

Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Frühe Proteomveränderungen im Gehirn bei einem
transgenen Rattenmodell für die Huntington-Erkrankung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Andreew

aus Güstrow

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. A. Kaindl
2. Priv.-Doz. Dr. med. M. von der Hagen
3. Prof. Dr. med. J. Priller

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Vorbemerkung.....	6
1.2	Geschichtlicher Abriss der HD-Forschung	6
1.3	Klinische Symptomatik von HD.....	7
1.4	Pathogenese von HD.....	9
1.4.1	Physiologische Funktion von Htt	9
1.4.2	Intrazelluläre Aggregate und Toxizität.....	10
1.4.3	Htt und Transkription	12
1.4.4	Htt und Apoptose	13
1.4.5	Andere Erklärungsansätze für die Pathogenese von HD	13
1.5	Frühe pathologische Veränderungen bei HD	14
1.6	Tiermodelle für HD	16
1.6.1	Transgene Mausmodelle für HD	17
1.6.2	Das transgene CAG-51-Rattenmodell für HD	17
1.7	Zielsetzung der Dissertation	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Tiere und Gewebe	20
2.2	Präparation von Gehirnregionen.....	20
2.3	Herstellung der Proteinproben	20
2.3.1	Gesamtextrakt aller zellulären Proteine – Einführung.....	20
2.3.2	Herstellung des Proteingemischtexttrakts.....	21
2.4	Großgel-2D-Elektrophorese	24
2.4.1	Erste Dimension: die Isoelektrische Fokussierung (IEF)	24
2.4.1.1	Herstellung der 1D-Gele.....	25
2.4.1.2	Auftrag der Proben und IEF-Lauf.....	27
2.4.2	Zweite Dimension: Großgel-SDS-PAGE.....	28
2.4.2.1	Durchführung der SDS-PAGE	29
2.5	Anfärbung der Proteine.....	32
2.5.1	Durchführung der Silberfärbung zur Spottedetektion	32
2.5.2	Durchführung der Silberfärbung zur Spottedifizierung mittels Massenspektrometrie.....	33
2.6	Proteinisofomien auf dem 2D-Gel	34
2.7	Softwaregestützte Spotteduierung mittels DELTA2D.....	35
2.8	Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie	35
2.8.1	Prinzip der MALDI-TOF-Massenspektrometrie	36
2.8.2	Durchführung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie	36
2.8.3	Prinzip der ESI-Massenspektrometrie	37
2.8.4	Durchführung der ESI-Massenspektrometrie	38
2.9	Analyse der beteiligten Pathways	39

3	ERGEBNISSE	40
3.1	Quantitative Auswertung der Ergebnisse	40
3.1.1	Frühes, präsymptomatisches Stadium zeigt bereits viele Veränderungen auf Proteinisoebene... 41	
3.1.2	Frühe Veränderungen im Striatum bestätigen sich auch auf Ebene veränderter Gesamtproteinkonzentration	45
3.1.3	Ausgeprägtere Änderung der Proteinkonzentration pro veränderter Isoform im Striatum als im Cerebellum	48
3.1.4	Unterschiedliche Dynamik der Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform bei Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf.....	50
3.1.5	Peak bei Proteinveränderungen nicht abhängig vom Schweregrad der Erkrankung	53
3.2	Massenspektrometrische Untersuchung der frühen Altersstufe	55
3.2.1	Quantitative Aspekte der Proteinisoeformidentifizierung.....	56
3.2.2	Bestimmung der durch HD betroffenen Stoffwechselwege	59
3.2.2.1	Signifikant veränderte Pathways nur im Striatum	59
3.2.2.2	Frühe Störung zentraler Stoffwechselwege im Striatum	59
3.2.2.3	Mehrzahl der veränderten Pathways zeigt verminderte Proteinexpression	61
3.2.2.4	Alle am Energiestoffwechsel der Zelle beteiligten Pathways zeigen eine verminderte Proteinexpression	62
3.2.3	Veränderungen bei HD auf Einzelproteinebene zeigen, dass zentrale Systeme der Zelle betroffen sind	63
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	66
4	DISKUSSION	68
4.1	Früheste Proteomstudie zu HD im Tiermodell	69
4.2	Die Einführung einer minimalen Expressionsänderung bestätigt die gefundenen Ergebnisse und erhöht die Stringenz	70
4.3	Veränderungen im Energiestoffwechsel sowie anderen zentralen Bereichen der Zelle gehen dem HD- Krankheitsphänotyp weit voraus	70
4.3.1	KEGG-Pathways	70
4.3.1.1	Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels	71
4.3.1.2	Zentrales Protein Cdk5	72
4.3.2	Veränderungen auf Einzelproteinebene	72
4.3.2.1	Proteine des Zytoskeletts.....	72
4.3.2.2	Ubiquitin-Proteasom-System.....	72
4.3.2.3	Mitochondrialer Stoffwechsel	73
4.3.2.4	Transkription	73
4.3.2.5	Vesikeltransport.....	73
4.3.2.6	Oxidativer Stress	73
4.3.2.7	Heat-Shock-Antwort.....	74
4.4	Vom Schweregrad der Erkrankung unabhängiger Peak der Veränderungen bei 70 Tagen	74
4.5	Starker Expressionsoverlap bei HD mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen	75
4.6	Obwohl das Cerebellum schon früh im Verlauf stark betroffen ist, zeigen sich Unterschiede in der Pathologie	77
4.7	Transgenes Rattenmodell eignet sich gut für die Untersuchung früher Krankheitsstadien in unterschiedlichen Gehirnregionen	78
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
A.	LITERATURVERZEICHNIS	82

B. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	94
C. TABELLENVERZEICHNIS	95
D. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	97
E. DANKSAGUNG	99
F. LEBENSLAUF	100
G. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	101

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkung

Die Huntington-Erkrankung (HD) ist eine erbliche neurodegenerative Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) [1]. Eine Untergruppe dieser Erkrankungen sind die Polyglutaminerkrankungen, von denen bisher mindestens neun unterschiedliche bekannt sind, z. B. die Spinobulbäre Muskuläre Ataxie und die Spinocerebellären Ataxien [2]. Alle Polyglutaminerkrankungen sind auf die Verlängerung einer Polyglutaminsequenz in einem krankmachenden Protein zurückzuführen. In die Gruppe dieser Erkrankungen fällt auch HD. Hier trifft die Verlängerung der Polyglutaminsequenz das Protein Huntingtin (Htt) [3].

1.2 Geschichtlicher Abriss der HD-Forschung

Am 13. April 1872 veröffentlichte der New Yorker Arzt George Huntington im „Medical and Surgical Reporter“ einen Artikel, in dem er anhand mehrerer Familien eines Patientenkollektivs auf Long Island eine Erkrankung beschrieb, als deren Hauptcharakteristika er neben choreatischen Bewegungsstörungen (i) ihren erblichen Charakter, (ii) die Tendenz zu „Irrsinn“ und Suizid und (iii) ihr Auftreten im Erwachsenenalter darstellte. Somit beschrieb er in seiner einzigen und zugleich bahnbrechenden Veröffentlichung die später nach ihm benannte Erkrankung erstmals als eigenständige klinische Entität und grenzte sie von anderen Formen choreatischer Bewegungsstörungen ab. Als Chorea bezeichnet man überwiegend im Wachzustand ausgeführte, unwillkürliche, plötzliche, rasche, unregelmäßige Bewegungen der Extremitäten, des Gesichtes, des Halses und des Rumpfes, die sowohl in Ruhe als auch bei willkürlichen Bewegungen auftreten [4]. Zwar hatte es auch vor 1872 einige Veröffentlichungen zu der Erkrankung gegeben (Waters 1842, Gorman 1848, Lund 1860, Lyon 1863, Einzelheiten siehe [5]), doch war keine davon so stringent und präzise wie der von Huntington publizierte Artikel. Als Hausarzt war Huntington in die Fußstapfen seines Vaters und Großvaters getreten, hatte deren Praxis und Patienten übernommen, so dass über drei Generationen der Familie ein zusammenhängender klinischer Beobachtungszeitraum von 78 Jahren entstand, was dem damals erst 22-jährigen sogar erlaubte, Rückschlüsse auf die Vererbung der Erkrankung zu ziehen.

Es dauerte allerdings weitere 36 Jahre, bis Punnett 1908 die Erkrankung dem autosomal-dominanten Erbgang nach Mendel zuordnete. Zwar hatte Mendel sein Werk über die

Vererbungslehre bereits 1865 publiziert, doch war es in der Zwischenzeit wieder in Vergessenheit geraten.

Die HD-Forschung nahm in den folgenden Jahrzehnten sowohl in den USA als auch in Europa kontinuierlich zu, wobei sich das Hauptaugenmerk durch die stetige Weiterentwicklung der Naturwissenschaften von eher neuropathologischen Betrachtungen immer mehr zu molekularbiologischen, pharmakologischen und biochemischen Aspekten verschob. Im Jahr 1963 wurde erstmals bekannt, dass es in den Dörfern der Zulia-Region rund um den Maracaibo-See in Venezuela die weltweit größte Anzahl von Erkrankungsfällen gibt, die auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen sind. Der Stammbaum umfasst mehr als 10.000 Individuen mit über 100 lebenden Erkrankten. Unterstützt durch die Hereditary Disease Foundation begann 1981 das so genannte Venezuela-Projekt, bei dem durch jährliche Besuche eines internationalen Forscherteams detaillierte Stammbäume dieser Population aufgezeichnet und klinische Langzeitbeobachtungen mit besonderem Fokus auf mögliche homozygote Formen der Erkrankung aufgestellt wurden. Zusätzlich wurden Blutproben archiviert, aus denen die Isolation von DNA und Zellkulturen vorgenommen werden konnte. Basierend auf diesem Material gelang der neu gegründeten „Huntington’s Disease Collaborative Research Group“ (HDCRG) dann 1993 der Durchbruch, indem das krank machende Gen *IT15* auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 identifiziert wurde [5].

Trotz großer Fortschritte bei der Erforschung der Erkrankung in den Jahren nach dieser bahnbrechenden Entdeckung bleibt der genaue Pathomechanismus aber nach wie vor unklar. Außerdem gibt es noch immer keine wirksame Therapie.

1.3 Klinische Symptomatik von HD

Die HD ist eine erbliche neurodegenerative Erkrankung des Zentralnervensystems [1]. Die Erkrankung hat eine Inzidenz von 3 bis 4 zu 100.000 und bricht im Mittel zwischen dem 35. und dem 50. Lebensjahr aus [6]. Der jüngste jemals untersuchte Patient war zum Zeitpunkt des Auftretens der Erkrankung 2 Jahre alt, der älteste Mitte 80 [3]. Zahlreiche Studien haben deutlich gemacht, dass die Krankheit umso früher beginnt, je größer die Anzahl der Polyglutaminwiederholungen ist [7-9].

Klinisch ist HD charakterisiert durch eine zunehmende extrapyramidale Symptomatik wie choreatische Bewegungsstörungen bis hin zum Ballismus, Rigor, muskuläre Dystonie mit Dysphagie und Dysarthrie, in späteren Stadien kommt es dann zu Hypo- und Bradykinesie [4]. Zusätzlich treten Persönlichkeitsveränderungen und subkortikal betonte Demenz sowie eine Vielzahl anderer neuropsychiatrischer Störungen auf [10]. Das Auftreten

extrapyramidal-motorischer Störungen zeigt ein bereits fortgeschrittenes Krankheitsstadium an, das auf ein im Schnitt drei Jahre vorher einsetzendes Stadium folgt, welches durch kleinere motorische Auffälligkeiten wie generelle Unruhe, gestörte Okulomotorik, Auftreten pathologischer Nystagmen, Hyperreflexie, schnelle rhythmische Bewegungen von Fingern oder Zehen bei emotionalem Stress und leichte Dysarthrie gekennzeichnet ist [11]. Auffällig ist ein deutlicher Gewichtsverlust der Patienten, der auf den Untergang hypothalamischer Orexin-positiver Neuronen zurückzuführen sein könnte [12]. Neuere Untersuchungen legen allerdings auch einen systemischen metabolischen Defekt schon bei präsymptomatischen HD-Patienten nahe [13].

Psychiatrische Symptome sind bei HD sehr häufig anzutreffen und können den motorischen Manifestationen um Jahre vorausgehen. Dazu gehören symptomatische Schizophrenie, Depression mit Suizidalität, Apathie, Alkoholismus und ein gestörter Sexualtrieb [10]. Auffällig sind neben der Demenz andere kognitive Funktionseinbußen wie psychomotorische Verlangsamung, Aufmerksamkeitsdefizite verbunden mit verminderter Planungsfähigkeit komplexer Handlungen, Gedächtnisstörungen, Defizite bei der visuellen Informationsverarbeitung und damit verbunden eine verminderte Fähigkeit, den emotionalen Ausdruck im Gesicht des Gegenübers korrekt einzuschätzen [10]. Im letzten Stadium der Erkrankung können die Betroffenen nicht mehr sprechen und sind nicht mehr in der Lage, sich selbst zu versorgen [14].

Homozygote Allelträger entwickeln keine schwerere Form der Erkrankung als heterozygote [15]. Die Krankheit führt durchschnittlich nach 15 bis 20 Jahren zum Tod [16]. Pneumonie ist die häufigste Todesursache (33%), was vermutlich mit der starken Dysphagie und dem damit verbundenen erhöhten Aspirationsrisiko zusammenhängt [4].

Die juvenile Form der Erkrankung ist durch einen Beginn im Kindes- bzw. Jugendlichenalter gekennzeichnet. Im Einklang mit der Beobachtung, dass eine inverse Beziehung zwischen Anzahl der Polyglutaminwiederholungen und dem Erkrankungsalter besteht, finden sich bei der juvenilen Form meist mehr als 50 Polyglutaminwiederholungen [17]. Im Gegensatz zur erwachsenen Form spielt bei der klinischen Symptomatik hier die Chorea eine weit geringere Rolle. Vielmehr wird das klinische Bild durch Bradykinesie, Tremor, Rigidität und Dystonie bestimmt, bei Kindern auch von epileptischen Anfällen [18]. Auch hier können psychiatrische Symptome den motorischen Auffälligkeiten um Jahre vorausgehen und die Diagnosestellung unter Umständen erschweren [19].

1.4 Pathogenese von HD

HD ist eine autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung [1]. Der genetische Defekt befindet sich auf dem ersten Exon des *IT15*-Gens auf dem kurzen Arm von Chromosom 4. Das Gen kodiert für das 348 kDa große Protein Htt, ein zytoplasmatisches Protein, das in allen Geweben vorkommt, aber im Gehirn die höchsten Konzentrationen zeigt [3,20]. Die Konzentration von Htt ist in Neuronen viel höher als in Gliazellen [21]. Die krankheitsverursachende Mutation besteht in der Verlängerung einer polymorphen, instabilen Sequenz von CAG-Trinukleotiden, welche für eine Kette der Aminosäure Glutamin kodiert [3]. Menschen mit unter 27 CAG-Wiederholungen (CAG-Repeats) sind nie betroffen [22,23]. Menschen mit 27 bis 35 Wiederholungen sind klinisch nicht betroffen, allerdings besteht durch die Instabilität der CAG-Sequenz für deren Kinder ein leicht erhöhtes Risiko für eine CAG-Anzahl im pathologischen Bereich ≥ 36 [22]. Im Bereich von 36 bis 39 CAG-Wiederholungen besteht inkomplette Penetranz, d. h. die Betroffenen erkranken nicht in allen Fällen an HD. Die Mutation ist hingegen komplett penetrant, sobald eine Anzahl von 40 CAG-Wiederholungen erreicht ist, d. h. es erkranken alle Betroffenen, sobald sie das entsprechende Alter erreichen [24]. HD führt zum Untergang von Neuronen im Cortex und Striatum des Gehirns, wobei zuerst die mittelgroßen, spinebesetzten, GABA-ergen Neuronen des Striatums betroffen sind [25]. Später kommt es zu einer eher diffusen neuronalen Degeneration im Globus pallidus, den Nuclei subthalamices, der Substantia Nigra, im Cerebellum und im Thalamus [26]. In Rattengehirnen hat sich gezeigt, dass die für HD anfälligsten Neurone des Striatums auch die höchsten Konzentrationen an Htt besitzen [27]. Letztlich ist weder die physiologische Funktion von Htt vollständig erforscht noch der Mechanismus geklärt, der zum Untergang der betroffenen Neurone führt. Es gibt aber eine Vielzahl an Erklärungsansätzen und Hypothesen, über die in den folgenden Kapiteln ein Überblick gegeben werden soll.

1.4.1 Physiologische Funktion von Htt

Die genaue Funktion von Htt ist nicht komplett geklärt, es gibt aber einige gesicherte Erkenntnisse. In jedem Fall scheint Htt ein zentrales Protein zu sein, da es über zahlreiche HEAT-Sequenzen - hydrophobe alpha-Helices - verfügt, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Das spricht dafür, dass Htt multifunktional ist [28]. Dazu passend konnten mittlerweile 234 Proteine identifiziert werden, die die Fähigkeit haben, direkt mit Htt zu interagieren [29]. Es ist nachgewiesen, dass es eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung spielt einschließlich der Entwicklung des Nervensystems [30]. Dies wird

unterstrichen durch Versuche, in denen gezeigt werden konnte, dass Htt-Knockout-Mäuse an Tag 6-10 der embryonalen Entwicklung sterben [31]. Auch später scheint Htt neuroprotektiv zu wirken, da es die Konzentration neurotropher Faktoren erhöht, wie z. B. des Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) [32]. Das Neurotrophin BDNF findet sich vorwiegend in kortikalen Neuronen, die Projektionen zum Striatum haben und ist ein für das Überleben striataler Neurone sehr wichtiger Faktor [33]. Htt interagiert darüber hinaus mit Post-synaptic Density Protein 95 (PSD95), einem Protein in der postsynaptischen Membran, und ist so an der Regulation der Verankerung von NMDA- und Kainat-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran beteiligt [34]. Htt spielt eine Rolle im intraneuronalen Vesikeltransport wahrscheinlich vermittelt über seine Bindung an Huntingtin-associated Protein 1 (HAP 1) [35,36]. Dazu passend zeigten sich in Post-mortem-Gehirnen von HD-Patienten dystrophe Dendriten, ein typisches morphologisches Zeichen für gestörten retrograden Transport [37]. Es ist darüber hinaus assoziiert mit dem endosomal-lysosomalen Stoffwechselweg [38] und der rezeptorvermittelten Endozytose (RME) [39]. Htt könnte auch am Transport von Transkriptionsfaktoren zwischen Zellkern und Zytoplasma beteiligt sein, vermutlich unter Beteiligung des Kernporenproteins Tpr [40]. Auf die Bedeutung von Htt bei der Transkription und auf seine antiapoptotische Wirkung wird in den Kapiteln 1.4.3. und 1.4.4. eingegangen.

