck zu verringern und eine realistischere *In-cellulo*-Testung von VDAC-Modulatoren durchzuführen, könnte eine 3D-Zellkultur mit aus IPS oder ESC erzeugten neuronalen Organoiden angelegt werden. Im Bereich der 3D-Zellkulturen gab es in den letzten Jahren durchschlagende Neuerungen. Anfängen von sogenannten „neurospheres“ über „cortical spheroids“ bis hin zu „whole-brain organoids“ verzeichnet dieser Forschungsbereich zahlreiche Entwicklungen, die eine realistischere Medikamenten-Testung ohne notwendige Einbindung von Tiermodellen ermöglichen könnten (Lancaster et al. 2013; Pasca et al. 2015; Reynolds und Weiss 1992).

Die Bedeutung von Calpainen beschränkt sich indes nicht nur auf HD. So spielen Calpaine auch in vielen anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Ferreira 2012), Morbus Parkinson (Samantaray et al. 2008) und Multipler Sklerose (Das et al. 2008) eine wichtige Rolle. Es wird sogar über eine mögliche Verwendung von Calpain- und Caspasen-abhängigen Spaltprodukten

von  $\alpha$ -Spektrin als Biomarker für das Altern und für neurodegenerative Erkrankungen diskutiert (Yan et al. 2012).

Die Calpain-Forschung muss daher in jedem Falle weitergehen und auch der Bedeutung von VDAC im Kontext dieser fatalen Erkrankungen sollten weitere Untersuchungen zu Teil werden. Beeinflussung der mitochondrialen Dysfunktion, an der VDAC einen erheblichen Teil haben könnte, ist ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung der HD, aber auch anderer neurodegenerativer Erkrankungen.

## 5 Zusammenfassung

Der Morbus Huntington (HD) ist eine autosomal dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung. Obwohl die ursächliche Mutation – eine Verlängerung des CAG-Repeats im *HTT-Gen* – seit über 20 Jahren bekannt ist, sind die molekularen Effekte noch immer nicht vollständig verstanden. Weiterhin konnte bisher noch keine kausale Therapie umgesetzt werden.

Ein entscheidendes Merkmal der molekularen Pathogenese der HD ist die proteolytische Spaltung des mutierten Huntingtin-Proteins. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass Calpaine, eine Familie Calcium-aktivierter Proteasen, in diesen proteolytischen Prozess involviert sind. Weitere molekulare Charakteristika der HD sind die Calcium-Dyshomöostase und die mitochondriale Dysfunktion. Der „Voltage Dependent Anion Channel“ (VDAC) in der äußeren Mitochondrienmembran könnte diese molekularpathologischen Merkmale der HD miteinander verbinden und somit ein geeignetes therapeutisches Zielprotein darstellen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, in einem ersten Schritt die vorbeschriebene *In-vivo*-Calpain-Aktivierung in einem HD knock-in-Mausmodell zu reproduzieren. In einem zweiten Schritt wurde ein *In-cellulo*-HD-Modell etabliert, in dem Calpaine durch eine esiRNA-vermittelte Herabregulation des endogenen Calpain-Inhibitors Calpastatin überaktiviert sind. Es wurde die Calpain-Aktivierung, Huntingtin-Fragmentierung und Huntingtin-Aggregation analysiert. Daraufhin wurde VDAC1 in 15QFL-/128QFL-Huntingtin-überexprimierenden HEK293T Zellen genetisch (esiRNA-vermittelte Herabregulation und Plasmid-DNA-vermittelte Überexpression) und pharmakologisch (Itraconazol- und Olesoxim-Behandlung) beeinflusst und die Effekte auf Calpain-1-Aktivierung, Huntingtin-Fragmentierung und Huntingtin-Aggregation überprüft. In MEF-VDAC1-Knockout-Zellen wurde eine Grundlevel-Analyse des Calpain-Systems durchgeführt. Die durchgeführten Protein-Analysen wurden mittels Western Blot durchgeführt. Aggregatanalysen wurden mittels Filter-Retardation-Assay und Immunfluoreszenzmikroskopie erreicht.

Im Striatum von sechs Monate alten HD knock-in-Mäusen wurde eine Aktivierung des Calpain-Systems im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Ferner war in dieser spezifischen Hirnregion auch VDAC1 herabreguliert. Im Cortex dieser Tiere sowie in einer Gesamthirn-Analyse von zwölf Monate alten HD knock-in-Mäusen fand sich eine solche Veränderung nicht, was auf eine Hirnregionen-Spezifität hindeuten könnte. Die *In-cellulo*-Herabregulation von Calpastatin führte zu einer verstärkten Calpain-Aktivierung und einer vermehrten Bildung Polyglutamin-enhaltender, N-terminaler Huntingtin-Fragmente. Es wurde eine starke Zunahme der zytoplasmatischen und eine Erhöhung der nukleären Huntingtin-Aggregation beobachtet. Die diversen Herangehensweisen zur pharmakologischen und genetischen Beeinflussung von VDAC1 zeigten keine durchschlagenden Effekte auf das Calpain-System. Weiterhin kam es zu keinen klaren Einflüssen auf die Huntingtin-Fragmentierung und Huntingtin-Aggregation. Die MEF-VDAC1-Knockout-Zelllinie erwies sich als für die angestrebten Analysen ungeeignet, da sie sich sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrem Proliferationsverhalten stark von MEF-Wildtyp-Zellen unterschied.

In dieser Arbeit konnte erneut bestätigt werden, dass das Calpain-System bei HD überaktiviert ist. Weiterhin wurde beobachtet, dass VDAC1 im Striatum sechs Monate alter HD knock-in-Mäuse vermindert exprimiert wird. Eine Überaktivierung von Calpainen *in cellulo* führte ferner zu einer Verschlechterung des molekularen Phänotyps mit vermehrter Calpain-Aktivierung, Huntingtin-Fragmentierung und Huntingtin-Aggregation. Die Bedeutung von VDAC1 für die Calpain-abhängige Huntingtin-Prozessierung konnte indes mit den vorhandenen Mitteln nicht weiter aufgeklärt werden. Hier sollten in Zukunft Untersuchungen in einer neuronalen HD-Zelllinie durchgeführt werden. Zytoplasmatische Calcium-Konzentrationsmessungen könnten darüber hinaus Aufschluss über die Bedeutung von VDAC1 für die Calcium-Dysregulation bei HD bringen.