1.4.2 Intrazelluläre Aggregate und Toxizität

Zahlreiche Arbeiten stützen die These, dass Htt mit pathologisch verlängerter Polyglutaminsequenz (polyQ-Htt) zelltoxisch ist, wobei im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass die verlängerte Polyglutaminsequenz die Toxizität bedingt [41-43]. Allerdings sind die genauen Mechanismen, die zum Untergang der Zellen führen, nach wie vor nicht geklärt. Morphologisch sicherlich am auffälligsten ist die Bildung intrazellulärer Aggregate von pathologischem polyQ-Htt, die sich sowohl im Zellkern als Neuronal Intranuclear Inclusions (NIIs) finden [37] als auch im gesamten Neuropil, in Axonen, in Dendriten sowie in prä- und postsynaptischen Regionen [20,44]. Im transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Bildung von NIIs der Entwicklung neurologischer Symptome vorausgeht [45].

Bevor es zur Aggregatbildung kommt, wird das polyQ-Htt in Fragmente gespalten. Interessanterweise erscheinen nur N-terminale Enden in den Aggregaten. Dies wurde aus der Tatsache geschlossen, dass nur gegen den N-Terminus des Htt-Proteins gerichtete Antikörper in der Lage waren, die Aggregate sichtbar zu machen, nicht aber Antikörper gegen den

C-Terminus. Es aggregieren also nur Peptidfragmente [37,44,46]. Ob jedoch die proteolytische Spaltung eine Vorbedingung für die Toxizität von polyQ-Htt ist, bleibt unklar. An der Spaltung des polyQ-Htt scheinen Kaspasen beteiligt zu sein, insbesondere konnte dies für die Kaspasen 3 und 6 gezeigt werden [47,48], aber auch für Kaspase 1, 7, 8 und Calpain [49-52]. Kaspasen sind cysteinabhängige Proteasen, die bei der Apoptose eine zentrale Rolle spielen [53]. Eine lysosomale Spaltung des polyQ-Htt wird ebenfalls diskutiert [38]. Die proteolytische Spaltung scheint in jedem Fall spezifisch für das pathologische polyQ-Htt zu sein, da nicht pathologisches Htt normaler Länge nicht gespalten wird [54,55]. Generell gilt, dass es umso schneller zur Aggregation kommt, je kleiner das Fragment und je länger die Polyglutaminsequenz ist [54,56]. Nach der proteolytischen Spaltung werden die polyQ-Htt-Fragmente in den Zellkern transportiert [57], wo sie NIIs bilden (siehe oben) [45].

Für den Mechanismus der Aggregatbildung selbst wurden verschiedene Erklärungsmodelle vorgeschlagen. Für eine enzymatische Cross-link-Aggregatbildung durch Transglutaminasen konnte *in vivo* kein Beweis erbracht werden [58]. Möglicherweise erfolgt die Aggregation vermittelt durch das Protein Arfaptin 2 [59]. Ein anerkanntes *In-vitro*-Modell geht von einem mehrstufigem Prozess der Selbst-Aggregation aus, an dessen Anfang die durch Entropiegewinn begünstigte Bildung von beta-Faltblättern und Haarnadeln steht, die sich anschließend zu instabilen, aber noch löslichen Nuclei zusammenfinden, welche schließlich unlösliche, geordnete Amyloidfibrillen bilden [60]. Dieser Vorgang läuft umso schneller ab, je höher die Konzentration von polyQ-Htt ist [61]. Der späte Erkrankungsbeginn könnte nach diesem Modell darauf zurückzuführen sein, dass erst eine toxische Htt-Konzentration in der Zelle erreicht sein muss, um Kristallisationskerne für die Aggregate zu bilden.

Die Toxizität der Aggregate wird kontrovers diskutiert. Einerseits könnten sie an sich toxisch sein. Andererseits könnte die Toxizität dadurch zustande kommen, dass wichtige Proteine in die Aggregate rekrutiert werden und der Zelle so nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies konnte insbesondere für Transkriptionsfaktoren gezeigt werden (siehe Kapitel 1.4.3.). Es finden sich in den Aggregaten aber auch Proteinkinasen [62], Komponenten des Proteasoms [63,64] und zahlreiche weitere zentrale Proteine wie Ubiquitin, p53, Aktin und Proteine des nukleären Kernkomplexes sowie Chaperone, z. B. Hsc 70 [65]. Auch Wildtyp-Htt selbst wird in die Aggregate rekrutiert [56].

Ein dritte Hypothese für die mögliche Toxizität der Aggregate besteht darin, dass die in den Aggregaten enthaltenen Proteine eine Blockade des Proteasoms verursachen, was nach einiger Zeit zur Akkumulation anderer falsch gefalteter Proteine führen würde, die eine toxische

Wirkung entfalten und den Zelltod herbeiführen könnten [66,67]. Dies wird unterstrichen durch die Beobachtung, dass die Aggregate zwar ubiquitiniert aber offensichtlich resistent gegenüber Proteolyse sind, was sowohl in Post-mortem-Gehirnen von HD-Patienten als auch im transgenen Mausmodell gezeigt werden konnte [37,45]. Neuere Untersuchungen legen eine globale Störung des Ubiquitin-Proteasom-Systems bei HD nahe [68]. Durch die Akkumulation falsch gefalteter Proteine könnten verschiedene Prozesse ausgelöst werden, die für Apoptose charakteristisch sind, z. B. gestörte Mitochondrienfunktion mit Freisetzung von Cytochrom C ins Cytosol und Aktivierung der Kaspasen 3 und 9 [67].

Diese Befunde sind jedoch keineswegs eindeutig. Bei der Alzheimer-Erkrankung (AD) und bei der Parkinson-Erkrankung (PD) gibt es zunehmende Hinweise, dass die Toxizität nicht durch die Aggregate selbst sondern durch die ihnen vorangehenden Protofibrillen bedingt ist [69,70]. Auch bleibt unklar, ob die Aggregate überhaupt toxisch sind oder lediglich ein Epiphänomen der Pathologie darstellen. In diesem Zusammenhang wird selbst eine neuroprotektive Funktion diskutiert [57]. Neurone mit vielen Aggregaten sterben keineswegs zuerst, und Aggregation und Zelltoxizität sind zwei Vorgänge, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* voneinander entkoppelt ausgelöst werden können [71].

1.4.3 Htt und Transkription

Ein möglicher Ansatz zur Erklärung des Pathomechanismus könnte die Beeinflussung der Transkription wichtiger Gene durch Abzug von oder direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren sein. So konnte gezeigt werden, dass sich in den Aggregaten zahlreiche Transkriptionsfaktoren und Proteine finden, die für die Gentranskription von Bedeutung sind, zum Beispiel TBP, CBP [72] und Sp-1 [73]. CBP ist eine Art Überlebensmediator in reifen Neuronen. Eine Rekrutierung von CBP in die Aggregate führt nachweislich zu einer verminderten neuroprotektiven Wirkung und zu einer Änderung von Transkription und mRNA-Expression [74,75]. Für eine veränderte Genexpression als Ursache des Zelltodes sprechen auch die Erkenntnisse von Dunah et al., die zeigen konnten, dass polyQ-Htt mit dem Transkriptionsaktivator Sp1 interagiert und dessen Zusammenspiel mit seinem Koaktivator TAF130 unterbricht, was die Transkription wichtiger Gene inhibiert, die für das Überleben der Zelle von Bedeutung sein könnten, z.B. des Dopamin-D2-Rezeptor-Gens [73]. Eine zentrale Rolle von Transkriptionsvorgängen in der Pathogenese wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass polyQ-Htt im Zellkern toxischer ist als im Zytoplasma [57,76].

1.4.4 Htt und Apoptose

Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass polyQ-Htt eng mit dem apoptotischen Zelltod verbunden ist. So konnte gezeigt werden, dass die N-terminalen Fragmente des polyQ-Htt *in vitro* Apoptose auslösen [57]. Außerdem spricht einiges dafür, dass, wie oben erwähnt, Kaspasen an der Spaltung des polyQ-Htt beteiligt sind, insbesondere Kaspase 3 und 6 [47,48]. Dafür spräche auch, dass sich Kaspase-Inhibitoren positiv auf das Überleben der Zelle auswirken, auch wenn sie den Zelltod letztlich nicht verhindern [47,54,57,77]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass polyQ-Htt eine niedrigere Affinität zum Huntingtin-interacting Protein 1 (HIP 1) hat als Wildtyp-Htt. HIP 1 steht dann ungebunden in höheren Konzentrationen zur Verfügung und kann mit Kaspase 8 und dem Protein HIPPI einen proapoptotischen Komplex bilden und so möglicherweise den extrinsischen Pfad der Apoptose auslösen und zum Zelltod führen [78].

Wildtyp-Htt scheint die Zelle vor weiteren apoptotischen Signalen zu schützen [79], dies könnte auch durch die Inhibierung von Prokaspase 9 erfolgen [80]. Allerdings gibt es auch Daten, die gegen eine Assoziation mit Apoptose sprechen. Einerseits konnte in Post-mortem-Proben von HD-Patienten und im Mausmodell DNA-Fragmentierung in den Zellkernen betroffener Neurone nachgewiesen werden, was ein typisches Zeichen für apoptotische Vorgänge in der Zelle ist [81]. Andererseits gibt es auch dem widersprechende Ergebnisse im Mausmodell, wo gezeigt wurde, dass die Zellorganellen bei HD ihre ultrastrukturelle Integrität behalten, was gegen einen rein apoptotischen Zelltod spricht [82]. Zwar konnte eine Involvierung von Kaspase 3 bei der Spaltung von polyQ-Htt nachgewiesen werden, allerdings wird Kaspase 3 nur in apoptotischen Zellen exprimiert, d. h. Apoptose muss in der Zelle bereits stattfinden, was jedenfalls gegen einen primären Prozess spricht, da diese relativ schnell abläuft [47].

1.4.5 Andere Erklärungsansätze für die Pathogenese von HD

Eine ebenfalls vielversprechende Hypothese beruht auf der Erkenntnis, dass polyQ-Htt die Konzentration an BDNF in Mäusen und Menschen vermindert [83]. Wie oben bereits besprochen ist das Neurotrophin BDNF ein für das Überleben striataler Neurone sehr wichtiger Faktor und findet sich vorwiegend in kortikalen Neuronen, die Projektionen zum Striatum haben [33]. BDNF-Knockout-Modelle scheinen Schlüsselschritte der Pathogenese von HD sehr gut abzubilden [84]. Vor kurzem konnte auch gezeigt werden, dass eine parenterale Applikation von BDNF zu einer deutlichen Verbesserung gestörter synaptischer Plastizität und verminderter Long Term Potentiation (LTP) im Mausmodell führt [85].

Es gibt Hinweise *in vitro* und *in vivo* für mitochondriale Dysfunktion bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Friedreich-Ataxie, PD und HD [86]. Neben anderen Mechanismen wurde eine direkte mitochondriale Toxizität von polyQ-Htt vermutet. Dies könnte zu dauerhaft erniedrigten ATP-Konzentrationen in den betroffenen Neuronen führen und somit die Apoptose-Schwelle herabsetzen [87]. Außerdem kommt es zur vermehrten Produktion zellschädigender freier Radikale (Reactive Oxygen Species, ROS) und erhöhtem oxidativem Stress [88]. Dadurch wird die Schwelle für toxische Glutamatwirkungen auf die Zelle herabgesetzt [89]. Neuere Ergebnisse zeigen, dass polyQ-Htt die Transkription von PGC-1 α unterdrückt, einem Transkriptionskoaktivator für zentrale metabolische Abläufe in der Zelle, und auf diesem Weg zu mitochondrialer Dysfunktion und gestörtem Energiestoffwechsel führt [90].

Es konnte gezeigt werden, dass polyQ-Htt die Histonacetylierung durch direkte Hemmung der Histonacetylasen oder durch deren Einbinden in Aggregate hemmt [91,92]. Dies impliziert einen weitreichenden Defekt in der Chromatinstruktur betroffener Zellen. Damit im Einklang steht die Beobachtung, dass Histon-Deacetylasehemmer die polyglutamingetriggerte Dysfunktion der Zelle bzw. deren Tod aufhalten können [92].

Die Bedeutung von Htt für den intraneuronalen Vesikeltransport vermittelt über HAP 1 wurde oben bereits angedeutet. Im Krankheitsfall ist die Bindung von polyQ-Htt an HAP 1 gestört und somit der Vesikeltransport möglicherweise beeinträchtigt [35,36].

Außerdem könnte polyQ-Htt über eine verminderte Interaktion mit dem PSD95-Protein die Empfindlichkeit der NMDA-Rezeptoren der mittelgroßen, spinebesetzten Neuronen im Striatum für ihr Substrat Glutamat oder die Postsynaptic Density (PSD) erhöhen, was zu vermehrtem Kalziumeinstrom in die Zelle mit nachfolgender Apoptose führen könnte [93]. Die toxischen Wirkungen einer Überstimulation durch den Neurotransmitter Glutamat bilden die Grundlage der *Exzitotoxizitätstheorie* der HD-Pathogenese. PSD-95-Knockout-Mäuse haben gravierende Störungen des räumlichen Lernens, was ein weit verbreitetes Symptom bei HD-Patienten ist [94]. Chirurgische Unterbrechung der kortikostriatalen Bahnen mit resultierender Senkung des striatalen Glutamatspiegels mildert den Krankheitsphänotyp und verlängert das Überleben von R6/2-Mäusen [95].

1.5 Frühe pathologische Veränderungen bei HD

Viele der in Kapitel 1.4. beschriebenen Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese von HD wurden durch Untersuchungen von späten Erkrankungsstadien (late-stage disease) gewonnen. Naturgemäß betrifft dies insbesondere Untersuchungen an Post-mortem-Gehirnen von HD-

Patienten, die zum Zeitpunkt des Todes meist einen sehr weit fortgeschrittenen Krankheitsphänotyp zeigen.

Allerdings gibt es zahlreiche Untersuchungen mit bildgebenden Verfahren (fMRI, PET, SPECT) am Menschen, die dafür sprechen, dass es schon bei präsymptomatischen Genträgern, teilweise lange vor dem Auftreten erster Symptome, zu pathologischen Veränderungen im Gehirn kommt. Dies betrifft zum einen Veränderungen auf makroanatomischer Ebene wie verminderte Durchblutung der Basalganglien [96], Atrophie des Striatums [97] und der grauen und weißen Substanz [98]. Zum anderen zeigen sich mittels fMRI und PET aber auch sehr frühe funktionale Veränderungen im Gehirn wie verminderte Aktivierung im Gyrus cinguli [99], verstärkte Aktivierung thalamokortikaler Bahnen beim motorischen Lernen [100] und veränderte Aktivierung im lateralen Präfrontalkortex bei Gedächtnisaufgaben [101]. Auf Stoffwechselebene legen funktionale bildgebende Untersuchungen einen verminderten Glukosemetabolismus vor allem im Striatum [102-104], sowie erhöhten Glukoseverbrauch im Thalamus nahe [105]. Diese Befunde deuten auf eine bereits früh einsetzende Pathologie hin, die sich vor dem Auftreten erster Symptome entwickelt.

Einige der vorhandenen Mausmodelle eignen sich durch den meist frühen Erkrankungsbeginn und den zum Teil rapiden Verlauf mit kurzer Lebensspanne (R6/2-Modell) nur bedingt zur Untersuchung früher Veränderungen. Allerdings konnten auch hier Erkenntnisse gewonnen werden, die eine frühe Pathologie zeigen. So weisen bereits präsymptomatische Tiere eine gestörte synaptische Plastizität auf [106,107]. Darüber hinaus bestehen schon früh schwere Störungen der dopaminergen Übertragung im Gehirn [108] sowie eine Beeinträchtigung von ribosomalen Regulatorgenen [109].

In einer grundlegenden Arbeit konnte vor einigen Jahren an humanem Post-mortem-Gewebe gezeigt werden, dass bereits im präsymptomatischen Erkrankungsstadium die Sp1-vermittelte Transkription zahlreicher wichtiger Gene unterdrückt ist, was ebenfalls eine früh einsetzende Pathologie nahelegt [73].

Vor kurzem wurde bei präsymptomatischen HD-Patienten ein gestörter Energiestoffwechsel im Gehirn postuliert [13], was sich mit Erkenntnissen im Mausmodell deckt [110]. Im Einklang damit stehen Untersuchungen am Mausmodell und in der Zellkultur, wo gezeigt werden konnte, dass bei HD der cAMP-Spiegel in Neuronen bereits früh erniedrigt ist, was zu Veränderungen im ATP-Haushalt und im Energiestoffwechsel des Gehirns führt [111].

Im Krankheitsverlauf von HD scheinen also schon im präsymptomatischen Stadium vielfältige pathologische Mechanismen zu wirken. Die Untersuchungen hierzu sind in ihrer

Zahl jedoch relativ beschränkt bzw. in ihrer Aussagekraft limitiert. Mittels bildgebender Verfahren lassen sich zwar frühe Veränderungen im Gehirn detektieren, allerdings können so kaum Aussagen zur Pathogenese gemacht werden. Frühe Untersuchungen wurden teilweise am Mausmodell durchgeführt, die vorhandenen Modelle sind für frühe Untersuchungen jedoch eher ungeeignet (siehe Kapitel 1.6.1.). Proteomstudien eignen sich sehr gut zur Detektion einer großen Anzahl an Proteinveränderungen, allerdings lag der Schwerpunkt der bisher für HD durchgeführten Proteomstudien bei Veränderungen im späteren Verlauf der Erkrankung [110,112-115]. Bisher fehlt eine breit angelegte und aussagekräftige Untersuchung zu sehr frühen Veränderungen bei HD.

1.6 Tiermodelle für HD

Tiermodelle sind für die Erforschung der HD von unschätzbarem Wert. Im Vergleich zu humanen Post-mortem-Proben, die meist nur weit fortgeschrittene Krankheitsstadien repräsentieren, können in Tiermodellen auch frühe Veränderungen bei HD untersucht werden, was beim Menschen aus ethischen Gründen nicht möglich ist. Darüber hinaus ermöglichen Tiermodelle Medikamentenstudien *in vivo*. Ein weiterer Vorteil von Tiermodellen, insbesondere im Hinblick auf eine Proteomstudie, ist ihre im Vergleich zum Menschen größere interindividuelle Homogenität im Expressionsmuster der Proteine. Beim Menschen ist die Heterogenität innerhalb der Spezies sehr viel größer als bei Tiermodellen, wo durch Inzucht eine weitgehende Homogenität des Genoms erreicht wird.

Gute Tiermodelle für HD sollten zentrale Merkmale der Erkrankung abbilden. Dazu gehören ein im Erwachsenenalter einsetzender Krankheitsbeginn (mid-life oder late-life onset) mit progressivem Verlauf, die Ausbildung einer fortschreitenden motorischen Symptomatik, der Untergang striataler Projektionsneurone und die Ausbildung intraneuronaler polyQ-Htt-Aggregate, eventuell auch die Entwicklung kognitiver und psychischer Defizite, wobei letztere unter Umständen kein klares Korrelat beim Tier haben [116].

Die ersten Tiermodelle für HD waren toxinbasierte Modelle. Diese bilden durch Applikation von Quinolinsäure (QA, ein NMDA-Agonist) bzw. 3-Nitropropionsäure (3-NP) in Versuchstieren zentrale pathogenetische Merkmale bei HD ab, nämlich einerseits den exzitotoxischen, glutamatvermittelten Zelltod (QA) und andererseits mitochondriale Dysfunktion (3-NP) mit entsprechenden HD-ähnlichen Symptomen und HD-ähnlichen histologischen und neurochemischen Merkmalen. Allerdings fehlt diesen Modellen die typische Symptomprogredienz, die den Krankheitsphänotyp beim Menschen kennzeichnet [117].

Die Entdeckung der krankheitsverursachenden Mutation im Jahre 1993 [3] ermöglichte in der Folge die Entwicklung zahlreicher genetischer Tiermodelle für HD, die neben die existierenden toxinbasierten Tiermodelle traten. Die genetischen Tiermodelle können in transgene und knock-in Modelle unterteilt werden. Es wird entweder das gesamte mutierte Htt-Gen (full-length) oder Teile davon (truncated) in das Genom der Versuchstiere eingebracht, und zwar entweder an die Stelle des ursprünglichen Htt-Gens (knock-in) oder an anderer Stelle im Genom (transgen) [117]. Da in dieser Arbeit als Krankheitsmodell ein transgenes Rattenmodell verwendet wurde, werden sich die weiteren Betrachtungen auf die transgenen Tiermodelle beschränken.

1.6.1 Transgene Mausmodelle für HD

Es gibt zahlreiche transgene Mausmodelle für HD, unter anderem das N171-82Q-Modell [118], das YAC-72- und das YAC-128-Modell [119], das R6/1-Modell und das R6/2-Modell [42]. Die Modelle unterscheiden sich hinsichtlich der Länge des eingebrachten Genfragments und des Promotors, unter dessen Kontrolle es steht. Darüber hinaus exprimieren die verschiedenen Modelle eine unterschiedliche Anzahl an Polyglutamin- bzw. CAG-Repeats. Es gibt deutliche Unterschiede hinsichtlich klinischer Symptomatik, Symptomprogredienz und histologischer bzw. neurochemischer Merkmale.

Eines der gebräuchlichsten transgenen Mausmodelle ist das R6/2-Modell. Es exprimiert das erste Exon des humanen Htt-Gens mit 141 bis 157 CAG-Repeats und zeigt zahlreiche Schlüsselmerkmale von HD einschließlich progredienter motorischer Symptomatik, Ausbildung von NIIs, kognitiven Defiziten und emotionalen Auffälligkeiten. Allerdings exprimieren die R6/2-Mäuse eine sehr große Anzahl von CAG-Repeats, was eher für die juvenile Form von HD beim Menschen typisch ist. Es kommt zu einem sehr frühen Einsetzen der Symptome und einer raschen Krankheitsprogredienz, was bei der erwachsenen Form der HD beim Menschen (adult-onset) nicht auftritt. Ebenso untypisch ist die frühe Entwicklung eines Diabetes mellitus bei R6/2-Mäusen [42]

1.6.2 Das transgene CAG-51-Rattenmodell für HD

Das in dieser Arbeit verwendete Krankheitsmodell ist ein transgenes Rattenmodell mit 51 Polyglutaminrepeats. Bei diesem Modell wurde das betroffene Allel eines HD-Patienten mit 51 CAG-Repeats mit Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und in ein 1962 bp langes cDNA-Fragment des Htt-Gens der Ratte kloniert. Das Transgen steht unter der Kontrolle eines 885 bp langen Fragments des endogenen HD-Promotors der Ratte [120].

Durch die im Vergleich zum transgenen R6/2-Mausmodell relativ geringe Anzahl an CAG-Repeats entwickeln die CAG-51-Ratten einen verzögerten (late-onset) Krankheitsphänotyp mit progressiver motorischer Symptomatik.

Im Alter von 1 Monat kommt es bei den Tieren zu ersten phänotypischen Erscheinungen der Erkrankung in Form einer im sozialen Interaktionstest messbaren Angstreduktion. Im Alter von 6 Monaten werden erste motorische Dysfunktionen beobachtet, die sich im Krankheitsverlauf verstärken. Beim R6/2-Modell treten diese Veränderungen schon mit 5 Wochen auf, obwohl Maus und Ratte eine ähnliche Lebenserwartung haben. Betroffen sind vor allem die Bewegungskoordination der Extremitäten mit gestörter Balance im Rotarod-Test und die Motorik des Kopfes. Mit 9 Monaten kommen kognitive Ausfälle des räumlichen Lernens hinzu, die in der Radial Maze, einer experimentellen Anordnung für Verhaltensbeobachtungen bei Tieren, nachgewiesen werden können [121]. Mit 20 Monaten treten im Open-field-Test nachweisbare unwillkürliche Bewegungen von Kopf und Hals auf [122]. Im Alter von 24 Monaten wiegen die kranken Tiere durchschnittlich 20 % weniger als ihre gesunden Artgenossen und versterben im Schnitt nach weiteren 2 Wochen rapiden körperlichen Verfalls [120].

Neuropathologisch kommt es vorwiegend im Striatum und im limbischen System, im späteren Verlauf auch im Cortex, zur Bildung von Aggregaten in zahlreichen zellulären Substrukturen einschließlich des Zellkerns (NIIs). Erste Aggregate lassen sich im Alter von 6 Monaten nachweisen [121,123]. Deren Verteilung ist nach immunhistologischer Anfärbung mit EM48 dem Verteilungsmuster beim Menschen sehr ähnlich [44]. Es wurden deutliche Unterschiede im striatalen Rezeptorprofil im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren gefunden [124]. Mittels High-performance- Flüssigkeitschromatographie (HPLC) konnte eine 80 %-ige Reduktion von Dopamin im Striatum homozygoter Ratten nachgewiesen werden. PET-Untersuchungen zeigen eine verminderte striatale Glukoseverwertung im Alter von 8 Monaten. Im MRT wurden vergrößerte Seitenventrikel und fokale striatale Läsionen nachgewiesen [120]. Dazu passend zeigt sich im Alter von 12 Monaten ein Verlust von Neuronen im Striatum [125].

Das CAG-51-Rattenmodell bietet bei der Untersuchung von HD also zahlreiche Vorteile. Zum einen zeigen die Tiere ein dem Menschen sehr ähnliches Muster intrazellulärer Aggregatbildung und Ausbildung von NIIs mit nachfolgendem Untergang von Neuronen im Striatum, was für eine gute Abbildung der Pathogenese durch das Modell spricht. Die langsame und relativ späte Entwicklung motorischer Defizite ist dem häufigen late-onset-Krankheitstyp beim Menschen viel ähnlicher als der frühe Krankheitsbeginn und die rapide Progredienz z. B. bei R6/2-Mäusen, was eher dem juvenilen Krankheitstyp beim Menschen

entspricht. Emotionale Auffälligkeiten gehen der Entwicklung motorischer Symptome weit voraus, was auch bei HD-Patienten oft der Fall ist. Erste kognitive Auffälligkeiten zeigen sich besonders deutlich in einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernens - ein typisches Krankheitsmerkmal bei HD-Patienten [10]. Der verzögerte Krankheitsbeginn ermöglicht die detaillierte Untersuchung insbesondere früher Krankheitsstadien. Das größere Gehirnvolumen der Ratte erlaubt darüber hinaus eine im Vergleich zur Maus viel leichtere Präparation von Gehirnregionen. So ist es möglich, verschiedene Gehirnregionen getrennt zu untersuchen.

1.7 Zielsetzung der Dissertation

Es gibt mittlerweile zahlreiche gesicherte Erkenntnisse zur Pathogenese von HD (siehe Kapitel 1.4.), allerdings sind diese größtenteils aus Studien mit relativ fortgeschrittener Pathologie der Erkrankung gewonnen worden (siehe Kapitel 1.5.).

Ziel dieser Arbeit war es daher, in großem Maßstab Veränderungen auf Proteinebene bei HD zu identifizieren, die schon in sehr frühen Erkrankungsstadien wirksam sind. Als Krankheitsmodell diente das in Kapitel 1.6.2. beschriebene transgene CAG-51-Rattenmodell. Durch den dem Krankheitsverlauf beim Menschen sehr ähnlichen late-onset-Typ der Erkrankung und einer relativ langen Lebensspanne der Tiere eignet sich das Modell in besonderer Weise zur Untersuchung früher Veränderungen im Verlauf der Pathologie. Das im Vergleich zur Maus größere Gehirn erlaubt die sichere Präparation von unterschiedlichen Gehirnregionen.

Es wurde ein Großgel-2D-Elektrophorese-gestützter Ansatz verwendet. Die Großgel-2D-Elektrophorese eignet sich sehr gut für Untersuchungen auf Proteinebene, da insbesondere auch quantitative Aussagen zu Proteinveränderungen getroffen werden können. Zudem können sehr viele Veränderungen gleichzeitig detektiert werden.

Es wurden drei Untersuchungszeitpunkte (Altersstufen) des Krankheitsmodells gewählt, eine präsymptomatische (10 Tage), eine frühe mit mildem Krankheitsphänotyp (70 Tage) und eine mittlere mit fortgeschrittenem Krankheitsphänotyp (465 Tage). Das Hauptaugenmerk lag auf der präsymptomatischen Altersstufe (10 Tage). Für jede Altersstufe wurden zwei Gehirnregionen untersucht. Das Striatum ist von Beginn an eine bei HD stark betroffene Gehirnregion, wohingegen das Cerebellum erst deutlich später Veränderungen aufweist.

Durch Massenspektrometrie (MS) wurden die bei der präsymptomatischen Altersstufe (10 Tage) veränderten Proteine identifiziert, so dass erstmals in großem Maßstab Aussagen zu sehr frühen Veränderungen bei HD auf Proteinebene gemacht werden konnten.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Gewebe

In dieser Arbeit wurden Gehirngewebeproben aus dem Striatum und dem Cerebellum von homozygoten CAG-51-Ratten sowie Kontrollgewebe der gleichen Gehirnregionen von gesunden Ratten gleichen Alters, Geschlechts und genetischem Hintergrund verwendet [120]. Für die Untersuchungen wurde Gewebe von Tieren dreier Altersstufen verwendet: 10, 70 und 465 Tage. Die Bereitstellung der Gewebeproben erfolgte dabei im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Dr. med. Huu Phuc Nguyen, Institut für Medizinische Genetik, Uniklinikum Tübingen, Tübingen. Das verwendete transgene CAG-51-Rattenmodell wurde bereits an anderer Stelle detailliert beschrieben [120]. Das CAG-51-Rattenmodell wurde auf einem Sprague-Dawley-Hintergrund kreiert. Die Genotypisierung erfolgte mittels Southern-Blot-Analyse.

2.2 Präparation von Gehirnregionen

Die Ratten wurden mit CO₂ narkotisiert und durch Enthauptung getötet, das Fell entfernt, der Schädel eröffnet und das Gehirn vollständig entnommen. Hierauf erfolgte die Abtrennung des Rückenmarks vom Rhombenzephalon. Das Gehirn wurde in eine auf Eis gelagerte und mit 0,9 % (w/v) Kochsalzlösung (NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) gefüllte Petrischale verbracht. Am Gehirn verbliebenes Blut wurde durch vorsichtiges Spülen mit der Kochsalzlösung entfernt. Das Gehirn wurde nun mit Kimwipes® (Kimwipes® Lite, Hakle-Kimberly, Mainz, Deutschland) trockengetupft, worauf sich die Präparation der Gehirnregionen anschloss. Anschließend wurden diese sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C für den weiteren Gebrauch gelagert. Die Präparation von Striatum und Cerebellum erfolgte durch Herrn Dr. med. Huu Phuc Nguyen, Institut für Medizinische Genetik, Uniklinikum Tübingen, Tübingen, der über große Erfahrung in der Präparation von Rattengehirnen verfügt.

2.3 Herstellung der Proteinproben

2.3.1 Gesamtextrakt aller zellulären Proteine – Einführung

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Gesamtextraktion zielt auf die Erfassung möglichst aller Proteine eines Gewebes, also der zytosolischen, der membranassoziierten und

der Kernproteine. Durch die Gesamtextraktion aller zellulären Proteine zur selben Zeit wird sichergestellt, dass es nicht zur Artefaktbildung durch Umverteilungsphänomene kommt, wie das bei der sogenannten fraktionierten Extraktion der Fall ist. Darüber hinaus ist das Verfahren deutlich einfacher und zeitsparender als die fraktionierte Extraktion bei gleichzeitiger guter Kompatibilität mit den neuesten Verfahren zur Proteinvisualisierung wie z. B. „Differential In Gel Electrophoresis“ (DIGE). Dieses Extraktionsverfahren kann auf nahezu alle Gewebe, Zellkulturen oder subzelluläre Komponenten angewendet werden. Da keine Ultrazentrifugationsschritte vorgesehen sind, werden Proteinpräzipitationen und Proteinverlust bei der Probenvorbereitung vermieden. Grundlage des Verfahrens ist die Zugabe von Proteaseinhibitoren, zwitterionischen Detergenzien (z. B. CHAPS) und Harnstoff/Thioharnstoff zur Probe, um so die Proteine einerseits in Lösung zu halten und andererseits Präzipitationen zu vermeiden. In einem zweiten Schritt wird das gefrorene Gewebe dann zermahlen und mit Ultraschall behandelt. Die Ultraschallbehandlung dient der Auflösung von Membranen und Freisetzung der membranassoziierten Proteine. Schließlich werden durch Zugabe von DNase auch die Kernproteine erfasst.

2.3.2 Herstellung des Proteingestamtextrakts

Zuerst werden alle benötigten Puffer in großen Mengen (Batches) hergestellt, um eine gute Reproduzierbarkeit der Proteinextraktion zu gewährleisten:

1. Puffer P: 7,7 % (w/v) Glycerol (endgültige Konzentration in der Probe bei einem Pufferfaktor von 1,6), 50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. Diese Lösung wurde filtriert, in Portionen zu 900 µl aufgetrennt und bei -70 °C aufbewahrt.
2. Puffer P-MgCl₂: 5 mM MgCl₂ in Puffer P. Auftrennung in Portionen zu 20 µl und Aufbewahrung bei -70 °C
3. Proteaseinhibitor 1: Eine Tablette Complete™ (ROCHE, Mannheim, Deutschland) wurde in 2 ml Puffer P gelöst (entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers). Auftrennung erfolgte in Portionen zu 50, 80 und 100 µl.
4. Proteaseinhibitor 2 (Pepstatin A): hergestellt als Stammlösung (9,603 mg/100 ml Ethanol), Auftrennung in Portionen zu 100 µl, Lagerung aller Inhibitoren bei -70 °C
5. Dithiotreitol- (DTT-) Lösung: 2,16 g DTT wurden in 10 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst. Auftrennung in Portionen zu 100 µl und Aufbewahrung bei -70 °C.
6. Probenverdünner: Puffer P-MgCl₂, Auftrennung in Portionen zu 250 µl und Lagerung bei -70 °C

Tabelle 1: Protokoll zur Proteingestamtextraktion

Homogenisierung	<p>Gehirngewebe (50 bis 150 mg)</p> <p>Puffer P-CHAPS 65 mg CHAPS 38 mg doppelt destilliertes Wasser</p> <p>Puffer P-CHAPS ($1,6 \times$ mg Gehirngewebe) Σ_1 (mg Gehirngewebe + mg Puffer P-CHAPS) Inhibitor 1 ($\Sigma_1 \times 0,08$) Inhibitor 2 ($\Sigma_1 \times 0,01$) Σ_2 (mg Σ_1 + mg Inhibitor 1 + mg Inhibitor 2)</p>
Ultraschallbehandlung	<p>Anzahl Glaskugeln ($\Sigma_2 \times 0,034$) Ultraschall 6×10 s Σ_3 (Probengewicht wird nach Ultraschallbehandlung festgelegt)</p>
Rühren	4 °C; 15 min
Benzonasebehandlung	<p>P-MgCl₂ ($\Sigma_3 \times 0,021$) Benzonase ($\Sigma_3 \times 0,025$) 4 °C; 15 min Σ_4 (Probengewicht wird nach Benzonasebehandlung festgelegt)</p>
Kontrollfaktor	Gehirngewicht/ Σ_4
Proteinkonzentration	<p>Aliquot 5 μl Σ_5 (Probengewicht wird nach Aliquotierung festgelegt)</p>
Harnstoff/Thioharnstoff	<p>Harnstoff 6 M ($\Sigma_5 \times 0,78$) Thioharnstoff 2 M ($\Sigma_5 \times 0,3$) Rühren bei Raumtemperatur, 30 min</p> <p>Σ_6 (Probengewicht nach Zugabe von Harnstoff) DTT ($\Sigma_6 \times 0,1$) Raumtemperatur, 5 min Ampholin ($\Sigma_6 \times 0,1$) Σ_7 (Probengewicht nach Zugabe von DTT und Ampholin)</p>

In einem ersten Schritt wurde zunächst gefrorenes Gewebe mit den zugehörigen Reagenzien pulverisiert. Die Menge an verwendeter gefrorener Probe sollte zwischen 50 und 150 mg liegen. Mörser, Pistill (WITA GmbH, Teltow, Deutschland) und Spatellöffel wurden etwa 3 bis 4 min zur Kühlung in eine Styroporbox mit flüssigem Stickstoff verbracht. Das gefrorene Gehirngewebe wurde unter Zugabe von Puffer P-CHAPS und Proteaseinhibitor 1 und 2 in den Mörser gegeben. Die erforderlichen Mengen von jeder Lösung wurden anhand der Angaben in Tabelle 1 berechnet. Die Lösungen wurden dann auf den in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Spatel pipettiert, wodurch sie zu Eistropfen gefroren. Anschließend wurden sie in den in flüssigem Stickstoff eingetauchten Mörser befördert und mit dem Pistill zu Pulver zermahlen. Dieses wurde nun mit Hilfe eines Spatels in ein vorgekühltes 2 ml Eppendorfgefäß überführt und mittels einer Zange in flüssigem Stickstoff nochmals tiefgefroren.

Als nächstes schloss sich die Ultraschallbehandlung im Wasserbad (Transsonic 310, FAUST, Singen, Deutschland) an. Eine bestimmte Anzahl Glaskugeln (siehe Tabelle 1) wurde der Probe beigegeben. Anschließend wurde die Probe aufgetaut und auf Eis gelagert. Die Ultraschallbehandlung erfolgte in einem Eiswasserbad, dessen Füllhöhe ausschlaggebend für den Ultraschalleffekt der Membranauflösung ist, so dass die Anforderungen des Herstellers strikt eingehalten wurden. Das Probenröhrchen wurde im Zentrum des Ultraschalls (erkennbar an konzentrischen Wasserkreisen an der Oberfläche) ins Wasser getaucht. Die Behandlung erfolgte 10 s lang. Sofort im Anschluss wurde die noch im Wasserbad befindliche Probe mittels eines dünnen Drähtchens 50 s lang umgerührt und dann 1 min in Eis gehalten. Analog dazu folgte dann der zweite Durchlauf der Ultraschallbehandlung, insgesamt wurde die Behandlung sechs Mal durchlaufen. Im Anschluss an die Ultraschallbehandlung wurden die Probenröhrchen auf den Kopf gestellt. Mit einer Nadel wurde in den Boden der Röhrchen ein Loch mit etwa 2 mm Durchmesser punktiert, so dass die Glaskugeln gerade noch zurückgehalten wurden. Ein zweites Röhrchen wurde am der Öffnung entgegengesetzten Ende des ersten aufgesteckt und beide Röhrchen wurden bei 2000 g 1 min lang zentrifugiert, so dass sich nach Zentrifugation die Probe im unteren Röhrchen befand, während die Glaskugeln im oberen verblieben. Als nächstes wurde mit einem Rührfloh bei einer Temperatur von 4 °C für 15 min gerührt.