Ein besseres Verständnis von VDAC1 und seiner zellulären Funktionen ist bedeutend für das Verständnis der molekularen Pathogenese von HD und könnte zu einem vielversprechenden Ansatz für die Behandlung dieser fatalen Erkrankung werden.

## 6 Referenzen

- Anflous, K., Armstrong, D. D., and Craigen, W. J. (2001), 'Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice', *J Biol Chem*, 276 (3), 1954-60.
- Arning, L., et al. (2005), 'NR2A and NR2B receptor gene variations modify age at onset in Huntington disease', *Neurogenetics*, 6 (1), 25-8.
- Arrasate, M. and Finkbeiner, S. (2012), 'Protein aggregates in Huntington's disease', *Exp Neurol*, 238 (1), 1-11.
- Arrasate, M., et al. (2004), 'Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death', *Nature*, 431 (7010), 805-10.
- Arredondo, G., et al. (1994), 'Protein binding of itraconazole and fluconazole in patients with chronic renal failure', *Int J Clin Pharmacol Ther*, 32 (7), 361-4.
- Arredondo, G., et al. (1999), 'Serum protein binding of itraconazole and fluconazole in patients with diabetes mellitus', *J Antimicrob Chemother*, 43 (2), 305-7.
- Ba, H. V., Reddy, B. V., and Hwang, I. (2015), 'Role of calpastatin in the regulation of mRNA expression of calpain, caspase, and heat shock protein systems in bovine muscle satellite cells', *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 51 (5), 447-54.
- Baines, C. P. (2009), 'The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore', *J Mol Cell Cardiol*, 46 (6), 850-7.
- Baines, C. P., et al. (2007), 'Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death', *Nat Cell Biol*, 9 (5), 550-5.
- Benz, R. (1994), 'Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins', *Biochim Biophys Acta*, 1197 (2), 167-96.
- Bertini, E., et al. (2017), 'Safety and efficacy of olesoxime in patients with type 2 or non-ambulatory type 3 spinal muscular atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial', *Lancet Neurol*, 16 (7), 513-22.
- Bezprozvanny, I. and Hayden, M. R. (2004), 'Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease', *Biochem Biophys Res Commun*, 322 (4), 1310-7.
- Boehning, D., et al. (2005), 'A peptide inhibitor of cytochrome c/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding blocks intrinsic and extrinsic cell death pathways', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (5), 1466-71.
- Bohanna, I., Georgiou-Karistianis, N., and Egan, G. F. (2011), 'Connectivity-based segmentation of the striatum in Huntington's disease: vulnerability of motor pathways', *Neurobiol Dis*, 42 (3), 475-81.

- Referenzen -

- Bordet, T., et al. (2010), 'Olesoxime (TRO19622): A Novel Mitochondrial-Targeted Neuroprotective Compound', *Pharmaceuticals (Basel)*, 3 (2), 345-68.
- Bordet, T., et al. (2007), 'Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis', *J Pharmacol Exp Ther*, 322 (2), 709-20.
- Bradford, M. M. (1976), 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Calabresi, P., et al. (1998), 'Striatal spiny neurons and cholinergic interneurons express differential ionotropic glutamatergic responses and vulnerability: implications for ischemia and Huntington's disease', *Ann Neurol*, 43 (5), 586-97.
- Camins, A., et al. (2006), 'Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes', *CNS Drug Rev*, 12 (2), 135-48.
- Campbell, R. L. and Davies, P. L. (2012), 'Structure-function relationships in calpains', *Biochem J*, 447 (3), 335-51.
- Canals, J. M., et al. (2001), 'Expression of brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons is regulated by striatal target area', *J Neurosci*, 21 (1), 117-24.
- Casha, S., et al. (2012), 'Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury', *Brain*, 135 (Pt 4), 1224-36.
- Cha, J. H. (2007), 'Transcriptional signatures in Huntington's disease', *Prog Neurobiol*, 83 (4), 228-48.
- Chaudhry, I. B., et al. (2012), 'Minocycline benefits negative symptoms in early schizophrenia: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial in patients on standard treatment', *J Psychopharmacol*, 26 (9), 1185-93.
- Chen, H., et al. (2014), 'Inhibition of VDAC1 prevents Ca(2+)-mediated oxidative stress and apoptosis induced by 5-aminolevulinic acid mediated sonodynamic therapy in THP-1 macrophages', *Apoptosis*, 19 (12), 1712-26.
- Cheng, E. H., et al. (2003), 'VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis', *Science*, 301 (5632), 513-7.
- Choo, Y. S., et al. (2004), 'Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release', *Hum Mol Genet*, 13 (14), 1407-20.
- Ciammola, A., et al. (2006), 'Increased apoptosis, Huntingtin inclusions and altered differentiation in muscle cell cultures from Huntington's disease subjects', *Cell Death Differ*, 13 (12), 2068-78.
- Clemens, L. E., et al. (2015), 'Olesoxime suppresses calpain activation and mutant huntingtin fragmentation in the BACHD rat', *Brain*, 138 (Pt 12), 3632-53.

- Referenzen -

- Colombini, M., Blachly-Dyson, E., and Forte, M. (1996), 'VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane', *Ion Channels*, 4, 169-202.
- Cooper, J. K., et al. (1998), 'Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture', *Hum Mol Genet*, 7 (5), 783-90.
- Cornett, J., et al. (2005), 'Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export', *Nat Genet*, 37 (2), 198-204.
- Cowan, C. M., et al. (2008), 'Polyglutamine-modulated striatal calpain activity in YAC transgenic huntington disease mouse model: impact on NMDA receptor function and toxicity', *J Neurosci*, 28 (48), 12725-35.
- Csordas, G., Thomas, A. P., and Hajnoczky, G. (1999), 'Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria', *EMBO J*, 18 (1), 96-108.
- Csordas, G., et al. (2006), 'Structural and functional features and significance of the physical link between ER and mitochondria', *J Cell Biol*, 174 (7), 915-21.
- Cui, L., et al. (2006), 'Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration', *Cell*, 127 (1), 59-69.
- Das, A., et al. (2008), 'Activation of calpain and caspase pathways in demyelination and neurodegeneration in animal model of multiple sclerosis', *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7 (3), 313-20.
- Dau, A., et al. (2014), 'Chronic blockade of extrasynaptic NMDA receptors ameliorates synaptic dysfunction and pro-death signaling in Huntington disease transgenic mice', *Neurobiol Dis*, 62, 533-42.
- Davies, S. W., et al. (1997), 'Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation', *Cell*, 90 (3), 537-48.
- De Stefani, D., et al. (2011), 'VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca<sup>2+</sup> signals to mitochondria', *Cell Death Differ*, 19 (2), 267-73.
- Decuypere, J. P., et al. (2011), 'The IP(3) receptor-mitochondria connection in apoptosis and autophagy', *Biochim Biophys Acta*, 1813 (5), 1003-13.
- del Bosque-Plata, L., et al. (2004), 'Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population', *Mol Genet Metab*, 81 (2), 122-6.
- Diepenbroek, M., et al. (2014), 'Overexpression of the calpain-specific inhibitor calpastatin reduces human alpha-Synuclein processing, aggregation and synaptic impairment in [A30P]alphaSyn transgenic mice', *Hum Mol Genet*, 23 (15), 3975-89.
- Dietrich, P., et al. (2017), 'Elimination of huntingtin in the adult mouse leads to progressive behavioral deficits, bilateral thalamic calcification, and altered brain iron homeostasis', *PLoS Genet*, 13 (7), e1006846.