Nach Zugabe von Benzonase (Merck, Darmstadt, Deutschland) und P-MgCl₂ wurde das Homogenat weitere 15 min lang bei 4 °C verrührt (DNA-Verdau). Nach Bestimmung des Kontrollfaktors (siehe Tabelle 1) wurde ein kleiner Teil des Extrakts (2 -3 µl) zur Ermittlung der Proteinkonzentration entfernt. In einem nächsten Schritt wurden zur weiteren

Solubilisierung Harnstoff und Thioharnstoff dazugegeben. Die in Tabelle 1 aufgeführten Mengen wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit Kappe gefüllt. Das Röhrchen wurde verschlossen und auf den Kopf gestellt. Nun wurde der Boden des Röhrchens mit einer Schere abgeschnitten und auf dem Kopf des Röhrchens mit dem Homogenat angebracht. Mittels quick-spin wurde der Harnstoff/Thioharnstoff komplett in das Homogenat überführt (1 min, 1000 g). Das Homogenat wurde 30 min lang verrührt, bis sich der Harnstoff/Thioharnstoff komplett aufgelöst hatte. DTT wurde dazugegeben, dann mindestens noch 5 min weiter verrührt. Zum Abschluss kam Ampholin Servalyte pH 2,0 bis 4,0 (Serva, Heidelberg, Deutschland) hinzu. Bis zur Isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden die Proben eingefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

2.4 Großgel-2D-Elektrophorese

Die Proteine wurden durch hochauflösende Großgel-2D-Elektrophorese aufgetrennt, eine Technik, die in unserem Labor entwickelt und bereits ausführlich an anderer Stelle beschrieben wurde [126,127]. Durch zufällige Auswahl aus einem Pool von Striatum- oder Cerebellumgewebe von Ratten gleichen genetischen Hintergrunds, Geschlechts und Alters wurden Paare gebildet, bestehend jeweils aus einer Gehirnregion aus CAG-51-Ratten und der gleichen Gehirnregion aus Kontrollgewebe. Im Folgenden werden diese Paare als Probenpaare bezeichnet. Die Probenpaare wurden nun immer parallel beiden in den nächsten Kapiteln dargestellten Elektrophoreseprozeduren unterzogen.

2.4.1 Erste Dimension: die Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die erste Dimension (1D) ist die Isoelektrische Fokussierung (IEF). Bei dieser Methode werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt, d. h. das Protein wandert solange im elektrischen Feld innerhalb eines pH-Gradienten, bis seine Nettoladung gleich Null ist. Der dazu notwendige pH-Gradient entsteht durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an eine Matrix mit frei beweglichen Ampholinen. Durch ihre zwitterionischen Eigenschaften bilden diese einen pH-Gradienten aus. Die Ampholytmoleküle mit niedrigem pI wandern nach Anlegen des elektrischen Feldes zur Anode, die mit hohem pI zur Kathode, der Rest richtet sich dazwischen nach dem pI aus. Die Auftrennung erfolgte in mit einer horizontalen Bohrung versehenen Glasröhrchen. Die Trennstrecke betrug 40 cm. Es gibt 1D-Röhrchen mit kleiner und großer Bohrung. Die kleine Bohrung hat einen Durchmesser von 0,9 mm und das Probenauftragsvolumen ist auf 6 µl bis 10 µl beschränkt. Diese Gele wurden aufgrund der höheren Trennschärfe für die Herstellung von 2D-Gelen zur Detektion von

quantitativen Unterschieden verwendet (analytische Gele). Die mit 1,5 mm etwas dickeren 1D-Röhrchen fassen ein Auftragsvolumen von bis zu 50 µl und wurden daher zur massenspektrometrischen Spotidentifizierung benutzt (präparative Gele). Mit „Spot“ sind im Folgenden die nach Silberfärbung auf dem 2D-Gel sichtbaren Proteinisoformen bezeichnet.

2.4.1.1 Herstellung der 1D-Gele

Zur Herstellung der 1D-Gele wurden zylindrische Glasröhrchen (Schott Glas, Mainz, Deutschland) wie oben beschrieben verwendet. Der erste Schritt bei der IEF war die sorgfältige Reinigung der Röhrchen, da nur so ein gleichmäßiges Anhaften des 1D-Gels am Glas gewährleistet ist. Zusätzlich soll dadurch eine Verunreinigung mit Fremdprotein verhindert werden. Zur Reinigung wurden die Röhrchen zuerst in auf 50 °C erhitzter 6 % (v/v) Deconex® - 12- Lösung (Borer Chemie, Zuchwil, Schweiz) eingeweicht, dann in einer 0,1 M HCl-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 90 °C erhitzt, abschließend mit deionisiertem Wasser gespült und unter Druckluft getrocknet.

Als nächstes wurden die Röhrchen senkrecht in einen Gelröhrchenständer eingespannt und die Bohrungen mit Nylonziehfäden (Angelschnur, Ertner super, 0,7 mm, 100 m Deutschland) versehen, welche zur Gewährleistung der Dichtigkeit über einer Flamme leicht angeschmolzen und sofort im Anschluss durch ein 0,9 mm breites 1D-Röhrchen gezogen wurden. Nun wurde das untere Ende der Röhrchen in eine Gießschiene gestellt und die Nylonfäden so weit nach unten gedrückt, bis ein Kontakt zur Gießschiene hergestellt war. Als nächstes wurde mit Hilfe der Fäden doppelt destilliertes Wasser in die Röhrchen gesogen. Dieser Schritt diente neben der Hydrierung des Glases der nochmaligen Überprüfung der Dichtigkeit, also wie genau die Ziehfäden mit der Glaswand des jeweiligen Röhrchens abschlossen. Zum Gießen der Gele wurden zwei Gellösungen benötigt: zum einen das Separationsgel (Trenngel) zum anderen das Cappel (Zusammensetzung siehe Tabelle 2 und Tabelle 3).

Die beiden Gellösungen wurden in einem 30 °C warmen Wasserbad 30 min inkubiert, bis der Harnstoff vollständig gelöst war. Danach folgte eine 5-minütige Entgasung mit einer Wasserstrahlpumpe, wodurch eine Blasenbildung beim Gießen verhindert werden sollte. Das Wasser wurde aus den Gelröhrchen entfernt und diese mit Druckluft getrocknet. Anschließend wurden wie oben beschrieben erneut die Nylonfäden befestigt. Für fünf Gele mit einem Durchmesser des Röhrchens von 0,9 mm wurden zu 1950 µl des Separationsgels 50 µl einer 0,8 % (w/v) Ammoniumpersulfatlösung (APS, Biorad, CA, USA) hinzugegeben. Die Lösung wurde im Anschluss mit einem dünnen Glasstab verrührt und sofort in die Gießschiene gefüllt. Die Nylonfäden wurden 39 cm nach oben gezogen unter Mitnahme der

Separationsgellösung, wobei auf unbedingte Luftblasenfreiheit geachtet wurde. Die Gießschiene mit der nun nicht mehr benötigten Gellösung wurde entfernt.

Zu 780 µl Cappelösung wurden 20 µl APS-Lösung gegeben, gut verrührt und sofort in eine weitere (neue) Gießschiene gegeben. Das Cappel wurde nun 0,8 cm nach oben gezogen, wobei streng darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen zwischen Separations- und Cappel befanden. Sodann wurde die Gießschiene entfernt und die restliche Gellösung am Röhrchenende vorsichtig mit Kimwipes® entfernt. Durch das Hochziehen der Gellösung um weitere 0,5 cm entstand am unteren Ende des Röhrchens ein kleiner Luftspalt. Das Gel wurde nun 25 min bei Raumtemperatur polymerisiert, woraufhin die Fäden entfernt werden konnten. Idealerweise wurden die Gele bereits 3 Tage vor dem 1D-Lauf hergestellt, um genügend Zeit zum vollständigen Auspolymerisieren zu gewährleisten. Um eine Dehydratation der Gelmatrix während dieser Zeit zu vermeiden, wurde je ein Tropfen doppelt destilliertes Wasser in jede der beiden Öffnungen eines Röhrchens gegeben. Danach wurden die Enden mit Parafilm M® (Pechiney Plastic Packaging, Neenah, WI, USA) versiegelt, um das Verdunsten des Wassers zu verhindern. Bei 1D-Röhrchen mit 1,5 mm Durchmesser wurden für 4 Röhrchen die doppelten Mengen an Separations- und Cappel verwendet wie für 5 Röhrchen mit einem Durchmesser von 0,9 mm.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Separationsgels

Komponente	Stammlösung	Lösung	Endkonzentration
Acrylamid ^(a)	3,5 g	10 ml	3,5 % (w/v)
PDA ^(a)	0,3 g in 20 ml		0,3 % (w/v)
Carrier-Ampholyt-Mix ^(b)		5 ml	4 % (v/v)
Harnstoff ^(a)		27 g	54 % (w/v) = 9 M
Glycerin	14,3 g in 50 ml	8,75 ml	5 % (w/v)
TEMED ^(a)	60 µl	5 ml	0,06 % (v/v)
Persulfat	0,08 g in 10 ml	50 µl ^(c)	0,02 % (w/v)

^(a)Acrylamid, PDA (Piperazindiacrylamid), TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) (Biorad, Hercules, CA, USA) Für die Gellösung wurde Harnstoff größtmöglicher Reinheit verwendet.

^(b)Der Carrier-Ampholyt-Mix besteht aus einem Teil Servalyte pH 2,0 bis 11,0 (Serva, Heidelberg, Deutschland), einem Teil Pharmalyte pH 3,5 bis 10,0, drei Teilen Pharmalyte pH 4,0 bis 6,5, zwei Teilen Pharmalyte pH 5,0 bis 8,0 und einem Teil Pharmalyte pH 6,5 bis 9,0 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt. Das Endvolumen der Gellösung betrug 48,75 ml; jedes Aliquot enthielt 1950 µl

^(c)Die Zugabe erfolgte zu einem 1950 µl-Aliquot des Trenngels.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Cagels

Komponente	Stammlösung	Lösung	Endkonzentration
Acrylamid	6,0 g	4,4 ml	12 % (w/v)
PDA	0,065 g in 10 ml		0,13 % (w/v)
Carrier-Ampholyt-Mix ^(a)		2,2 ml	4 % (v/v)
Harnstoff		11,88 g	54 % (w/v) = 9 M
Glycerin	14,3 g in 50 ml	3,85 ml	5 % (w/v)
TEMED	60 µl	2,2 ml	0,06 % (v/v)
Persulfat	0,08 g in 10 ml	20 µl ^(b)	0,02 % (w/v)

^(a)Die Komponenten des Carrier-Ampholyt-Mixes sind der Legende zu Tabelle 2 zu entnehmen. Alle Lösungen wurden unter Verwendung von doppelt destilliertem Wasser hergestellt. Das Endvolumen der Gellösung betrug 21,45 ml; jedes Aliquot enthielt 780 µl.

^(b)Die Zugabe erfolgte zu einem 780 µl-Aliquot des Cagels.

2.4.1.2 Auftrag der Proben und IEF-Lauf

Zuerst eine Übersicht der benötigten Chemikalien:

1. Kathodenpuffer: 5 % (v/v) Ethylendiamin (Merck-Suchardt, Hohenbrunn, Deutschland), 9 M Harnstoff (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 5 % (w/v) Glycerin in doppelt destilliertem Wasser
2. Schutzlösung: 6 g Harnstoff und 1 g Glycerin gelöst in 19 ml doppelt destilliertem Wasser. Von dieser Lösung wurden 7,6 ml mit 0,4 ml Servalyte pH 2,0 bis 4,0 vermischt und nach Aliquotierung in Portionen zu 50 µl bei – 80 °C gelagert.
3. Anodenpuffer: 7,27 % (v/v) Phosphorsäure (ortho-Phosphorsäure 85 %; Merck, Darmstadt, Deutschland) und 3 M Harnstoff in doppelt destilliertem Wasser
4. Äquilibriumspuffer: 125 mM TRIZMA[®]Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 40 % (w/v) Glycerin, 3 % (w/v) Sodiumdodecylphosphat (SDS) (99 % Reinheit; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 5 % (w/v) DTT

Für den Lauf wurde eine IEF-Elektrophoresekammer verwendet (Wita, Berlin, Deutschland), in die 5 Gelröhrchen mit dem Cagel nach unten eingespannt wurden (2 Röhrchen HD, 2 Kontrolle, 1 Reserve). In die unten befindliche Kathodenkammer wurde 400 ml Kathodenpuffer gefüllt. Dieser wurde auch dazu verwendet, die 0,5 cm langen Aussparungen vor dem Cagel in den 1D-Röhrchen luftblasenfrei aufzufüllen. Daraufhin wurden die Röhrchen in die Lösung gestellt und das obere Ende mit schmalen Filterpapierstreifen trockengetupft. Es wurde nun eine 2 mm dicke Schicht Sephadex (Sephadex-G-200

Superfine, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) auf das obere Ende des Röhrchens aufgetragen. Das Sephadex wurde zuvor 5 Stunden bei 90 °C in doppelt destilliertem Wasser quellen gelassen, anschließend mit 25 % (w/v) Glycerinlösung gewaschen und schließlich mit 9 M Harnstoff, 70 nM DTT und 2 % (v/v) Carrier-Ampholyt-Mix (siehe Tabelle 2, Legende) vermischt. Sephadex verhindert Proteinaggregationen und –präzipitationen auf der Gelmatrix, was vor allem zu Beginn des 1D-Laufs von großer Bedeutung ist, wenn sich nach Probenauftrag am oberen Ende des Gels Proteine in hoher Konzentration und Menge befinden. Auf diese Schicht wurden die Proteinproben mit Hilfe von Hamilton[®]-Spritzen (10 µl; Hamilton, Bonaduz, Schweiz) aufgetragen. Für Gehirnprouben wurden gewöhnlich 5 µl Probe mit einer Proteinkonzentration von sehr konstanten 20 µg/ µl (100 µg) appliziert. Zum Schutz vor Präzipitation durch den sauren Anodenpuffer wurde auf die Proben eine 0,5 cm dicke Schicht Schutzlösung gegeben. Das restliche Röhrchen wurde mit Anodenpuffer gefüllt (2,7 cm). Das vorbereitete Volumen betrug 500 µl. Mit diesem wurde die Anodenkammer befüllt. Durch Verbinden der oberen Kammer mit der Anode und der unteren mit der Kathode des Spannungsgerätes (EPS 3500XL; Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurde der 1D Lauf gestartet. Es wurde eine schrittweise Spannungszunahme programmiert bei einer Gesamtlauzeit von 25 h 40 min bei Raumtemperatur. Die Spannungseinstellungen erfolgten im Einzelnen wie folgt: 1 h bei 100 V, 1 h bei 300 V, 23 h bei 1000 V, 30 min bei 1500 V und 10 min bei 2000 V. Als Maximalstromstärke wurde ein Wert von 10 mA festgesetzt bei einer Maximalleistung von 10 W. Nach dem Lauf wurden die Gele abgemessen, da diese während des Laufes schrumpfen und mittels eines Nylonfadens in den Äquilibrierungspuffer ausgestoßen, der zuvor auf Gelvorratsleisten aufgebracht wurde. Zuvor wurde der Äquilibrierungspuffer 30 min bei 30 °C aufgetaut. Beim Ausstoßen wurde die saure Hälfte (pH 3,5 bis 6,0) von der basischen Hälfte (pH 6,0 bis 9,5) mit Hilfe einer scharfen Pinzette abgetrennt. Die wichtigste Funktion der Äquilibrierung ist es, soviel wie möglich proteinassoziierten Harnstoff durch SDS zu ersetzen. Die Gelvorratsleisten wurden nun bei -80 °C mindestens über Nacht gelagert.

2.4.2 Zweite Dimension: Großgel-SDS-PAGE

Durch Verwendung von SDS, welches die Eigenladung von Proteinen überdeckt, können diese nun in einem zweiten Elektrophoreselauf nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch Aufspalten von Wasserstoffbrücken kommt es in diesem Schritt auch zur Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Zum Aufspalten von Disulfidbrücken werden reduzierende Verbindungen wie DTT verwendet. Nach dem Gießen

der 2D-Gele wird das 1D-Gel aufgetragen. Daraufhin erfolgt die elektrophoretische Auftrennung und zum Abschluss die Fixierung der Proteine vor der Silberfärbung.

2.4.2.1 Durchführung der SDS-PAGE

An Reagenzien wurden verwendet:

1. SDS-PAGE-Gellösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 4)
2. Ammoniumpersulfatlösung: 1,28 % (w/v) zum beschleunigten Polymerisieren der Gellösung
3. Spüllösung: 375 mM TRIZMA[®]Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) sowie 0,1 % (w/v) SDS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
4. Anodenpuffer (im unteren Pufferreservoir der Elektrophoreseeinheit Desavor VA 300, Desaga, Deutschland): pH 8,7, 25 mM TRIZMA[®]Base, 192 mM Glyzin (Serva, Heidelberg, Deutschland), 0,1 % (w/v) SDS gelöst in deionisiertem Wasser
5. Kathodenpuffer: gleiche chemische Zusammensetzung wie Anodenpuffer, nur erfolgte die Lösung in doppelt destilliertem Wasser unter Zugabe von 500 µl Bromphenolblau als Marker (50 mg Bromphenolblau (Biorad, Hercules, CA, USA) gelöst in 150 ml doppelt destilliertem Wasser)
6. Agaroselösung: 1 % (w/v) Agarose (Biorad, Hercules, CA, USA), 0,1 % (w/v) SDS und 125 mM TRIZMA[®]Hydrochlorid zum Fixieren des 1D-Gels auf dem 2D-Gel
7. Fixierlösung: 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) in doppelt destilliertem Wasser

Tabelle 4: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele

Komponente	Stammlösung	Lösung	Endkonzentration
Acrylamid 4× ^(a)	498 g +		15 % (w/v)
Bisacrylamid ^(a)	6,64 g in 1660 ml	1660 ml	0,2 % (w/v)
TEMED	960 µl +		0,03 % (v/v)
SDS	3,2 g +		0,1 % (w/v)
TRIZMA [®] Base	110,408 g +		375 mM
TRIZMA [®] Hydrochlorid	45,44 g in 1400 ml	1400 ml	375 mM
Persulfat	6,4 g in 500 ml	4,5 ml	0,08 % (w/v)

^(a) Acrylamid 4× und Bisacrylamid (Serva, Heidelberg, Deutschland). Aliquots von 67,5 ml wurden aus der hergestellten Gellösung abgefüllt und bei -20 °C gelagert. Kurz vor dem Gießen des SDS-Gels wurden 4,5 ml der Persulfatlösung zugegeben, um die Gelpolymerisation zu starten. Für die Herstellung aller Lösungen wurde doppelt destilliertes Wasser verwendet. Das Endvolumen der Gellösung betrug 3000 ml. Vor dem Aliquotieren

erfolgte die Zugabe des Ionenaustauschers Amberlite® IRN-150 (18 g/l; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), um unvernetzte Acrylamidmonomere zu entfernen.

Die Standardgröße der eingesetzten Acrylamidgele betrug 28 cm (Trennlänge) × 23,2 cm (Breite) × 0,75 mm bzw. 1,0 mm (Dicke), wobei die dünneren Gele für die quantitative Gelauswertung verwendet wurden, wohingegen die dickeren der Spotidentifizierung dienten. Im folgenden Abschnitt wird die praktische Durchführung der Großgel-SDS-PAGE erläutert. Zunächst wurde die Gelkassette vorbereitet. Geeignete Glasplatten wurde hierzu mit einem am Rand mit Silikonpaste (GE Bayer Silicones, Baysilone Paste, Bayer, Leverkusen, Deutschland) versehenen Abstandshalter übereinandergelegt. Der so entstandene Abstand ist mit der resultierenden Geldicke identisch, die je nach Anwendung variiert werden konnte (siehe Kapitel 2.4.1.). Plastikklappen an der Außenseite der Glasplatten dienten zur Fixierung und Befestigung. Die einsatzbereite Gelkassette wurde auf einem Gießständer befestigt. Dieser besitzt eine Zufuhrmöglichkeit für Glycerin und dichtet die Gelkassette nach unten hin ab. Nun erfolgte wie oben beschrieben die Zugabe von Ammoniumpersulfat zur Gellösung (Anstoß der Polymerisierung), woraufhin diese zügig von oben in die Gelkassette gegossen wurde. Kleinere Luftblasen wurden mit Hilfe eines langen Edelstahldrahtes entfernt. Daraufhin erfolgte die Unterschichtung des Gels mit 1,2 ml (Spotdetektion) oder 2,4 ml (Spotidentifikation) einer 40 %-igen (w/v) Glycerinlösung über die Füllhilfe des Gießständers. Dadurch entstand nach Polymerisation des Gels im unteren Bereich der Gießform ein gleichmäßiger Auftragsspalt für das 1D-Gel. Nach einer Polymerisationszeit von 25 min wurde die Gelkassette auf den Kopf gestellt, die Glycerinlösung abgeschüttet und die Geloberfläche mit Spüllösung gereinigt (siehe oben). Im Anschluss wurde der ca. 0,5 cm hohe und mit Spüllösung gefüllte Spalt mit Parafilm M[®] versiegelt und die Gele zum weiteren Auspolymerisieren 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Geloberfläche erneut gespült und versiegelt. Danach wurden die Gele über Nacht bei 4 °C im Gießständer gelagert, um eine gleichmäßige endgültige Auspolymerisierung zu gewährleisten. Am nächsten Tag erfolgte das Auftragen des 1D-Gels. Nach Entfernen der Spüllösung wurden die 1D-Gele von der Lagerungsschiene unter Zuhilfenahme eines gebogenen Drahtes auf die SDS-PAGE-Gele zwischen die Glasplatten transferiert. Anschließend erfolgte die Fixierung des 1D-Geles mit Agaroselösung, um ein „Aufschwimmen“ während der Pufferzugabe in die obere Kammer oder während des 2D-Laufes zu verhindern. Daraufhin wurde die Elektrode mit dem Reservoir für den oberen Laufpuffer an die Gelkassette angebracht. Nun erfolgte die Zugabe des Anodenpuffers in die Anodenkammer (untere Kammer), woraufhin die gesamte Vorrichtung in die Elektrophoreseeinheit eingebracht

wurde. Sodann wurde die obere Elektrode (Kathode) mit Puffer befüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit Hilfe von Spannungsgeräten (EPS 3500XL, Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) in der Elektrophoreseeinheit. Zu achten war dabei auf eine konstante Kühlung von höchstens 15 °C. Wenn das 2D-Gel zu warm wird, erfolgt keine saubere Auftrennung, und die Proteinspots sind nicht scharf fokussiert. Die Anfangsstromstärke betrug 65 mA für analytische 1D-Gele mit 0,9 mm Innendurchmesser und 130 mA für präparative 1D-Gele mit 1,5 mm Innendurchmesser. Nach 15 min wurde die Stromstärke auf 95 mA für analytische Gele erhöht (respektive auf 150 mA für präparative). Die anfängliche niedrige Stromstärke diente dem vorsichtigen Transfer der Proteine vom 1D-Gel in das SDS-PAGE-Gel. Sobald die Bromphenolbande eine etwa 2 cm oberhalb der unteren Kante der Glasplatten befindliche Markierung erreicht hatte, wurde der Lauf beendet. Nach Ende der Elektrophorese wurden die Glasplatten durch Einführen eines Keils voneinander getrennt und die Gele vorsichtig in die Fixierlösung überführt. Die sofortige Fixierung diente der Verhinderung der Proteindiffusion im Gel, die sich auch nach Ende des Laufs fortsetzt und die Trennschärfe unter Umständen negativ beeinflusst.

IEF (1D)

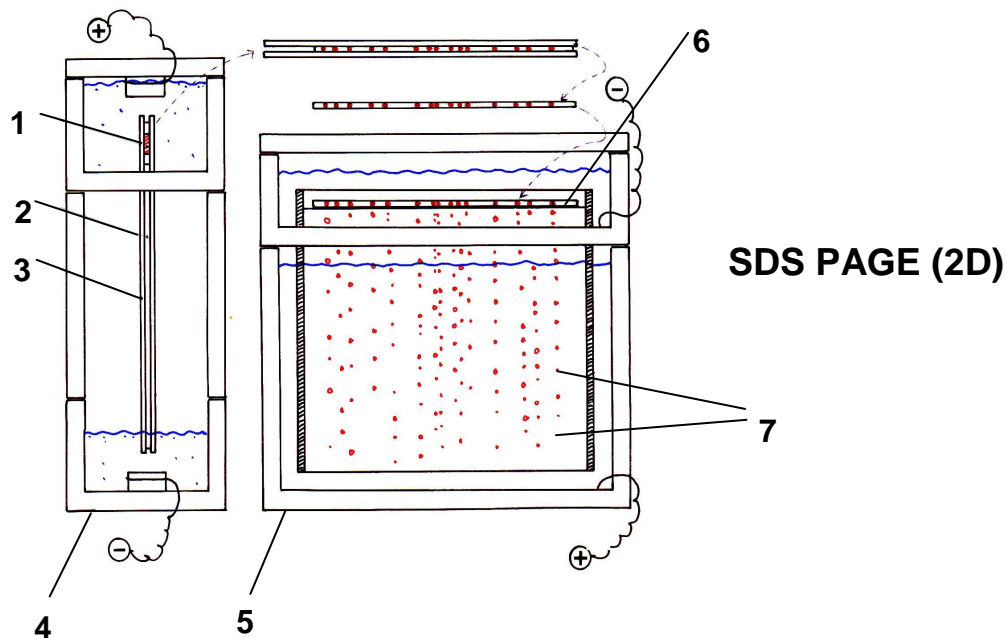


Abbildung 1: 2D-Großelektrophorese, erste (1D) und zweite (2D) Dimension

1. Probe auf IEF-Gel; 2. IEF-Gel; 3. Glasröhrchen für die 1D; 4. Kammer für die 1D; 5. Kammer für die 2D; 6. IEF-Gel (1D) auf dem SDS-PAGE-Gel (2D); 7. jeweils zwei Gele pro 2D-Kammer

2.5 Anfärbung der Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Arten von Silberfärbungen verwendet: zum einen die analytische Silberfärbung zur Feststellung von quantitativen Spotunterschieden, zum anderen die Silberfärbung zur Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie. Die analytische Färbung zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität mit einer Nachweisgrenze von etwa 2 ng aus. Sie kann nicht zur Massenspektrometrie verwendet werden, da das zur Inkubation verwendete Glutaraldehyd die Proteine unumkehrbar quervernetzt und modifiziert. Dagegen ist die Silberfärbung für die Spotidentifizierung massenspektrometrisch verträglich aber schlecht zu quantifizieren, da Proteine während der Färbung aus der Gelmatrix austreten können. Prinzipiell beruht die Silberfärbung auf der Komplexbildung von Ag^+ -Ionen mit bestimmten Aminosäureresten der Proteine (Glutamin-, Cystein- und Asparaginresten) und anschließender Reduktion der Ag^+ -Ionen zu metallischem Silber durch Zugabe reduzierender Agenzien (Natriumcarbonat).

2.5.1 Durchführung der Silberfärbung zur Spotdetektion

Auch hier eine kurze Übersicht der benötigten Reagenzien:

1. Fixierlösung: Herstellung siehe 2.4.2.1.
2. Inkubationslösung: 30 % (v/v) Ethanol, 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd (Glutaraldehydlösung 25 %, Merck, Darmstadt, Deutschland), 4,1 % (w/v) Natriumacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
3. Silbernitratlösung: 0,1 % (w/v) Silbernitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,01 % (v/v) Formaldehyd (Formaldehydlösung mind. 37 % Merck, Darmstadt, Deutschland)
4. Vorentwickler: 2,5 % (w/v) Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
5. Entwicklerlösung: 2,5 % (v/v) Natriumcarbonat und 0,01 (w/v) Formaldehyd
6. Stopplösung: 0,05 M Titriplex® (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,02 % (w/v) Thimerosal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Zuerst wurden die 2D-Gele für mindestens zwei Stunden oder über Nacht in der Fixierlösung inkubiert, dann für weitere zwei Stunden unter permanentem Schütteln in die Inkubationslösung verbracht. Anschließend wurden die Gele zwei mal 20 min in je 2 l doppelt destilliertem Wasser gewaschen, wonach eine 30-minütige Inkubation in 1 l Silbernitratlösung erfolgte. Nach kurzem Abwaschen mit 1 l doppelt destilliertem Wasser wurden die Gele

für 45 s mit 1 l Vorentwickler behandelt, um den Großteil des immer noch in Lösung befindlichen Silbers auszufällen, worauf sich die eigentliche Entwicklung mittels Entwicklerlösung anschloss. Die Entwicklungszeit war stark von der Menge an aufgetragenem Protein abhängig, wobei mit Hilfe eines Referenzgels die Farbintensität der unterschiedlichen Gele aufeinander abgestimmt wurde. Beendet wurde der Entwicklungsprozess nach Entfernen der Entwicklerlösung durch die Zugabe der Stopplösung. Zur Auswertung und Archivierung der 2D-Gele wurden diese getrocknet. Eine perforierte Metallplatte in der Größe eines Gels wurde dazu in voller Fläche mit Blottingpapier ausgelegt und mit Wasser befeuchtet. Das 2D-Gel wurde von beiden Seiten mit Zellophanfolie (Alba-Einmachhaut, Gehring & Neidweiser GmbH, Bielefeld, Deutschland) bedeckt. Das 2D-Gel wurde nun mit einer vorbereiteten Metallplatte abgedeckt und in einen auf ca. 80 °C vorgeheizten Trockenschrank (Memmert-Wärmeschrank UL 60, Karow GmbH, Berlin, Deutschland) verbracht. Dieser war an eine Vakuumpumpe (Jet-1 Automatic, Genser Scientific Instruments, Rothenburg, Deutschland) angeschlossen, welche das überschüssige Wasser aus dem Gel absaugte. Nach ca. 2 h waren die Gele getrocknet und konnten in großen C3-Umschlägen aufbewahrt und gescannt bzw. archiviert werden.

2.5.2 Durchführung der Silberfärbung zur Spotidentifizierung mittels Massenspektrometrie

Hierzu wurde das modifizierte Färbeprotokoll nach Heukeshoven verwendet [128].

Die benötigten Reagenzien waren:

1. Fixierlösung: Herstellung siehe 2.4.2.1.
2. Ethanollösung: 20 % (v/v)
3. Natriumthiosulfatlösung: 0,02 % (w/v), (Sigma, St. Louis, MO, USA)
4. Silbernitratlösung: 0,1 % (w/v), (Merck, Darmstadt, Deutschland)
5. Spüllösung: 2,5% (w/v) Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
6. Entwicklerlösung: 2,5 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,02 % (v/v) Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,025 % (w/v) Thimerosal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
7. Stopplösung: 18,5 g/l Titriplex (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Auch hier wurden die 2D-Gele zunächst für mindestens 2 h in der bereits beschriebenen Fixierlösung aufbewahrt. Im Anschluss wurde zunächst 10 min mit Ethanollösung inkubiert, danach noch 1 min in Natriumthiosulfatlösung. Als nächstes wurden die Gele 2 mal 1 min mit doppelt destilliertem Wasser gespült, anschließend erfolgte eine sofortige Inkubation für

30 min in Silbernitratlösung. Wie bereits erwähnt ist hier das Fehlen des Glutaraldehydes von entscheidender Bedeutung, da dieses die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine unmöglich machen würde. Nach diesem Schritt wurden die 2D-Gele erst 30 s in doppelt destilliertem Wasser gespült, dann 1 min in Spüllösung. Die eigentliche Entwicklung erfolgte über 2 bis 10 min in der Entwicklerlösung. Die Entwicklung wurde anschließend durch Zugabe der Stopplösung über 20 min gestoppt. Die Gele werden bei dieser Färbemethode nicht getrocknet, sondern in durchsichtige Plastikfolie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

2.6 Proteinisoformen auf dem 2D-Gel

Die mit Hilfe der Großgel-2D-Elektrophorese dargestellten Proteine repräsentieren nur einen Ausschnitt aus dem Proteom der Zelle, das wesentlich größer ist. Als Proteom bezeichnet man die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle. Die Auflösungsgrenze der Großgel-2D-Elektrophorese liegt je nach Gewebe zwischen 5000 und 10000 Proteinisoformen (Spots), die pro analytischem Gel dargestellt werden können [126]. Es ist bekannt, dass ein Protein durch mehrere Spots auf dem 2D-Gel vertreten sein kann. In der hier verwendeten Methode werden durchschnittlich 2,2 Spots pro Protein detektiert [129].

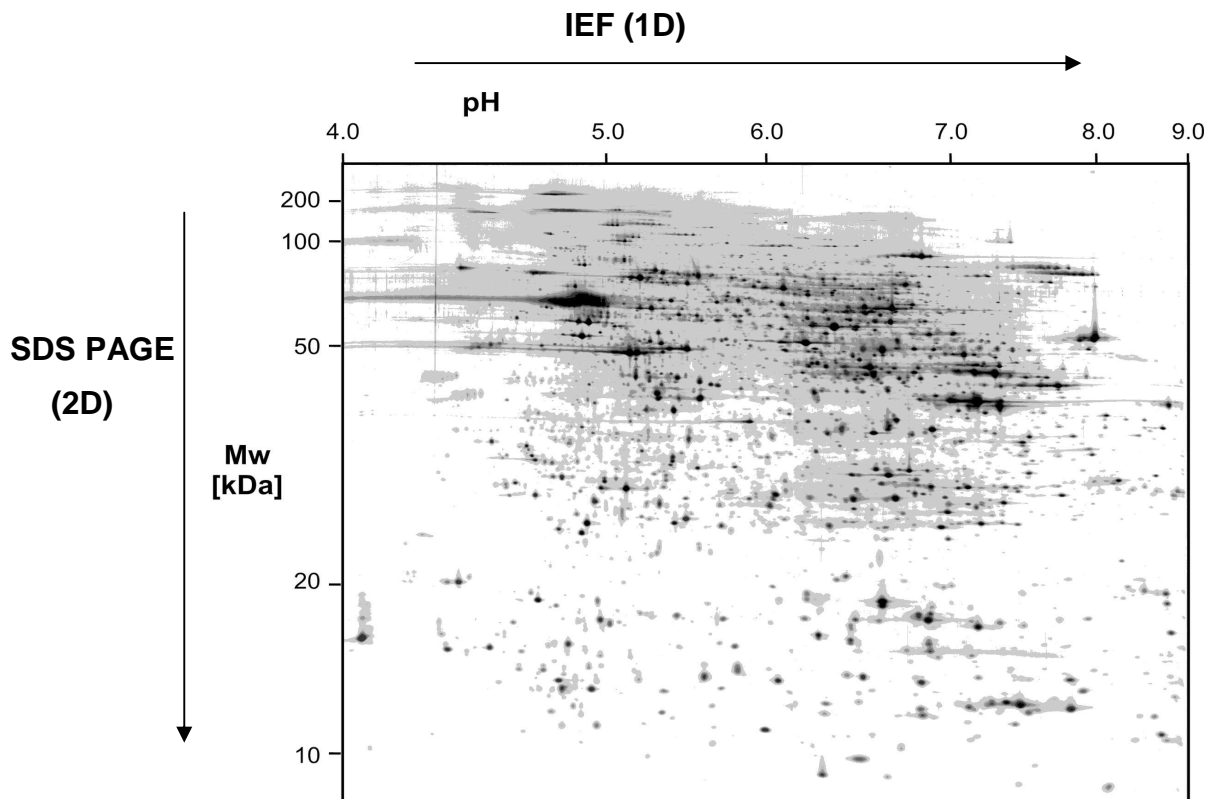


Abbildung 2: Repräsentatives analytisches 2D-Gel des Striatums der Ratte

Die Trennrichtungen der IEF und der SDS-PAGE sind mit den jeweiligen pH- und Molekulargewichtsbereichen (Mw) angegeben. Proteinisoformen sind nach der analytischen Silberfärbung als Spots auf dem Gel erkennbar.

Methodenbedingt erscheinen nur Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 9 kDa und 200 kDa auf dem 2D-Gel, da kleinere Proteine das Gel während des 2D-Laufs verlassen und größere nicht vom 1D-Gel ins 2D-Gel übergehen. Darüber hinaus besteht methodenbedingt ein Bias zu Gunsten der hydrophilen Proteine, vermutlich weil die hydrophoben zwischen 1D- und 2D-Lauf verstärkt präzipitieren [127].

2.7 Softwaregestützte Spotevaluierung mittels DELTA2D

Die 2D-Gele zur quantitativen Analyse wurden zuerst mit 16 Bit Graustufen und 300 dpi eingescannt. Im Anschluss daran wurden die Proteinspotmuster mit Hilfe der DELTA2D – Visualisierungssoftware Version 3.5 (Decodon, Greifswald, Deutschland) ausgewertet. Hierbei wurden die eingescannten Gele mit Hilfe des „exact“-Modus von DELTA2D miteinander „gematcht“ und im Anschluss daran über den „union“-Modus ein Fusionsgel generiert, welches als Summenbild aller sichtbaren Spots aller 2D-Gele in einem Projekt angesehen werden kann. Die Spotdetektion wurde nur auf dem Fusionsgel durchgeführt. Die Einstellungen für Hintergrund, durchschnittliche Spotgröße und Sensitivität erfolgten aufgrund von automatisch von der Software ermittelten und optimierten Werten. Auf einem Fusionsgel waren somit ca. 2000 unterschiedliche Proteinspots/Proteinisoformen sichtbar. Jeder Isoform wurde von der Software eine eigene Identifizierungsnummer zugewiesen. Vom Fusionsgel wurden dann alle Spots auf die anderen Gele im Projekt übertragen. Die einzelnen Spots wurden nach relativer Spotintensität/Spotvolumen [%] miteinander verglichen, wobei die Hintergrundfärbung von der Software automatisch abgezogen wurde. Die so gewonnenen Werte wurden zur statistischen Analyse in Excel exportiert. Die Datensätze wurden mittels gepaartem zweiseitigen Student's T-Test ausgewertet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ angenommen.