- Referenzen -

- DiFiglia, M., et al. (1997), 'Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain', *Science*, 277 (5334), 1990-3.
- Dragatsis, I., Levine, M. S., and Zeitlin, S. (2000), 'Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice', *Nat Genet*, 26 (3), 300-6.
- Durr, A., et al. (1999), 'Homozygosity in Huntington's disease', *J Med Genet*, 36 (2), 172-3.
- Duyao, M. P., et al. (1995), 'Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh', *Science*, 269 (5222), 407-10.
- Eckmann, J., et al. (2014), 'Mitochondrial membrane fluidity is consistently increased in different models of Huntington disease: restorative effects of olesoxime', *Mol Neurobiol*, 50 (1), 107-18.
- Espinell-Ingroff, A., Shadomy, S., and Gebhart, R. J. (1984), 'In vitro studies with R 51,211 (itraconazole)', *Antimicrob Agents Chemother*, 26 (1), 5-9.
- Falush, D., et al. (2001), 'Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington disease and substantial underascertainment of late-onset cases', *Am J Hum Genet*, 68 (2), 373-85.
- Ferrante, R. J., et al. (1985), 'Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease', *Science*, 230 (4725), 561-3.
- Ferreira, A. (2012), 'Calpain dysregulation in Alzheimer's disease', *ISRN Biochem*, 2012, 728571.
- Ferrer, I. (2009), 'Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease', *J Bioenerg Biomembr*, 41 (5), 425-31.
- Foroud, T., et al. (1999), 'Differences in duration of Huntington's disease based on age at onset', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66 (1), 52-6.
- Fukada, K., et al. (2004), 'Mitochondrial proteomic analysis of a cell line model of familial amyotrophic lateral sclerosis', *Mol Cell Proteomics*, 3 (12), 1211-23.
- Gafni, J. and Ellerby, L. M. (2002), 'Calpain activation in Huntington's disease', *J Neurosci*, 22 (12), 4842-9.
- Gafni, J., et al. (2004), 'Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus', *J Biol Chem*, 279 (19), 20211-20.
- Garcia-Martinez, E. M., et al. (2010), 'Mitochondria and calcium flux as targets of neuroprotection caused by minocycline in cerebellar granule cells', *Biochem Pharmacol*, 79 (2), 239-50.
- Gatliff, J., et al. (2017), 'A role for TSPO in mitochondrial Ca(2+) homeostasis and redox stress signaling', *Cell Death Dis*, 8 (6), e2896.

- Referenzen -

- Gauthier, L. R., et al. (2004), 'Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules', *Cell*, 118 (1), 127-38.
- Gellerich, F. N., et al. (2008), 'Impaired regulation of brain mitochondria by extramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in transgenic Huntington disease rats', *J Biol Chem*, 283 (45), 30715-24.
- Gelman, A., Rawet-Slobodkin, M., and Elazar, Z. (2015), 'Huntingtin facilitates selective autophagy', *Nat Cell Biol*, 17 (3), 214-5.
- Gervais, F. G., et al. (2002), 'Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1', *Nat Cell Biol*, 4 (2), 95-105.
- Gharaati-Far, N., et al. (2017), 'Efficiency and cytotoxicity analysis of cationic lipids-mediated gene transfection into AGS gastric cancer cells', *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 1-8.
- Gil, J. M. and Rego, A. C. (2008), 'Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease', *Eur J Neurosci*, 27 (11), 2803-20.
- Gincel, D., Zaid, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2001), 'Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function', *Biochem J*, 358 (Pt 1), 147-55.
- Gladding, C. M., et al. (2012), 'Calpain and STriatal-Enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) activation contribute to extrasynaptic NMDA receptor localization in a Huntington's disease mouse model', *Hum Mol Genet*, 21 (17), 3739-52.
- Goad, L. J., et al. (1989), 'The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action in vitro', *Mol Biochem Parasitol*, 32 (2-3), 179-89.
- Goldberg, Y. P., et al. (1995), 'Increased instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population', *Hum Mol Genet*, 4 (10), 1911-8.
- Goldberg, Y. P., et al. (1996), 'Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract', *Nat Genet*, 13 (4), 442-9.
- Graham, R. K., et al. (2006), 'Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin', *Cell*, 125 (6), 1179-91.
- Gusella, J. F., et al. (1983), 'A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease', *Nature*, 306 (5940), 234-8.
- Hackam, A. S., et al. (1998), 'The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity', *J Cell Biol*, 141 (5), 1097-105.
- Hamasaki, M., et al. (2013), 'Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites', *Nature*, 495 (7441), 389-93.

- Referenzen -

- Hanna, R. A., Campbell, R. L., and Davies, P. L. (2008), 'Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin', *Nature*, 456 (7220), 409-12.
- Harjes, P. and Wanker, E. E. (2003), 'The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories', *Trends Biochem Sci*, 28 (8), 425-33.
- Harris, A. S., Croall, D. E., and Morrow, J. S. (1988), 'The calmodulin-binding site in alpha-fodrin is near the calcium-dependent protease-I cleavage site', *J Biol Chem*, 263 (30), 15754-61.
- Hay, D. G., et al. (2004), 'Progressive decrease in chaperone protein levels in a mouse model of Huntington's disease and induction of stress proteins as a therapeutic approach', *Hum Mol Genet*, 13 (13), 1389-405.
- HDCRG (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', *Cell*, 72 (6), 971-83.
- Head, S. A., et al. (2015), 'Antifungal drug itraconazole targets VDAC1 to modulate the AMPK/mTOR signaling axis in endothelial cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (52), E7276-85.
- Hedreen, J. C., et al. (1991), 'Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease', *Neurosci Lett*, 133 (2), 257-61.
- Heemskerk, A. W. and Roos, R. A. (2012), 'Aspiration pneumonia and death in Huntington's disease', *PLoS Curr*, 4, RRN1293.
- Ho, L. W., et al. (2001), 'The molecular biology of Huntington's disease', *Psychol Med*, 31 (1), 3-14.
- Holley, S. M., et al. (2015), 'Enhanced GABAergic Inputs Contribute to Functional Alterations of Cholinergic Interneurons in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease', *eNeuro*, 2 (1).
- Hou, Y. C., et al. (2008), 'Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during *Drosophila melanogaster* oogenesis', *J Cell Biol*, 182 (6), 1127-39.
- Hu, Q., et al. (2017), 'Itraconazole induces apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting Hedgehog signaling in gastric cancer cells', *J Exp Clin Cancer Res*, 36 (1), 50.
- Hubener, J., et al. (2013), 'Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3)', *Hum Mol Genet*, 22 (3), 508-18.
- Huntington, G. (2003), 'On chorea. George Huntington, M.D', *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 15 (1), 109-12.
- Israelson, A., et al. (2010), 'Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS', *Neuron*, 67 (4), 575-87.

- Referenzen -

- Jana, N. R., et al. (2001), 'Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release', *Hum Mol Genet*, 10 (10), 1049-59.
- Jayaraman, M., et al. (2012), 'Kinetically competing huntingtin aggregation pathways control amyloid polymorphism and properties', *Biochemistry*, 51 (13), 2706-16.
- Jiang, W., et al. (2007), 'Preliminary explorations of the role of mitochondrial proteins in refractory epilepsy: some findings from comparative proteomics', *J Neurosci Res*, 85 (14), 3160-70.
- Joel, D. (2001), 'Open interconnected model of basal ganglia-thalamocortical circuitry and its relevance to the clinical syndrome of Huntington's disease', *Mov Disord*, 16 (3), 407-23.
- Jouaville, L. S., et al. (1999), 'Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (24), 13807-12.
- Juenemann, K., Wiemhoefer, A., and Reits, E. A. (2015), 'Detection of ubiquitinated huntingtin species in intracellular aggregates', *Front Mol Neurosci*, 8, 1.
- Kaltenbach, L. S., et al. (2007), 'Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration', *PLoS Genet*, 3 (5), e82.
- Karachitos, A., Grobys, D., and Kmita, H. (2015), 'VDAC as a Potential Target in Huntingtons Disease Therapy: The State of the Art', *Pharmaceutical Regulatory Affairs: Open Access*, 4:157.
- Karachitos, A., et al. (2016), 'The Association of VDAC with Cell Viability of PC12 Model of Huntington's Disease', *Front Oncol*, 6, 238.
- Kegel, K. B., et al. (2010), 'Huntingtin cleavage product A forms in neurons and is reduced by gamma-secretase inhibitors', *Mol Neurodegener*, 5, 58.
- Khorchid, A. and Ikura, M. (2002), 'How calpain is activated by calcium', *Nat Struct Biol*, 9 (4), 239-41.
- Kim, T. and Pae, A. N. (2016), 'Translocator protein (TSPO) ligands for the diagnosis or treatment of neurodegenerative diseases: a patent review (2010 - 2015; part 2)', *Expert Opin Ther Pat*, 26 (11), 1353-66.
- Kim, Y. J., et al. (2006), 'Lysosomal proteases are involved in generation of N-terminal huntingtin fragments', *Neurobiol Dis*, 22 (2), 346-56.
- Kirkwood, S. C., et al. (2001), 'Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease', *Arch Neurol*, 58 (2), 273-8.
- Kremer, B., et al. (1994), 'A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats', *N Engl J Med*, 330 (20), 1401-6.

- Referenzen -

- Krols, M., et al. (2016), 'Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration', *Acta Neuropathol*, 131 (4), 505-23.
- Kuemmerle, S., et al. (1999), 'Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease', *Ann Neurol*, 46 (6), 842-9.
- Laemmli, U. K. (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227 (5259), 680-5.
- Laforet, G. A., et al. (2001), 'Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease', *J Neurosci*, 21 (23), 9112-23.
- Lai, J. C., et al. (2006), 'A pharmacologic target of G3139 in melanoma cells may be the mitochondrial VDAC', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (19), 7494-9.
- Lancaster, M. A., et al. (2013), 'Cerebral organoids model human brain development and microcephaly', *Nature*, 501 (7467), 373-9.
- Landles, C., et al. (2010), 'Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease', *J Biol Chem*, 285 (12), 8808-23.
- Langbehn, D. R., et al. (2010), 'CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): a review and validation study of statistical approaches', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B (2), 397-408.
- Leavitt, B. R., et al. (2001), 'Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo', *Am J Hum Genet*, 68 (2), 313-24.
- Leblhuber, F., et al. (1995), 'Serum dehydroepiandrosterone and cortisol measurements in Huntington's chorea', *J Neurol Sci*, 132 (1), 76-9.
- Lee, H., et al. (2012), 'IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux', *Hum Mol Genet*, 21 (1), 101-14.
- Leggio, L., et al. (2018), 'Mechanism of translation control of the alternative *Drosophila melanogaster* Voltage Dependent Anion-selective Channel 1 mRNAs', *Sci Rep*, 8 (1), 5347.
- Lenglet, T., et al. (2014), 'A phase II-III trial of olesoxime in subjects with amyotrophic lateral sclerosis', *Eur J Neurol*, 21 (3), 529-36.
- Levine, M. S., et al. (1999), 'Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease', *J Neurosci Res*, 58 (4), 515-32.
- Li, H., et al. (2000), 'Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity', *Nat Genet*, 25 (4), 385-9.
- Li, S. H. and Li, X. J. (1998), 'Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats', *Hum Mol Genet*, 7 (5), 777-82.