2.8 Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

Im Wesentlichen werden zwei Arten von Massenspektrometrie verwendet. Einerseits die Matrix-assistierte-Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS), andererseits die Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie (ESI-MS). Für die Proteinidentifizierung in dieser Arbeit kamen beide Formen zum Einsatz.

2.8.1 Prinzip der MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Bei dieser Methode werden Proteine in Kristalle einer Matrixsubstanz eingebettet, die über ein hohes UV-Absorptionsvermögen verfügt. Das Proben-Matrix-Gemisch wird nun mit einem gepulsten Laserstrahl gezielt beschossen. Dadurch gibt die Matrixsubstanz Protonen an die Probenmoleküle ab, wodurch diese eine positive Ladung erhalten. Die geladenen Probenmoleküle bzw. Ionen treten nachfolgend in die Gasphase des Hochvakuums im Massenspektrometer über. Die Probenmoleküle (Ionen) werden nun erst in einem elektrischen Feld beschleunigt und durchfliegen dann auf dem Weg zum Detektor eine feldfreie Strecke. Durch die individuellen Masse/Ladungsverhältnisse der Probenmoleküle (Ionen) resultieren unterschiedliche Geschwindigkeiten und damit Flugzeiten, die mit Hilfe des Flugzeitanalysators (TOF; Time of flight) bestimmt werden können.

2.8.2 Durchführung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zuerst werden die Proteinspots manuell ausgestantzt. Als nächstes werden die ausgestochenen Spots gewaschen, gefolgt vom enzymatischen Proteinverdau. Dann erfolgt die Einbettung der Proteine in eine Matrix und schließlich die Bestimmung ihrer Identität im Massenspektrometer.

Die Proteinspots wurden mit einem Durchmesser von etwa 2 mm mit Hilfe der GelPal manual spot excision unit (Genetix, New Milton, UK) aus den MS-kompatiblen Gelen ausgestantzt und in Wellplatten mit 96 Well, sog. ZipPlates[®] (Millipore, Bedford, MA, USA), überführt. Der sich nun anschließende Waschvorgang diente der Entfernung störender Chemikalien. Zunächst wurden 100 µl einer Lösung bestehend aus 5 % (v/v) Acetonitril (ACN, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) hinzugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand mit Hilfe einer Vakuumstation (Millipore[®], Bedford, USA) wieder abgesaugt. Im Anschluss wurde ein zweimaliger Waschvorgang mit 100 µl einer Lösung aus 50 % (v/v) Acetonitril (ACN, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) durchgeführt, es folgte eine Inkubationszeit von je 15 min bei Raumtemperatur mit zwischenzeitlichem Absaugen. In einem letzten Schritt des Waschvorgangs wurden 200 µl 100 % ACN hinzugegeben, weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abgesaugt. Nun wurde ein enzymatischer Verdau mit der Protease Trypsin durchgeführt, bei dem durch Spaltung der Proteine an spezifischen Stellen (hinter Lysin und Arginin) Peptide erzeugt werden. Es wurden 10 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) hinzugegeben,

welches 10 ng/μl modifiziertes Trypsin vom Schwein (Promega WI, USA) enthielt. Die so angestoßene Proteinverdauung wurde über insgesamt 3 h bei 37 °C durchgeführt, wobei nach 30 min noch 5 μl vorgewärmtes (37 °C) Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) beigelegt wurde. In einem nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 8 μl 100 % ACN. Nach einer weiteren Inkubation über 15 min bei 37 °C wurden 130 μl 0,2 % Trifluoressigsäure (TFA, Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diese Schritte erfolgt eine Bindung der Peptide an das C₁₈-Material der ZipPlates[®]. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Wasch – und Entsalzungsschritt mit 100 μl TFA. In einem letzten Arbeitsschritt wurden die Peptide durch Zugabe von 15,5 μl 50 % (v/v) ACN in 0,1 % (v/v) TFA eluiert und in bindungschemisch inerten Multichem-Mikrotiterplatten (MTP, Whatman, Brentford, UK) gesammelt. Die Aufbewahrung erfolgte nach Versiegelung mit Parafilm bei – 20 °C.

Es schloss sich nun die Präparation der Matrix an. Als Matrix diente 2,5-Dihydroxy-Benzoessäure (Bruker, Bremen, Deutschland) mit einer Konzentration von 3,3 g/l, die in zwei Teilen TFA und einem Teil ACN gelöst war. Es wurden nun 1,5 μl des Peptidextrakts mit 1,5 μl der Matrixlösung vermischt und dann auf 800 μm ANCHORChip[®]-MALDI-Targets (Bruker, Bremen, Deutschland) aufgebracht, welche zur Analyse in das MALDI-TOF-Massenspektrometer (Bruker Reflex IV, Bremen, Deutschland) gegeben wurden. Dort wurden wie beschrieben die Flugzeiten der Proteine detektiert. Die gewonnenen Massenspektren wurden mit Hilfe der XMASS/NT 5.1.16-Software (Bruker, Bremen, Deutschland) in korrelierende Massenlisten transferiert. Im Anschluss wurden diese Listen über die Suchmaschine Mascot Daemon 2.1.0 (Matrix Science, London, UK, www.matrixscience.com) mit der Proteinsequenzdatenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov/) verglichen. Hierbei wurden die Analyseparameter für die Suchmaschine wie folgt eingestellt: Peptidtoleranz: 100 ppm; mögliche Variationen: Oxidation am Methionin und Propionamid am Cystein. Die Suche wurde taxonomisch auf *mammalia* eingeschränkt. Die Proteine wurden nach dem Mascot-MOWSE-Score (p<0,05), der Anzahl gefundener Peptide pro Protein und der Übereinstimmung der Proteinsequenz evaluiert.

2.8.3 Prinzip der ESI-Massenspektrometrie

Bei der ESI-MS werden die Proteine durch Versprühen in feinste Tröpfchen in die Gasphase verbracht (Elektrospray-Ionisation). Dabei wird die Probenlösung unter Atmosphärendruck durch eine Kapillare gesprüht. Schwache Säuren dienen als Ionisierungshelfer, als Sprühhelfer kommen organische Lösungsmittel zum Einsatz. Mit Hilfe von

Massenanalytoren wird das Masse/Ladungsverhältnis der Probenmoleküle bestimmt. Durch Koppelung der ESI-MS mit der Flüssigkeitschromatographie (LC) können auch komplexe Proteingemische analysiert werden. Dabei dient die Chromatographie der Auftrennung und die ESI-MS der Identifizierung/Quantifizierung der Substanzen.

2.8.4 Durchführung der ESI-Massenspektrometrie

Auch hier folgte auf das manuelle Ausstanzen der Proteine der tryptische In-Gel-Verdau, wobei das gleiche Protokoll wie für die MALDI-TOF-MS verwendet wurde (siehe Kapitel 2.8.2.). Die tryptischen Fragmente wurden daraufhin mittels nanoflow high-performance liquid chromatography (nanoHPLC; Dionex/LC Packings, Amsterdam, Niederlande)/ESI-MS und –MS/MS in einem LCQ-Deca-XP-Massenspektrometer (Thermo Finnigan, Waltham, MA, USA) analysiert. Dabei war die nano-HPLC direkt an die ESI-MS gekoppelt (siehe Kapitel 2.8.3.). Zur Chromatographie wurde eine PepMap-100-C-18-Vorsäule (5 µm, 100 Å, 300 µm Innendurchmesser × 5 mm; Dionex/LC Packings) verwendet, die unter Verwendung von 0,1 % (v/v) TFA (Flussrate 20 µl/min) mit Proteinprobeneluat zu je 15 µl beladen wurde. Die Peptide wurden auf einer PepMap-100-C-18-100-Säule (3 µm, 100 Å, 75 µm Innendurchmesser × 15 cm; Dionex/LC Packings) getrennt. Als Eluenten dienen 0,1 % (v/v) wässrige Ameisensäure (Eluent A) und 0,1 % (v/v) Ameisensäure gelöst in Acetonitril (Eluent B). Die Flussrate betrug 200 nl/min. Der Elutionsgradient war zu Anfang 5 % (v/v) von Eluent B und wurde im Verlauf auf 50 % (v/v) Eluent B nach 40 min erhöht. ESI-MS-Daten wurden während des gesamten LC-Laufs gewonnen. Die Extraktion der Daten erfolgte mit Hilfe des TurboSEQUENT-Algorithmus. Keratin und autolytische Trypsinfragmente wurden nachträglich mit Hilfe einer Softwareoption herausgefiltert. Alle mittels BioWorks Version 3.2 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) erstellten DTA-Files wurden in MASCOT generic format files (MGF) konvertiert. Die Massenspektren wurden unter Verwendung der MASCOT Software Version 2.1. analysiert. MASCOT durchsuchte automatisch die NCBI-Datenbank. Die Suche wurde taxonomisch auf *mammalia* eingeschränkt. Weitere Einstellungen waren: proteolytisches Enzym: Trypsin; maximale Anzahl missglückter Cleavages: 1; Massenwert: monoisotop; Peptidmassentoleranz: 0,8 Da; Fragmentmassentoleranz: 0,8 Da; variable Modifizierungen: Oxidation von Methionin, Propionamidrest am Cystein. Es wurden nur Proteine mit einem p-Wert <0,05 und mindestens zwei unabhängigen identifizierten Peptiden berücksichtigt.

2.9 Analyse der beteiligten Pathways

In einem nächsten Schritt war es nun möglich, die identifizierten Proteine bestimmten Pathways im Stoffwechsel der Zelle zuzuordnen. Grundlage der Pathway-Analyse bildeten die Gennamen (www.informatics.jax.org/) bzw. die von MASCOT ermittelten GI-Nummern. Um die Frage zu klären, ob bestimmte Pathways vermehrt Veränderungen auf Proteinebene aufweisen als andere Pathways, wurde das Programm „WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit“ (WEBGESTALT) verwendet, welches von der Vanderbilt-Universität unter <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/> kostenfrei zur Verfügung gestellt wird. Mit Hilfe der eingespeisten GI-Nummern kann hier unter der Kategorie „KEGG table and maps“ eine sogenannte KEGG-Analyse durchgeführt werden, wobei das „Gene set analysis tool“ und die „Function“-Option verwendet wurden. KEGG steht für „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ und ist eine Bioinformatikdatenbank, die Informationen zu Genen, Proteinen, Reaktionswegen und Pathways enthält. Bei der vorliegenden Untersuchung wurden folgende Parameter benutzt, um die KEGG-Tabellen zu erstellen: Reference set: „WEBGESTALT_MOUSE“, significance level: $p < 0,01$, minimum number of genes: 2. Als statistische Methode wurde der „hypergeometric test“ verwendet. Gibt man die oben genannten Parameter zusammen mit den GI-Nummern ein, erstellt das Programm eine übersichtliche Darstellung der am meisten veränderten Pathways und der an ihnen beteiligten Proteine.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines Großgel-2D-Elektrophorese-gestützten Ansatzes Einsicht in die Krankheitsdynamik der HD bei einem Rattenmodell zu gewinnen. Dabei lag der Schwerpunkt auf frühen Proteinveränderungen. Verglichen wurde das Proteom transgener Ratten mit 51 Polyglutaminrepeats im HD-verursachenden Protein Htt mit Kontroll-Ratten gleichen Geschlechts, Alters und genetischem Hintergrund.

Es wurden drei Altersstufen des Krankheitsmodells mit jeweils den gleichen Altersstufen bei gesunden Kontrolltieren verglichen. Als sehr frühe, präsymptomatische Altersstufe wurden 10 Tage alte Tiere verwendet. In diesem Alter haben die Ratten noch keinen Krankheitsphänotyp, sind also nicht von den Kontrolltieren zu unterscheiden. Im Alter von 70 Tagen (10 Wochen), der zweiten untersuchten Alterstufe, zeigen die Tiere bereits Verhaltensauffälligkeiten im Sinne einer in der Radial Maze nachweisbaren Angstreduktion, entwickeln aber noch keine motorischen Symptome. Diese Altersstufe entspricht somit einer frühen Phase der Erkrankung. Mit 465 Tagen (15,5 Monaten) stellt die dritte Altersstufe ein Beispiel für die mittlere Phase der Erkrankung dar, in der es neben kognitiven Defiziten auch zu deutlichen motorischen Dysfunktionen bei den Ratten kommt [120].

Es wurden pro Zeitpunkt fünf Probenpaare (HD versus Kontrolle) aus dem Striatum und fünf aus dem Cerebellum untersucht. Das Striatum diente als Beispiel für eine von Beginn an und stark von der Huntington-Erkrankung betroffene Gehirnregion, wohingegen das Cerebellum erst deutlich später betroffen ist.

3.1 Quantitative Auswertung der Ergebnisse

Um die drei Altersstufen, 10 Tage, 70 Tage und 465 Tage, miteinander vergleichen zu können, wurden zuerst quantitative Untersuchungen der beteiligten Proteine für beide Gehirnregionen durchgeführt. Als Grundlage hierfür diente die in Kapitel 2.7. dargestellte, computergestützte Auswertung der 2D-Gele mit Hilfe des Computerprogramms DELTA2D, Version 3.5 (Decodon, Greifswald, Deutschland). Die 2D-Gele wurden nach Auftrennung der Proteine (Proteinspots) nach Ladung und molekularer Masse digital erfasst und mit DELTA2D quantifiziert. Mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen Student's T-Test wurden statistisch signifikant veränderte Proteinspots mit Hilfe einer Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ ermittelt.

3.1.1 Frühes, präsymptomatisches Stadium zeigt bereits viele Veränderungen auf Proteinisoforbene

In Tabelle 5 und Tabelle 6 ist die Anzahl der Proteinisoformen (Spots) mit signifikantem Expressionsunterschied im Striatum und im Cerebellum für alle drei Altersstufen dargestellt. Dargestellt sind die Anzahl der Proteinisoformen mit vermehrter (↑) und verminderter (↓) Expression sowie die Gesamtanzahl der Isoformen, die sich aus der Summe der beiden genannten ergibt. Durch Addition dieser Summen ergibt sich die Endsumme, die die Gesamtanzahl aller Veränderungen in einer Gehirnregion zeigt.

Tabelle 5: Unterschiedlich exprimierte Proteinisoformen im Striatum

Alter	Proteinisoformanzahl		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
10 Tage	101	55	156
70 Tage	109	94	203
465 Tage	61	85	146
Endsumme			505

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

Tabelle 6: Unterschiedlich exprimierte Proteinisoformen im Cerebellum

Alter	Proteinisoformanzahl		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
10 Tage	44	54	98
70 Tage	110	126	236
465 Tage	85	40	125
Endsumme			459

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

Als auffälligstes Ergebnis sticht hierbei die große Anzahl veränderter Proteinisoformen im Striatum bei der jüngsten, präsymptomatischen Altersstufe von 10 Tagen ins Auge. Diese weist im Striatum mit 156 gegenüber 146 sogar mehr Veränderungen auf als die letzte Altersstufe von 465 Tagen, bei der die Tiere einen deutlichen Krankheitsphänotyp mit Verhaltensauffälligkeiten und motorischen Störungen zeigen [120]. Die Altersstufe ohne Krankheitsphänotyp zeigt also mehr Veränderungen auf Proteinisoforbenebene als die Altersstufe mit deutlich fortgeschrittenem Phänotyp. Im Vergleich zur jüngsten Altersstufe

des Cerebellums, wo sich nur 98 veränderte Proteinisoformen finden, unterscheidet sich das Striatum mit 156 Veränderungen deutlich.

Weiterhin fällt auf, dass das Striatum als stark von der Erkrankung betroffene Gehirnregion mit 505 gegenüber 459 mehr veränderte Proteinisoformen als das Cerebellum aufweist. Trotzdem ist die hohe Anzahl an Veränderungen auffällig, die sich im Cerebellum als primär nicht von der Erkrankung betroffene Gehirnregion finden. Nur in der jüngsten Altersstufe (10 Tage) zeigt das Striatum deutlich mehr Veränderungen als das Cerebellum (156 gegenüber 98). Bei der letzten Altersstufe (465 Tage) ist der Unterschied zwischen Striatum und Cerebellum mit 146 gegenüber 125 veränderten Proteinisoformen deutlich geringer, während bei der mittleren Altersstufe (70 Tage) im Cerebellum sogar mehr veränderte Proteinisoformen vorhanden sind als im Striatum (236 Cerebellum gegenüber 203 Striatum). Abbildung 3 verdeutlicht die Unterschiede grafisch.

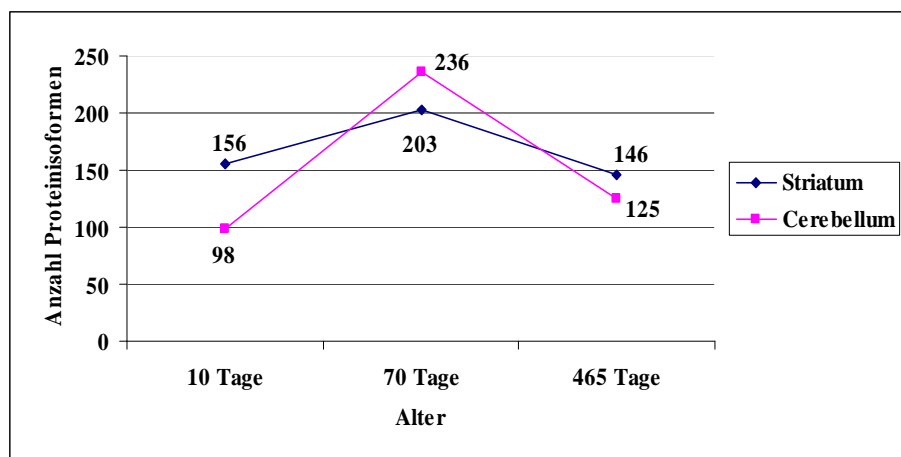


Abbildung 3: Veränderte Proteinisoformen für Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf

Die Anzahl der veränderten Proteinisoformen wurde mit Hilfe von fünf individuellen Gelpaaren mit biologischen Replikaten und dem gepaarten zweiseitigen Student's T-Test ermittelt. Gegenüberstellung der Gesamtanzahl für Striatum und Cerebellum.

Betrachtet man Abbildung 3, wird noch einmal sehr deutlich, dass die jüngste Altersstufe (10 Tage) im Striatum bereits sehr viele Proteinveränderungen aufweist, sowohl im Vergleich zu dem Zeitpunkt, an dem die Pathologie am weitesten fortgeschritten ist (465 Tage), als auch im Vergleich zur selben Altersstufe (10 Tage) beim Cerebellum. Außerdem ist deutlich erkennbar, dass im Cerebellum ab 70 Tagen ähnlich viele Veränderungen auf Ebene der Proteinisoformen zu finden sind wie im Striatum.

Um die statistischen Aussagekraft zu erhöhen, wurde eine Beschränkung von mindestens 10 % veränderter Proteinexpression eingeführt, d. h. die Proteinexpression einer bestimmten Proteinisoform musste um mindestens 10 % vermehrt oder vermindert sein, um als verändert

zu gelten. Dies konnte anhand der mit DELTA2D gewonnenen quantitativen Daten leicht ermittelt werden. Der Grenzwert von 10 % minimaler Expressionsänderung wurde bei früheren Studien [110,114] und auf Grund der langjährigen Erfahrung unseres Labors mit der Großgel-2D-Elektrophorese festgelegt.