- Referenzen -

- Li, S. H., et al. (2002), 'Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1', *Mol Cell Biol*, 22 (5), 1277-87.
- Li, Y., et al. (2013), 'TRO19622 promotes myelin repair in a rat model of demyelination', *Int J Neurosci*, 123 (11), 810-22.
- Liang, H. and Ward, W. F. (2006), 'PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism', *Adv Physiol Educ*, 30 (4), 145-51.
- Lipe, H. and Bird, T. (2009), 'Late onset Huntington Disease: clinical and genetic characteristics of 34 cases', *J Neurol Sci*, 276 (1-2), 159-62.
- Liu, G. J., et al. (2014), 'The 18 kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation', *Brain Pathol*, 24 (6), 631-53.
- Lou, S., et al. (2016), 'Oxygen consumption deficit in Huntington disease mouse brain under metabolic stress', *Hum Mol Genet*, 25 (13), 2813-26.
- Madesh, M. and Hajnoczky, G. (2001), 'VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release', *J Cell Biol*, 155 (6), 1003-15.
- Magalon, K., et al. (2016), 'Olesoxime favors oligodendrocyte differentiation through a functional interplay between mitochondria and microtubules', *Neuropharmacology*, 111, 293-303.
- Magalon, K., et al. (2012), 'Olesoxime accelerates myelination and promotes repair in models of demyelination', *Ann Neurol*, 71 (2), 213-26.
- Manczak, M., et al. (2013), 'Reduced VDAC1 protects against Alzheimer's disease, mitochondria, and synaptic deficiencies', *J Alzheimers Dis*, 37 (4), 679-90.
- Martin-Aparicio, E., et al. (2001), 'Proteasomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease', *J Neurosci*, 21 (22), 8772-81.
- Martin, L. J. (2010), 'Olesoxime, a cholesterol-like neuroprotectant for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis', *IDrugs*, 13 (8), 568-80.
- Martin, S. J., et al. (1995), 'Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis', *J Biol Chem*, 270 (12), 6425-8.
- Martinez-Vicente, M., et al. (2010), 'Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease', *Nat Neurosci*, 13 (5), 567-76.
- Menalled, L. B., et al. (2002), 'Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington's disease knock-in mice', *J Neurosci*, 22 (18), 8266-76.
- Mendes, C. C., et al. (2005), 'The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca<sup>2+</sup> signals into mitochondria', *J Biol Chem*, 280 (49), 40892-900.

- Referenzen -

- Menzies, F. M., et al. (2015), 'Calpain inhibition mediates autophagy-dependent protection against polyglutamine toxicity', *Cell Death Differ*, 22 (3), 433-44.
- Messina, A., et al. (2012), 'VDAC isoforms in mammals', *Biochim Biophys Acta*, 1818 (6), 1466-76.
- Metzler, M., et al. (2007), 'NMDA receptor function and NMDA receptor-dependent phosphorylation of huntingtin is altered by the endocytic protein HIP1', *J Neurosci*, 27 (9), 2298-308.
- Milakovic, T. and Johnson, G. V. (2005), 'Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin', *J Biol Chem*, 280 (35), 30773-82.
- Miller, B. R. and Bezprozvanny, I. (2010), 'Corticostriatal circuit dysfunction in Huntington's disease: intersection of glutamate, dopamine and calcium', *Future Neurol*, 5 (5), 735-56.
- Miller, J. P., et al. (2010), 'Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease', *Neuron*, 67 (2), 199-212.
- Mochel, F., et al. (2007), 'Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression', *PLoS One*, 2 (7), e647.
- Moldoveanu, T., Gehring, K., and Green, D. R. (2008), 'Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains', *Nature*, 456 (7220), 404-8.
- Montoya, A., et al. (2006), 'Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease', *J Psychiatry Neurosci*, 31 (1), 21-9.
- Motulsky, H. J. and Brown, R. E. (2006), 'Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate', *BMC Bioinformatics*, 7, 123.
- Murachi, T. (1989), 'Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin', *Biochem Int*, 18 (2), 263-94.
- Myers, R. H., et al. (1993), 'De novo expansion of a (CAG)<sub>n</sub> repeat in sporadic Huntington's disease', *Nat Genet*, 5 (2), 168-73.
- Nagai, Y., et al. (2007), 'A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein', *Nat Struct Mol Biol*, 14 (4), 332-40.
- Nagata, E., et al. (2004), 'Autophagosome-like vacuole formation in Huntington's disease lymphoblasts', *Neuroreport*, 15 (8), 1325-8.
- Nakajima, T., Shearer, T. R., and Azuma, M. (2014), 'Loss of calpastatin leads to activation of calpain in human lens epithelial cells', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55 (8), 5278-83.

- Referenzen -

- Naranmandura, H., et al. (2012), 'Release of apoptotic cytochrome C from mitochondria by dimethylarsinous acid occurs through interaction with voltage-dependent anion channel in vitro', *Toxicol Sci*, 128 (1), 137-46.
- Negrette, A. (1963), 'Corea de Huntington. 2nd ed. Maracaibo: Talleres Graficos de la Universidad del Zulia'.
- Neklesa, T. K., et al. (2011), 'Small-molecule hydrophobic tagging-induced degradation of HaloTag fusion proteins', *Nat Chem Biol*, 7 (8), 538-43.
- Neueder, A., et al. (2017), 'The pathogenic exon 1 HTT protein is produced by incomplete splicing in Huntington's disease patients', *Sci Rep*, 7 (1), 1307.
- Ochaba, J., et al. (2014), 'Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (47), 16889-94.
- Ono, Y. and Sorimachi, H. (2012), 'Calpains: an elaborate proteolytic system', *Biochim Biophys Acta*, 1824 (1), 224-36.
- Orr, A. L., et al. (2008), 'N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking', *J Neurosci*, 28 (11), 2783-92.
- Orr, H. T. and Zoghbi, H. Y. (2007), 'Trinucleotide repeat disorders', *Annu Rev Neurosci*, 30, 575-621.
- Palmieri, B., et al. (2011), 'A preliminary study of the local treatment of preneoplastic and malignant skin lesions using methyl jasmonate', *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 15 (3), 333-6.
- Panov, A. V., et al. (2002), 'Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines', *Nat Neurosci*, 5 (8), 731-6.
- Pasca, A. M., et al. (2015), 'Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture', *Nat Methods*, 12 (7), 671-8.
- Penney, J. B., Jr., et al. (1990), 'Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals', *Mov Disord*, 5 (2), 93-9.
- Perutz, M. F., et al. (1994), 'Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (12), 5355-8.
- Pringsheim, T., et al. (2012), 'The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis', *Mov Disord*, 27 (9), 1083-91.
- Punnett, R. C. (1908), 'Mendelism in Relation to Disease', *Proc R Soc Med*, 1 (Sect Epidemiol State Med), 135-68.
- Ramirez, C. M., et al. (2009), 'VDAC and ERalpha interaction in caveolae from human cortex is altered in Alzheimer's disease', *Mol Cell Neurosci*, 42 (3), 172-83.
- Rao, M. V., et al. (2016), 'Calpastatin inhibits motor neuron death and increases survival of hSOD1(G93A) mice', *J Neurochem*, 137 (2), 253-65.

- Referenzen -

- Rao, M. V., et al. (2008), 'Marked calpastatin (CAST) depletion in Alzheimer's disease accelerates cytoskeleton disruption and neurodegeneration: neuroprotection by CAST overexpression', *J Neurosci*, 28 (47), 12241-54.
- Rapizzi, E., et al. (2002), 'Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca<sup>2+</sup> microdomains to mitochondria', *J Cell Biol*, 159 (4), 613-24.
- Rasola, A. and Bernardi, P. (2007), 'The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis', *Apoptosis*, 12 (5), 815-33.
- Ratovitski, T., et al. (2009), 'Mutant huntingtin N-terminal fragments of specific size mediate aggregation and toxicity in neuronal cells', *J Biol Chem*, 284 (16), 10855-67.
- Ravikumar, B., et al. (2004), 'Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease', *Nat Genet*, 36 (6), 585-95.
- Reddy, P. H., et al. (1998), 'Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA', *Nat Genet*, 20 (2), 198-202.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S. (1992), 'Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system', *Science*, 255 (5052), 1707-10.
- Rigamonti, D., et al. (2000), 'Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3', *J Neurosci*, 20 (10), 3705-13.
- Rosas, H. D., et al. (2008), 'Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity', *Brain*, 131 (Pt 4), 1057-68.
- Rovini, A., et al. (2010), 'Olesoxime prevents microtubule-targeting drug neurotoxicity: selective preservation of EB comets in differentiated neuronal cells', *Biochem Pharmacol*, 80 (6), 884-94.
- Rubinsztein, D. C., et al. (1996), 'Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats', *Am J Hum Genet*, 59 (1), 16-22.
- Rui, Y. N., et al. (2015), 'Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy', *Nat Cell Biol*, 17 (3), 262-75.
- Russo, R., et al. (2011), 'Calpain-mediated cleavage of Beclin-1 and autophagy deregulation following retinal ischemic injury in vivo', *Cell Death Dis*, 2, e144.
- Sadri-Vakili, G., et al. (2006), 'Huntingtin inclusions do not down-regulate specific genes in the R6/2 Huntington's disease mouse', *Eur J Neurosci*, 23 (12), 3171-5.

- Referenzen -

- Salem, M., et al. (2005), 'Identification and molecular characterization of the rainbow trout calpains (Capn1 and Capn2): their expression in muscle wasting during starvation', *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 140 (1), 63-71.
- Salmon, D. P., et al. (1989), 'Differentiation of Alzheimer's disease and Huntington's disease with the Dementia Rating Scale', *Arch Neurol*, 46 (11), 1204-8.
- Samantaray, S., Ray, S. K., and Banik, N. L. (2008), 'Calpain as a potential therapeutic target in Parkinson's disease', *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7 (3), 305-12.
- Sampson, M. J., et al. (2001), 'Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3', *J Biol Chem*, 276 (42), 39206-12.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005), 'Growing roles for the mTOR pathway', *Curr Opin Cell Biol*, 17 (6), 596-603.
- Sawa, A., et al. (1999), 'Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization', *Nat Med*, 5 (10), 1194-8.
- Schaffar, G., et al. (2004), 'Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation', *Mol Cell*, 15 (1), 95-105.
- Scherzinger, E., et al. (1997), 'Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo', *Cell*, 90 (3), 549-58.
- Schilling, B., et al. (2006), 'Huntingtin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. Modulation of cleavage and toxicity', *J Biol Chem*, 281 (33), 23686-97.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012), 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis', *Nat Methods*, 9 (7), 671-5.
- Schoenfeld, M., et al. (1984), 'Increased rate of suicide among patients with Huntington's disease', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 47 (12), 1283-7.
- Schulte, J. and Littleton, J. T. (2011), 'The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology', *Curr Trends Neurol*, 5, 65-78.
- Seong, I. S., et al. (2005), 'HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism', *Hum Mol Genet*, 14 (19), 2871-80.
- Shoshan-Barmatz, V. and Ben-Hail, D. (2012), 'VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target', *Mitochondrion*, 12 (1), 24-34.
- Shoshan-Barmatz, V., et al. (2010), 'VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death', *Mol Aspects Med*, 31 (3), 227-85.
- Simamura, E., et al. (2008), 'Bioreductive activation of quinone antitumor drugs by mitochondrial voltage-dependent anion channel 1', *Anat Sci Int*, 83 (4), 261-6.

- Referenzen -

- Simmons, J. P., Nelson, L. D., and Simonsohn, U. (2011), 'False-positive psychology: undisclosed flexibility in data collection and analysis allows presenting anything as significant', *Psychol Sci*, 22 (11), 1359-66.
- Simoës, A. T., et al. (2012), 'Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease', *Brain*, 135 (Pt 8), 2428-39.
- Simpson, P. B., et al. (1998), 'Specialized distributions of mitochondria and endoplasmic reticulum proteins define Ca<sup>2+</sup> wave amplification sites in cultured astrocytes', *J Neurosci Res*, 52 (6), 672-83.
- Singer, E., et al. (2017), 'Reduced cell size, chromosomal aberration and altered proliferation rates are characteristics and confounding factors in the STHdh cell model of Huntington disease', *Sci Rep*, 7 (1), 16880.
- Slow, E. J., et al. (2005), 'Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (32), 11402-7.
- Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2011), 'Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization', *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 87 (6), 287-327.
- Squitieri, F., Cannella, M., and Simonelli, M. (2002), 'CAG mutation effect on rate of progression in Huntington's disease', *Neurol Sci*, 23 Suppl 2, S107-8.
- Squitieri, F., et al. (2000), 'Family and molecular data for a fine analysis of age at onset in Huntington disease', *Am J Med Genet*, 95 (4), 366-73.
- Squitieri, F., et al. (2003), 'Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course', *Brain*, 126 (Pt 4), 946-55.
- Srivastava, T., Lal, V., and Prabhakar, S. (1999), 'Juvenile Huntington's disease', *Neurol India*, 47 (4), 340-1.
- St-Pierre, J., et al. (2006), 'Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators', *Cell*, 127 (2), 397-408.
- Steffan, J. S., et al. (2000), 'The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (12), 6763-8.
- Stutzmann, G. E. and Mattson, M. P. (2011), 'Endoplasmic reticulum Ca(2+) handling in excitable cells in health and disease', *Pharmacol Rev*, 63 (3), 700-27.
- Sun, B., et al. (2002), 'Polyglutamine repeat length-dependent proteolysis of huntingtin', *Neurobiol Dis*, 11 (1), 111-22.
- Sunyach, C., et al. (2012), 'Olesoxime delays muscle denervation, astrogliosis, microglial activation and motoneuron death in an ALS mouse model', *Neuropharmacology*, 62 (7), 2346-52.