Die so ermittelten Werte sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 7: Unterschiedlich exprimierte Proteinisoformen im Striatum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression

Alter	Proteinisoformanzahl		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
10 Tage	92	55	147
70 Tage	104	94	198
465 Tage	59	79	138
Endsumme			483

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

Tabelle 8: Unterschiedlich exprimierte Proteinisoformen im Cerebellum, mindestens 10% veränderte Proteinkonzentration

Alter	Proteinisoformanzahl		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
10 Tage	44	44	88
70 Tage	116	109	225
465 Tage	82	33	115
Endsumme			428

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

Es wird deutlich, dass der Trend bei den Proteinexpressionsänderungen auch bei einer Beschränkung von mindestens 10 % Unterschied erhalten bleibt.

Es findet sich auch hier eine auffallend hohe Anzahl veränderter Proteinisoformen bei der jüngsten Altersstufe (10 Tage) im Striatum. Mit 147 veränderten Proteinisoformen übersteigt diese Anzahl wieder die Veränderungen bei der Altersstufe des Striatums, bei der die Pathologie am weitesten fortgeschritten ist (465 Tage). Dort finden sich nur 138 Veränderungen. Wenn man Striatum und Cerebellum der jüngsten Altersstufe (10 Tage) miteinander vergleicht, ist der Unterschied erneut sehr auffällig: 147 Veränderungen im Striatum stehen nur 88 veränderte Proteinisoformen im Cerebellum gegenüber.

Deutlich wird ebenfalls wieder, dass sich im Striatum mit einer Gesamtanzahl von 483 gegenüber 428 Veränderungen im Cerebellum insgesamt mehr Unterschiede in der Expression der Proteinisoformen nachweisen lassen. Erstaunlich ist aber auch hier die große Anzahl an Veränderungen, die sich im Cerebellum findet. Die große Anzahl an Unterschieden lässt sich spätestens ab 70 Tagen beobachten. Hier übersteigt die Anzahl der Veränderungen im Cerebellum (225 veränderte Proteinisoformen) sogar diejenige im Striatum (198 veränderte Proteinisoformen). Bei der Altersstufe mit am weitesten fortgeschrittener Pathologie (465 Tage) ist die Anzahl der Unterschiede geringer (138 im Striatum gegenüber 115 im Cerebellum) als bei der mittleren Altersstufe (70 Tage). Außerdem sind hier wieder mehr Proteinisoformen im Striatum verändert. Analog zu Abbildung 3 fasst Abbildung 4 diese Ergebnisse grafisch zusammen.

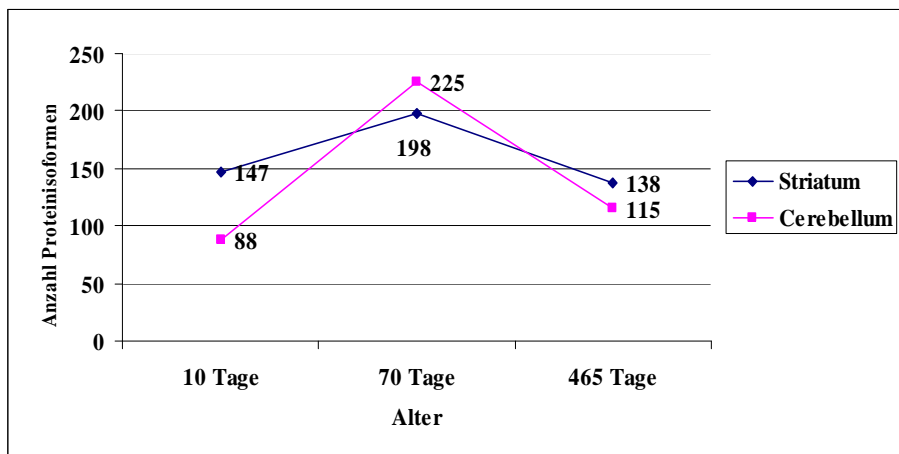


Abbildung 4: Veränderte Proteinisoformen für Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf, mindestens 10 % Expressionsänderung

Die Anzahl der veränderten Proteinisoformen wurde mit Hilfe von fünf individuellen Gelpaaren mit biologischen Replikaten und dem gepaarten zweiseitigen Students's T-Test ermittelt. Gegenüberstellung der Gesamtanzahl für Striatum und Cerebellum. Werte mit mindestens 10 % veränderter Proteinexpression.

Sowohl mit als auch ohne Beschränkung des Grades der Proteinexpressionsveränderung bestätigt sich also die Beobachtung, dass bei einem Rattenmodell für die Huntington-Erkrankung schon früh Veränderungen vor allem im Striatum zu beobachten sind. Deutlich wurde auch, dass das Cerebellum ab 70 Tagen unerwartet viele Expressionsunterschiede aufweist, die sich relativ wenig vom Striatum unterscheiden.

3.1.2 Frühe Veränderungen im Striatum bestätigen sich auch auf Ebene veränderter Gesamtproteinkonzentration

Es stellte sich nun die Frage, wie gut die Anzahl veränderter Proteinisoformen mit der Veränderung der Gesamtproteinkonzentration korreliert. Um dies zu überprüfen, wurde die Gesamtproteinkonzentration mit Hilfe der quantitativen Daten aus DELTA2D bestimmt und für alle Altersstufen grafisch und tabellarisch dargestellt (siehe hierzu Tabelle 9 und Tabelle 10 sowie Abbildung 5). Zur Ermittlung der veränderten Proteinkonzentration wurde der Mittelwert des Spotvolumens aller signifikant veränderten Spots (Proteinisoformen) pro 2D-Gel in DELTA2D errechnet. Die Endsumme gibt die Änderung der Gesamtproteinkonzentration als Summe aller drei Altersstufen einer Gehirnregion an.

Tabelle 9: Änderung der Gesamtproteinkonzentration im Striatum

Alter	Konzentrationsänderung [%]		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
10 Tage	1,97	1,08	3,05
70 Tage	3,69	2,11	5,8
465 Tage	1,59	2,04	3,63
		Endsumme	12,48

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

Tabelle 10: Änderung der Gesamtproteinkonzentration im Cerebellum

Alter	Konzentrationsänderung [%]		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
10 Tage	0,67	0,82	1,49
70 Tage	2,33	3,24	5,57
465 Tage	1,34	0,59	1,93
		Endsumme	8,99

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

Die bei Betrachtung der veränderten Anzahl der Proteinisoformen gefundenen Ergebnisse bestätigen sich im Wesentlichen auch hier. Wiederum weist das Striatum in der präsymptomatischen Altersstufe (10 Tage) eine erstaunlich hohe Zahl an Veränderungen auf. Diese ist beim Striatum mit 3,05 % veränderter Gesamtproteinkonzentration im Gegensatz zur Proteinisoformanzahl kleiner als die der Alterstufe mit der am weitesten fortgeschrittenen

Pathologie (465 Tage, 3,63 %). Betrachtet man die Veränderung der Proteinkonzentration bei 10 Tagen im Cerebellum, so ist diese mit 1,49 % deutlich geringer als im Striatum (3,05 %). Die Konzentrationsänderung im Striatum ist mehr als doppelt so groß wie im Cerebellum und der Unterschied somit noch deutlich größer als die Veränderung bei der Anzahl der Proteinisofomen.

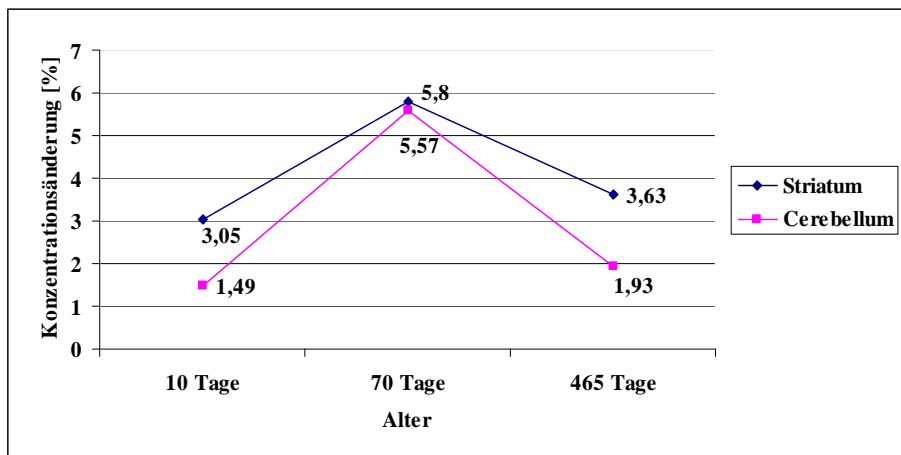


Abbildung 5: Änderung der Gesamtproteinkonzentration für Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf

Zur Ermittlung des veränderten Spotvolumens wurde der Mittelwert des Spotvolumens aller signifikanten Spots pro 2D-Gel gebildet.

Es konnte somit gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl unterschiedlich exprimierter Proteinisofomen in den meisten Fällen auch tatsächlich mit einer erhöhten prozentualen Veränderung der Gesamtproteinkonzentration einhergeht. Allerdings finden sich auch Abweichungen von dieser Beobachtung. Zum einen kehrt sich im Striatum das Verhältnis von jüngster zu fortgeschrittenster Altersstufe bei der Betrachtung der Gesamtproteinkonzentration im Vergleich zur veränderten Anzahl der Proteinisofomen um (siehe oben). Zum anderen fällt bei Betrachtung der mittleren Altersstufe (70 Tage) auf, dass das Striatum (5,8 %) nun eine größere prozentuale Veränderung als das Cerebellum (5,57 %) aufweist. Dies steht im Gegensatz zur Anzahl unterschiedlich exprimierter Isoformen, wo dieses Verhältnis umgekehrt ist.

Die Einführung einer Beschränkung von mindestens 10 % veränderter Proteinkonzentration verändert die Ergebnisse analog zu den Resultaten für die Anzahl der veränderten Proteinisofomen nicht (siehe Tabelle 11, Tabelle 12 und Abbildung 6).

Tabelle 11: Änderung der Gesamtproteinkonzentration im Striatum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression

Alter	Konzentrationsänderung [%]		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
10 Tage	1,83	0,95	2,78
70 Tage	3,57	2,11	5,68
465 Tage	1,54	1,88	3,42
Endsumme			11,88

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

Tabelle 12: Änderung der Gesamtproteinkonzentration im Cerebellum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression

Alter	Konzentrationsänderung [%]		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
10 Tage	0,67	0,7	1,37
70 Tage	2,29	2,67	4,96
465 Tage	1,25	0,53	1,78
Endsumme			8,11

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

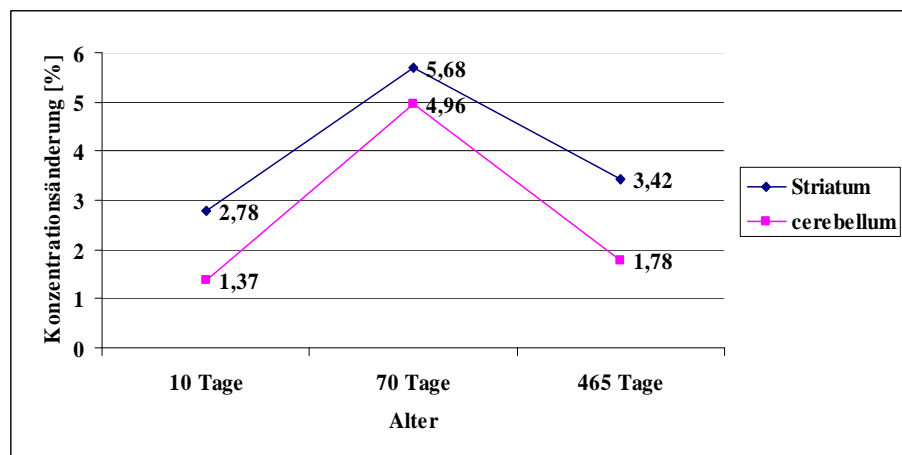


Abbildung 6: Änderung der Gesamtproteinkonzentration für Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf, mindestens 10% Expressionsänderung

Zur Ermittlung des veränderten Spotvolumens wurde der Mittelwert des Spotvolumens aller signifikanten Spots pro 2D-Gel gebildet. Gegenüberstellung der Gesamtwerte für Striatum und Cerebellum mit mindestens 10 % veränderter Proteinexpression.

Auffällig ist wiederum die stark veränderte Gesamtproteinmenge (2,78 %) bei der präsymptomatischen Altersstufe (10 Tage). Obwohl auch hier die Altersstufe mit der am weitesten fortgeschrittenen Pathologie (465 Tage) mit 3,42 % eine noch stärkere Veränderung

aufweist, sind sich beide Werte recht ähnlich. Im direkten Vergleich der jüngsten Altersstufe (10 Tage) zeigt das Striatum (2,78 %) gegenüber dem Cerebellum (1,37 %) eine um mehr als 100 % größere Veränderung.

Auch hier korrelieren somit Gesamtproteinkonzentration und veränderte Proteinisoformanzahl recht gut, obwohl einige Abweichungen auftreten (siehe oben). Das Verhältnis der veränderten Proteinkonzentration von jüngster und fortgeschrittenster Altersstufe kehrt sich beim Striatum im Vergleich zur veränderten Isoformanzahl erneut um, d. h. waren bei 10 Tagen mehr Proteinisoformen verändert als bei 465 Tagen (siehe Kapitel 3.1.1.), weist die fortgeschrittenste Altersstufe nun auf Ebene der Gesamtproteinkonzentration größere Veränderungen auf (3,42 %) als die präsymptomatische (2,78 %). Außerdem beträgt die prozentual veränderte Proteinkonzentration bei der mittleren Alterstufe (70 Tage) beim Striatum 5,68 % und beim Cerebellum 4,96 %, auch hier findet sich eine Umkehrung des Verhältnisses im Vergleich zu den unterschiedlich exprimierten Isoformen (siehe Kapitel 3.1.1.). Diese Ergebnisse werden nun im folgenden Kapitel 3.1.3 näher untersucht.

3.1.3 Ausgeprägtere Änderung der Proteinkonzentration pro veränderter Isoform im Striatum als im Cerebellum

Bei Betrachtung der Veränderungen der Proteinisoformanzahl wurde deutlich, dass sich bezogen auf die Gesamtanzahl veränderter Isoformen für alle drei Alterstufen beim Striatum mehr Veränderungen finden (505) als beim Cerebellum (459). Der prozentuale Anteil der Veränderungen im Cerebellum im Vergleich zum Striatum (wobei der Wert für das Striatum als 100 % gesetzt wurde) beträgt 90,9 % (siehe Tabelle 13), die Anzahl der Veränderungen bewegt sich also in einem sehr ähnlichen Bereich. Stellt man diesen Betrachtungen nun die Werte der veränderten Gesamtproteinkonzentration gegenüber, ergeben sich deutliche Abweichungen. Während im Striatum 12,48 % der Gesamtproteinkonzentration verändert sind, sind es beim Cerebellum nur 8,99 %. Dies entspricht nur einem Anteil von 72 % Veränderung im Cerebellum gemessen am Striatum (100 % gesetzt, siehe Tabelle 13). Die Kongruenz zwischen Striatum und Cerebellum ist also bei der Gesamtproteinkonzentration deutlich geringer (72 %) als bei Betrachtung der Anzahl veränderter Proteinisoformen (90,9 %, siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform für Striatum und Cerebellum

	Anzahl Proteinisoformen	Änderung Proteinkonzentration [%]	Veränderung pro Isoform [%]^a
Striatum	505	12,48	0,025
Cerebellum	459	8,99	0,020
Übereinstimmung Cerebellum/Striatum [%]^b	90,9	72,0	

^a Es wurde der Quotient aus veränderter Proteinkonzentration und Anzahl der Proteinisoformen ermittelt.

^b Der Wert für das Striatum wurde 100 % gesetzt.

Diese Abweichung lässt sich erklären, wenn man für das Striatum und das Cerebellum die veränderte Proteinkonzentration pro veränderter Proteinisoform ermittelt, indem man den Quotienten aus veränderter Gesamteproteinkonzentration und Gesamtanzahl veränderter Proteinisoformen ermittelt (siehe Tabelle 13). Dabei zeigt sich, dass im Striatum pro unterschiedlich exprimierter Proteinisoform die Proteinkonzentration mit 0,025 % stärker verändert ist als im Cerebellum, wo diese Veränderung nur 0,020 % beträgt. Dies bedeutet, dass sich bei Betrachtung der veränderten Gesamteproteinkonzentration das Verhältnis zwischen den beiden Gehirnregionen zu Gunsten des Striatums verschiebt.

Diese Beobachtung erklärt auch, warum sich bei der mittleren Altersstufe (70 Tage) - wenn man die Gesamteproteinkonzentration betrachtet - das Verhältnis zwischen den beiden Gehirnregionen zu Gunsten des Striatums umkehrt, während bei Betrachtung der Proteinisoformen das Cerebellum von der Zahl der Veränderungen her überwiegt (siehe Kapitel 3.1.2.).

Diese Zusammenhänge behalten auch ihre Gültigkeit bei Betrachtung der Werte, denen eine Proteinexpressionsänderung von mindestens 10 % zu Grunde lag.

Tabelle 14: Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform für Striatum und Cerebellum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression

	Anzahl Proteinisoformen	Änderung Proteinkonzentration [%]	Veränderung pro Isoform [%]^a
Striatum	483	11,88	0,025
Cerebellum	428	8,11	0,019
Übereinstimmung Cerebellum/Striatum [%]^b	88,6	68,3	

^a Es wurde der Quotient aus veränderter Proteinkonzentration und Anzahl der Proteinisoformen ermittelt.

^b Der Wert für das Striatum wurde 100 % gesetzt.

Wiederum liegt die Anzahl veränderter Proteinisoformen für Striatum (483) und Cerebellum (428) in einem sehr ähnlichen Bereich. Hier beträgt der Anteil der Veränderungen im Cerebellum gemessen am Striatum (100 % gesetzt) 88,6 %. Auch hier divergieren Striatum und Cerebellum deutlich, wenn man die veränderte Proteinkonzentration zu Grunde legt: 11,88 % im Striatum gegenüber 8,11 % im Cerebellum, was einem Anteil von 68,3 % für das Cerebellum gemessen am Striatum entspricht (siehe Tabelle 14). Der deutliche Unterschied zwischen den Übereinstimmungen lässt sich auch in diesem Fall auf die unterschiedlich veränderte Proteinkonzentration pro veränderter Proteinisoform zurückführen: sind im Striatum 0,025 % der Proteinkonzentration pro veränderter Isoform alteriert, sind es beim Cerebellum nur 0,019 % (siehe Tabelle 14). Die Werte divergieren also zu Gunsten des Striatums. Die Limitierung des Proteinexpressionsunterschiedes auf mindestens 10 % hat somit keinen Einfluss auf die relative Proteinkonzentrationsänderung pro Proteinisoform.

3.1.4 Unterschiedliche Dynamik der Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform bei Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf

Bei der Betrachtung der relativen Proteinkonzentrationsänderung pro Proteinisoform ergaben sich Unterschiede zwischen den Geweben.

Betrachtet man nun die Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform getrennt für das Striatum und Cerebellum im Verlauf der Erkrankung, so zeigen sich deutliche Unterschiede in der zeitlichen Dynamik (siehe Tabelle 15, Tabelle 16 und Abbildung 7).