- Referenzen -

- Tabrizi, S. J., et al. (2019), 'Targeting Huntingtin Expression in Patients with Huntington's Disease', *N Engl J Med*.
- Tait, S. W. and Green, D. R. (2010), 'Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11 (9), 621-32.
- Tang, T. S., et al. (2003), 'Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1', *Neuron*, 39 (2), 227-39.
- Tang, T. S., et al. (2005), 'Disturbed Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (7), 2602-7.
- Telenius, H., et al. (1995), 'Somatic mosaicism in sperm is associated with intergenerational (CAG)<sub>n</sub> changes in Huntington disease', *Hum Mol Genet*, 4 (2), 189-95.
- Thompson, P. D., et al. (1988), 'The coexistence of bradykinesia and chorea in Huntington's disease and its implications for theories of basal ganglia control of movement', *Brain*, 111 ( Pt 2), 223-44.
- Tikunov, A., et al. (2010), 'Closure of VDAC causes oxidative stress and accelerates the Ca(2+)-induced mitochondrial permeability transition in rat liver mitochondria', *Arch Biochem Biophys*, 495 (2), 174-81.
- Trottier, Y., et al. (1995), 'Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form', *Nat Genet*, 10 (1), 104-10.
- Tzagournissakis, M., et al. (1995), 'Stability of the Huntington disease (CAG)<sub>n</sub> repeat in a late onset form occurring on the Island of Crete', *Hum Mol Genet*, 4 (12), 2239-43.
- Usdin, M. T., et al. (1999), 'Impaired synaptic plasticity in mice carrying the Huntington's disease mutation', *Hum Mol Genet*, 8 (5), 839-46.
- van Dijk, J. G., et al. (1986), 'Juvenile Huntington disease', *Hum Genet*, 73 (3), 235-9.
- van Roon-Mom, W. M. C., Roos, R. A. C., and de Bot, S. T. (2018), 'Dose-Dependent Lowering of Mutant Huntingtin Using Antisense Oligonucleotides in Huntington Disease Patients', *Nucleic Acid Ther*, 28 (2), 59-62.
- Velier, J., et al. (1998), 'Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways', *Exp Neurol*, 152 (1), 34-40.
- Vonsattel, J. P. and DiFiglia, M. (1998), 'Huntington disease', *J Neuropathol Exp Neurol*, 57 (5), 369-84.
- Waelter, S., et al. (2001), 'The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis', *Hum Mol Genet*, 10 (17), 1807-17.
- Walker, F. O. (2007), 'Huntington's Disease', *Semin Neurol*, 27 (2), 143-50.

- Referenzen -

- Wang, C. E., et al. (2008), 'Accumulation of N-terminal mutant huntingtin in mouse and monkey models implicated as a pathogenic mechanism in Huntington's disease', *Hum Mol Genet*, 17 (17), 2738-51.
- Wang, G., et al. (2016), 'Ablation of huntingtin in adult neurons is nondeleterious but its depletion in young mice causes acute pancreatitis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113 (12), 3359-64.
- Wang, Y., et al. (2013), 'Distinct roles for mu-calpain and m-calpain in synaptic NMDAR-mediated neuroprotection and extrasynaptic NMDAR-mediated neurodegeneration', *J Neurosci*, 33 (48), 18880-92.
- Weber, J. J., et al. (2014), 'From pathways to targets: understanding the mechanisms behind polyglutamine disease', *Biomed Res Int*, 2014, 701758.
- Weber, J. J., et al. (2016), 'The calpain-suppressing effects of olesoxime in Huntington's disease', *Rare Dis*, 4 (1), e1153778.
- Weber, J. J., et al. (2018), 'Calpastatin ablation aggravates the molecular phenotype in cell and animal models of Huntington disease', *Neuropharmacology*, 133, 94-106.
- Wellington, C. L. and Hayden, M. R. (1997), 'Of molecular interactions, mice and mechanisms: new insights into Huntington's disease', *Curr Opin Neurol*, 10 (4), 291-8.
- Westphal, C. (1883), 'Über eine dem Bilde der cerebros spinalen grauen Degeneration ähnlichen Erkrankung des centralen Nervensystems ohne anatomische Befunde, nebst einigen Bemerkungen über paradoxe Contractionen.', *Arch Psychiatr Nervenkr*, 14, 187-94.
- Weydt, P., et al. (2006), 'Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration', *Cell Metab*, 4 (5), 349-62.
- Wild, E. J. and Tabrizi, S. J. (2014), 'Targets for future clinical trials in Huntington's disease: what's in the pipeline?', *Mov Disord*, 29 (11), 1434-45.
- Williams, A., et al. (2008), 'Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway', *Nat Chem Biol*, 4 (5), 295-305.
- Wong, Y. C. and Holzbaur, E. L. (2014), 'The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation', *J Neurosci*, 34 (4), 1293-305.
- Wu, S., et al. (1999), 'Each mammalian mitochondrial outer membrane porin protein is dispensable: effects on cellular respiration', *Biochim Biophys Acta*, 1452 (1), 68-78.
- Wyant, K. J., Ridder, A. J., and Dayalu, P. (2017), 'Huntington's Disease-Update on Treatments', *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17 (4), 33.

- Referenzen -

- Wytttenbach, A., et al. (2000), 'Effects of heat shock, heat shock protein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (6), 2898-903.
- Yagoda, N., et al. (2007), 'RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels', *Nature*, 447 (7146), 864-8.
- Yamamoto, A., Lucas, J. J., and Hen, R. (2000), 'Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease', *Cell*, 101 (1), 57-66.
- Yamamoto, A., et al. (1998), 'Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells', *Cell Struct Funct*, 23 (1), 33-42.
- Yan, X. X., Jeromin, A., and Jeromin, A. (2012), 'Spectrin Breakdown Products (SBDPs) as Potential Biomarkers for Neurodegenerative Diseases', *Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep*, 1 (2), 85-93.
- Yang, S., et al. (2017), 'CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease', *J Clin Invest*, 127 (7), 2719-24.
- Yoo, B. C., et al. (2001), 'Changes of voltage-dependent anion-selective channel proteins VDAC1 and VDAC2 brain levels in patients with Alzheimer's disease and Down syndrome', *Electrophoresis*, 22 (1), 172-9.
- Yoshii, S. R. and Mizushima, N. (2017), 'Monitoring and Measuring Autophagy', *Int J Mol Sci*, 18 (9).
- Youdim, M. B. (2003), 'Rasagiline: an anti-Parkinson drug with neuroprotective activity', *Expert Rev Neurother*, 3 (6), 737-49.
- Yousefi, S., et al. (2006), 'Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis', *Nat Cell Biol*, 8 (10), 1124-32.
- Yu-Taeger, L., et al. (2012), 'A novel BACHD transgenic rat exhibits characteristic neuropathological features of Huntington disease', *J Neurosci*, 32 (44), 15426-38.
- Yuan, S., et al. (2008), 'Voltage-dependent anion channel 1 is involved in endostatin-induced endothelial cell apoptosis', *FASEB J*, 22 (8), 2809-20.
- Zhang, Y., et al. (2006), 'Huntingtin inhibits caspase-3 activation', *EMBO J*, 25 (24), 5896-906.
- Zuccato, C., Valenza, M., and Cattaneo, E. (2010), 'Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease', *Physiol Rev*, 90 (3), 905-81.
- Zuccato, C., et al. (2001), 'Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease', *Science*, 293 (5529), 493-8.
- Zuhlke, C., et al. (1993), 'Expansion of the (CAG)<sub>n</sub> repeat causing Huntington's disease in 352 patients of German origin', *Hum Mol Genet*, 2 (9), 1467-9.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde am Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik der Universität Tübingen sowie am Zentrum für seltene Erkrankungen der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Olaf Rieß durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Huu Phuc Nguyen und Dr. rer. nat. Jonasz Weber. Die Einarbeitung in die Methoden erfolgte durch Dr. Jonasz Weber. Alle Versuche wurden von mir selbstständig durchgeführt und von Prof. Dr. Nguyen und Dr. Weber betreut. Die statistische Auswertung erfolgte selbstständig unter Anleitung von Dr. Weber. Die Abbildungen in der Einleitung wurden selbstständig unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen erstellt. Die Abbildungen im Ergebnisteil wurden unter Anleitung von Dr. Weber selbstständig erstellt. Gemeinsam mit Dr. Weber wurde das Manuskript „Calpastatin ablation aggravates the molecular phenotype in cell and animal models of Huntington disease“ verfasst und im Journal Neuropharmacology als Co-Autor eingereicht. Die Publikation wurde am 16.01.2018 zur Veröffentlichung angenommen und erschien am 01.05.2018 in der 133 Ausgabe von Neuropharmacology.

Ich versichere, das vorliegende Manuskript selbstständig (nach Anleitung durch Prof. Dr. Nguyen und Dr. Weber) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.



Tübingen, 01.12.2020  
(Simon Johannes Kloock)

## 8 Veröffentlichungen, Kongressbeiträge und Förderungen

Aus den durchgeführten Experimenten ist folgende **Veröffentlichung** hervorgegangen:

Weber, J. J.; Kloock, S. J.; Nagel, M.; Ortiz-Rios, M. M.; Hofmann, J.; Riess, O.; Nguyen, H. P. (2018), 'Calpastatin ablation aggravates the molecular phenotype in cell and animal models of Huntington disease', *Neuropharmacology*, 133, 94-106.

Auf den folgenden **Kongressen** wurde ein aktiver Beitrag erbracht:

Forschungskolloquium der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen  
2017, Tübingen, 13.01.2017

50ter Kongress der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik (ESHG) 2017,  
Kopenhagen, 27.05.-30.05.2017

Die Promotion wurde durch das **IZKF Promotionskolleg** der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen gefördert (IZKF\_2016-2-11).

## 9 Danksagung

Ein erster Dank gilt meinem Vater, der mich bis zum heutigen Tage in allen (auch schwierigen) Lebenslagen unterstützt, mir viele meiner Maßstäbe gesetzt und stets ein offenes Ohr für meine Ideen und Träume gehabt hat.

Danken möchte ich auch meiner Freundin Kati, die mich immer wieder aufgeheitert hat, so dass ich trotz der fordernden Arbeit die Freude daran nie verlieren konnte.

Ein weiterer großer Dank gilt meiner Schwester, meinen Großeltern und meiner Familie, die mich immer wieder zum Weiterarbeiten motiviert haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Lehrer und Betreuer Jonasz Weber. Trotz allen Forderungen die während meiner Zeit im Labor an dich gestellt waren hattest du stets ein offenes Ohr für meine Anliegen und eine geduldige Hand bei der Einarbeitung in neue Methoden. Ich danke dir für die wissenschaftlichen Grundlagen, die du mir als Betreuer vermittelt hast und für die vielen Gespräche, die wir als Freunde hier und „am anderen Ende der Welt“ geführt haben.

Dank gilt auch allen Kollegen aus dem Labor des Instituts für medizinische Genetik und angewandte Genomik, die mir im Rahmen zahlloser Gespräche gute Ratschläge gegeben haben und stets zu einem offenen Austausch bereit waren.

Abschließend möchte ich meinen habilitierten Betreuern Prof. Dr. (Hoa) Huu Phuc Nguyen und Prof. Dr. Olaf Rieß einen großen Dank aussprechen für die Möglichkeit am Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik zu promovieren. Vielen Dank Hoa für deine Unterstützung bei der Umsetzung aller Ideen, die mir während meiner Promotion gekommen sind und für die Durchsicht meiner Dissertationsschrift. Vielen Dank Olaf für die Einblicke in die Arbeit als Arzt in der Humangenetik.

DIE KUNST IST LANG, DAS LEBEN KURZ, DER GÜNSTIGE AUGENBLICK FLÜCHTIG, DAS EXPERIMENT TRÜGERISCH UND DAS URTEILEN SCHWIERIG. (Corpus Hippocraticum)