Beim Striatum ist die Veränderung bei der Altersstufe mit dem fortgeschrittensten Krankheitsphänotyp (465 Tage) mit 0,025 % deutlich ausgeprägter als bei der präsymptomatischen Altersstufe (10 Tage), wo nur 0,02 % verändert sind. Die Veränderung nimmt beim Vergleich der beiden Altersstufen im Verlauf der Erkrankung zu. Beim Cerebellum hingegen unterscheiden sich die fortgeschrittenste und die präsymptomatische Altersstufe hinsichtlich der relativen Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform nicht. Die Veränderung beträgt jeweils 15 %. Der Peak der Veränderung liegt bei beiden Gehirnregionen bei der mittleren Altersstufe (70 Tage).

Tabelle 15: Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform im HD-Verlauf im Striatum

Alter	Anzahl Proteinisoformen	Änderung Proteinkonzentration [%]	Veränderung pro Isoform [%] ^a
10 Tage	156	3,05	0,020
70 Tage	203	5,8	0,029
465 Tage	146	3,63	0,025

^a Es wurde der Quotient aus veränderter Proteinkonzentration und Anzahl der Proteinisoformen ermittelt.

Tabelle 16: Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform im HD-Verlauf im Cerebellum

Alter	Anzahl Proteinisoformen	Änderung Proteinkonzentration [%]	Veränderung pro Isoform [%] ^a
10 Tage	98	1,49	0,015
70 Tage	236	5,57	0,024
465 Tage	125	1,93	0,015

^a Es wurde der Quotient aus veränderter Proteinkonzentration und Anzahl der Proteinisoformen ermittelt.

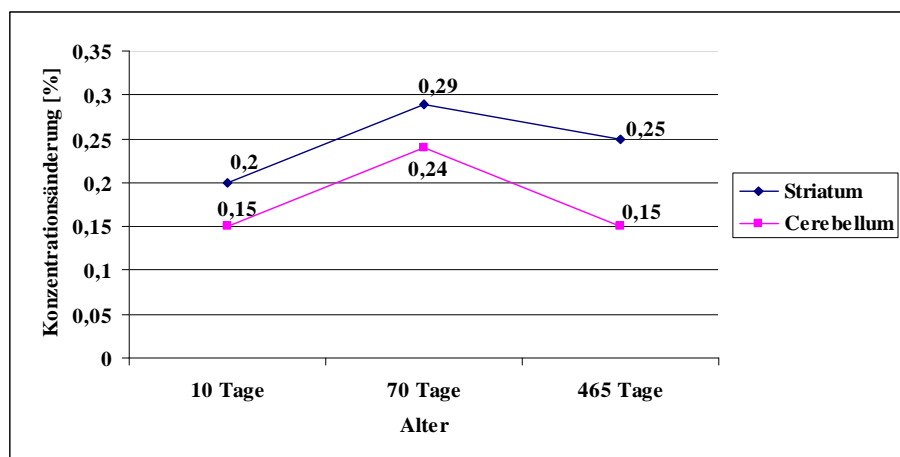


Abbildung 7: Relative Konzentrationsänderung pro veränderter Proteinisoform für Striatum und Cerebellum im HD-Krankheitsverlauf

Diese Dynamik bestätigt sich, wenn man die Werte betrachtet, denen eine 10 %-ige Expressionsänderung zu Grunde lag. Wiederum ist im Striatum die Konzentrationsänderung bei der Altersstufe mit der fortgeschrittensten Pathologie (465 Tage) mit 0,025 % deutlich größer als bei der präsymptomatischen Altersstufe (10 Tage), bei der nur 0,019 % verändert sind. Beim Cerebellum unterscheiden sich die beiden Altersstufen kaum: 0,016 % Veränderung bei der jüngsten (10 Tage) stehen 0,015 % Veränderung bei der ältesten (465 Tage) gegenüber. Auch hier liegt der Peak jeweils bei der mittleren Altersstufe von 70 Tagen (s. Tabelle 17, Tabelle 18 und Abbildung 8).

Tabelle 17: Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform im HD-Verlauf im Striatum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression

Alter	Anzahl Proteinisoformen	Änderung Proteinkonzentration [%]	Veränderung pro Isoform [%] ^a
10 Tage	147	2,78	0,019
70 Tage	198	5,68	0,029
465 Tage	138	3,42	0,025

^a Es wurde der Quotient aus veränderter Proteinkonzentration und Anzahl der Proteinisoformen ermittelt.

Tabelle 18: Proteinkonzentrationsänderung pro Proteinisoform im HD-Verlauf im Cerebellum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression

Alter	Anzahl Proteinisoformen	Änderung Proteinkonzentration [%]	Veränderung pro Isoform [%] ^a
10 Tage	88	1,37	0,016
70 Tage	225	4,96	0,022
465 Tage	115	1,78	0,015

^a Es wurde der Quotient aus veränderter Proteinkonzentration und Anzahl der Proteinisoformen ermittelt.

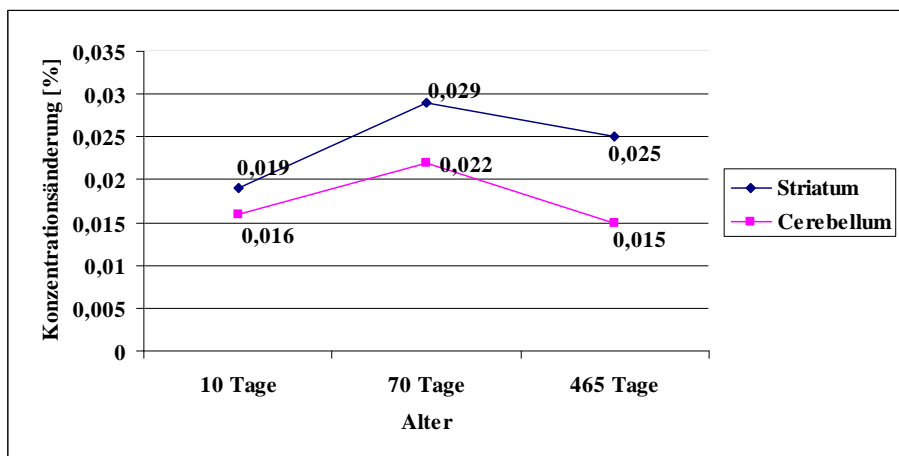


Abbildung 8: Relative Konzentrationsänderung pro veränderter Proteinisoform für Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf, mindestens 10 % Expressionsänderung

Es zeigt sich im Striatum also eine grundlegend andere zeitliche Dynamik der Konzentrationsänderung pro Isoform als im Cerebellum. Die Altersstufe mit dem fortgeschrittensten Krankheitsphänotyp (465 Tage) weist im Striatum eine deutlich größere Veränderung der Proteinkonzentration auf als die präsymptomatische Altersstufe (10 Tage). Beim Cerebellum lassen sich dagegen kaum Unterschiede zwischen den Altersstufen feststellen. Die Konzentrationsänderung nimmt beim Striatum im Verlauf der Erkrankung also tendenziell zu, während sie beim Cerebellum nach einem Peak bei 70 Tagen wieder auf das anfängliche Niveau zurückfällt.

In Kapitel 3.1.3 wurde dargestellt, dass die Konzentrationsänderung pro Isoform im Striatum insgesamt größer ist als im Cerebellum. Es wird nun deutlich, dass dieser Unterschied im HD-Verlauf größer wird.

3.1.5 Peak bei Proteinveränderungen nicht abhängig vom Schweregrad der Erkrankung

Der Einfachheit halber beziehen sich die folgenden Ausführungen nur auf die Werte mit einer minimalen Proteinexpressionsänderung von 10 %. Es ist auffällig, dass der Peak der Proteinveränderungen sowohl bei Betrachtung der Proteinisoformanzahl als auch bei der veränderten Gesamtproteinkonzentration bei der mittleren Altersstufe von 70 Tagen liegt (siehe Abbildung 4 und Abbildung 6). Der Peak zeigt sich sowohl beim Striatum als auch beim Cerebellum an gleicher Stelle. Somit korreliert der Peak der Proteinveränderungen nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung, da es sich bei der mittleren Altersstufe von 70 Tagen um ein noch frühes Erkrankungsstadium handelt, bei dem die Tiere einen bei weitem milderen Krankheitsphänotyp zeigen als bei der letzten untersuchten Altersstufe (465 Tage), die einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung entspricht (siehe Einleitung).

Obwohl der Peak der Proteinveränderungen sowohl beim Striatum als auch beim Cerebellum bei 70 Tagen liegt, zeigen die Verläufe deutliche Unterschiede. Setzt man im Striatum den Wert (bezogen auf die veränderte Proteinisoformanzahl) für 70 Tage 100 %, so ergeben sich anteilige Prozentzahlen von 74 % für 10 Tage und 70 % für 465 Tage. Im Cerebellum hingegen sind bei 10 Tagen 39 % der Proteine verändert und bei 465 Tagen 51 % (gemessen an 70 Tagen 100 %), d. h. der Peak beim Cerebellum ist viel ausgeprägter als beim Striatum (siehe Tabelle 19). Abbildung 4 verdeutlicht die unterschiedlichen Verläufe.

Tabelle 19: Peakverlauf Striatum und Cerebellum bezogen auf Proteinisoformanzahl

Alter	Proteinisoformanzahl*	
	Striatum	Cerebellum
10 Tage	147 (74 %)	88 (39 %)
70 Tage	198 (100 %)	225 (100 %)
465 Tage	138 (70 %)	115 (51 %)

* Der Wert für 70 Tage wurde jeweils 100 % gesetzt. Prozentuale Übereinstimmungen in Klammern. Werte mit mindestens 10 % veränderter Proteinexpression.

Dies bestätigt sich auch bei Betrachtung der veränderten Gesamtproteinkonzentration. Wiederum wurde der Wert für 70 Tage 100 % gesetzt. Es ergeben sich für das Striatum anteilige Werte von 49 % bei 10 Tagen und 60 % bei 465 Tagen, beim Cerebellum sind es mit

28 % bei 10 Tagen und 36 % bei 465 Tagen wiederum deutlich weniger (siehe Tabelle 20). Auch hier ist der Peak der Proteinveränderungen beim Cerebellum also deutlich ausgeprägter als beim Striatum (siehe auch Abbildung 6).

Tabelle 20: Peakverlauf Striatum und Cerebellum bezogen auf Gesamtproteinkonzentration

Alter	Veränderte Gesamtproteinkonzentration*	
	Striatum	Cerebellum
10 Tage	2,78 (49 %)	1,37 (28 %)
70 Tage	5,68 (100 %)	4,96 (100 %)
465 Tage	3,42 (60 %)	1,78 (36 %)

* Der Wert für 70 Tage wurde jeweils 100 % gesetzt. Prozentuale Übereinstimmungen in Klammern. Werte mit mindestens 10 % veränderter Proteinexpression.

Sowohl die präsymptomatische (10 Tage), als auch die Altersstufe mit am meisten fortgeschrittener Erkrankung (465 Tage) bleiben gegenüber dem Peak bei 70 Tagen zurück.

Auffällig ist weiterhin, dass Striatum und Cerebellum bei der präsymptomatischen Altersstufe (10 Tage) hinsichtlich der Anzahl veränderter Proteinisoformen stark voneinander divergieren, während sich dieser Unterschied in späteren Erkrankungsstadien verringert (siehe dazu auch 3.1.1.) Setzt man den jeweils höheren Wert für eine Altersstufe 100 %, so ergeben sich Übereinstimmungen zwischen den Gehirnregionen von 60 % für 10 Tage, 88 % für 70 Tage und 83 % für 465 Tage (siehe Tabelle 21). Die Unterschiede zwischen den Gehirnregionen konvergieren also im Verlauf der Erkrankung deutlich.

Tabelle 21: Übereinstimmung Striatum und Cerebellum bezogen auf Proteinisoformanzahl

Alter	Proteinisoformanzahl		Prozentuale Übereinstimmung*
	Striatum	Cerebellum	
10 Tage	147	88	60 %
70 Tage	198	225	88 %
465 Tage	138	115	83 %

*Der jeweils höhere Wert für eine Altersstufe wurde 100 % gesetzt. Werte mit mindestens 10 % veränderter Proteinexpression.

Diese Konvergenz ist bei der veränderten Gesamtproteinkonzentration nicht zu sehen. Die Übereinstimmung beträgt hier nur 49 % für 10 Tage, 87 % für 70 Tage und 52 % für 465 Tage (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Übereinstimmung Striatum und Cerebellum bezogen auf Gesamtproteinkonzentration

Alter	Veränderte Gesamtproteinkonzentration		Prozentuale Übereinstimmung*
	Striatum	Cerebellum	
10 Tage	2,78	1,37	49 %
70 Tage	5,68	4,96	87 %
465 Tage	3,42	1,78	52 %

*Der jeweils höhere Wert für eine Altersstufe wurde 100 % gesetzt. Werte mit mindestens 10 % veränderter Proteinexpression.

Im Rahmen der Untersuchungen von Proteinveränderungen im Verlauf der HD bei einem Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass schon vor dem Auftreten von Symptomen viele Proteinisoformen verändert waren. Nur in diesem Stadium war die Zahl der veränderten Proteinisoformen zwischen Striatum und Cerebellum stark unterschiedlich. Im weiteren Krankheitsverlauf (70 und 465 Tage) war die Zahl der Veränderungen ähnlich mit einem Peak bei 70 Tagen. Die Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform war im Cerebellum geringer als im Striatum. Dieser Unterschied nimmt im Krankheitsverlauf zu. Die zeitliche Dynamik der Konzentrationsänderung pro Isoform unterscheidet sich beim Striatum deutlich von der beim Cerebellum. Beim Striatum nimmt die Konzentrationsänderung im Vergleich von jüngster und fortgeschrittenster Altersstufe im Verlauf der Erkrankung zu, beim Cerebellum ist sie beim ersten und letzten Stadium gleich. Ausserdem war der Peak bei den Proteinveränderungen bei Proteinisoformanzahl und -konzentration im Cerebellum ausgeprägter als im Striatum.

3.2 Massenspektrometrische Untersuchung der frühen Altersstufe

In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei der sehr frühen Altersstufe von 10 Tagen um ein präsymptomatisches Erkrankungsstadium handelt, in dem die Tiere keinen Krankheitsphänotyp zeigen - also nicht von den gesunden Kontrolltieren zu unterscheiden sind [120] - gewinnen die bisher gewonnenen Erkenntnisse bezüglich starken Veränderungen bei dieser Altersstufe eine besondere Bedeutung. Es fällt auf, dass sich phänotypisch

unauffälliges und phänotypisch fortgeschrittenes Stadium von der Anzahl der Veränderungen her im Striatum ähnlich verhalten (siehe Kapitel 3.1.1.). Zudem findet sich bei der sehr frühen Altersstufe ein deutlicher Unterschied zwischen den betrachteten Gehirnregionen, da beim 10 Tage alten Striatum deutlich mehr Unterschiede gefunden wurden als beim 10 Tage alten Cerebellum, während sich die Veränderungen in den Gehirnregionen im weiteren Krankheitsverlauf angeglichen haben (siehe Kapitel 3.1.1. und 3.1.5.). Diese Beobachtungen lassen auf eine mögliche zentrale Bedeutung früher Veränderungen bei der Pathogenese von HD schließen.

Zur genaueren Untersuchung der präsymptomatischen Altersstufe erfolgte nun die massenspektrometrische Identifizierung der veränderten Proteine (siehe Kapitel 2.8.) für das Striatum und das Cerebellum der 10 Tage alten Ratten.

3.2.1 Quantitative Aspekte der Proteinisoformidentifizierung

Zur Bestimmung von unterschiedlich exprimierten Proteinisoformen (Spots) wurde eine MS-inkompatible Silberfärbung für die 2D-Gele verwendet, die aber mit hoher Sensitivität Expressionsunterschiede detektieren kann. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Expressionsunterschiede auf MS-kompatibeln 2D-Gelen mit mittlerer Sensitivität ausgestochen (siehe Kapitel 2.8.). Aus diesem Grund konnten weniger Spots mit veränderten Proteinisoformen ausgestochen werden, als ursprünglich detektiert wurden. Vor allem Spots mit niedriger Intensität waren auf den MS-kompatiblen Gelen nicht mehr sichtbar. Von den ausgestochenen Spots gelang wiederum nur bei einem bestimmten Prozentsatz die Identifizierung mittels Massenspektrometrie. Diese Zusammenhänge sind in Tabelle 23 für das Striatum dargestellt. Auffällig ist hier die hohe Identifizierungsrate von 76 % der ausgestochenen Spots.

Tabelle 23: Proteinisoformidentifizierungen, Striatum 10 Tage

	Anzahl		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
Veränderte Proteinisoformen	92	55	147
Davon ausgestochen	65	41	106
Davon identifiziert	49 (75 %)*	32 (78 %)*	81 (76 %)*

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

*Prozentualer Anteil der identifizierten im Verhältnis zu den ausgestochenen Proteinen in Klammern.

Ausgestochene Spots zeigten mindestens 10 % Expressionsänderung.

In Tabelle 24 findet sich eine Darstellung dieser Zusammenhänge für das Cerebellum. Die Identifizierungsrate liegt hier mit 60 % deutlich unter der für das Striatum.

Tabelle 24: Proteinisoformidentifizierungen, Cerebellum 10 Tage

	Anzahl		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
Veränderte Proteinisoformen	44	44	88
Davon ausgestochen	27	25	52
Davon identifiziert	16 (59 %)*	15 (60 %)*	31 (60 %)*

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

*Prozentualer Anteil der identifizierten im Verhältnis zu den ausgestochenen Proteinen in Klammern. Ausgestochene Spots zeigten mindestens 10 % Expressionsänderung.

Es ist bereits bekannt, dass ein Protein durch mehr als eine Isoform (Spot) auf einem 2D-Gel vertreten sein kann. Im Schnitt entsprechen 2,2 Spots einem Protein [129]. Dies wurde im nächsten Arbeitsschritt, bei dem die Anzahl nicht-redundanter Proteine ermittelt wurde, berücksichtigt. Als Selektionskriterium diente der Gennamen. Proteine mit unterschiedlichen Proteinennamen aber gleichem Gennamen wurden als ein nichtredundantes Protein gewertet. Auch wenn ein Protein in mehreren Isoformen (Spots auf dem 2D-Gel) verändert war, wurde es nur als ein nichtredundantes Protein gezählt. Tabelle 25 und Tabelle 26 stellen die Anzahl der nicht redundanten Proteine der Anzahl der identifizierten Proteine für das Striatum und Cerebellum gegenüber.

Tabelle 25: Nicht redundante Proteine, Striatum 10 Tage

	Anzahl		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
Identifizierte Proteine	49	32	81
Nicht redundante Proteine	40 (82 %)*	27 (84 %)*	67 (83 %)*

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

*Prozentualer Anteil der nicht redundanten im Verhältnis zu den identifizierten Proteinen in Klammern

Tabelle 26: Nicht redundante Proteine, Cerebellum 10 Tage

	Anzahl		
	Expression ↑	Expression ↓	Gesamt
Identifizierte Proteine	16	15	31
Nicht redundante Proteine	15 (94 %)*	13 (87 %)*	28 (90 %)*

vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

*Prozentualer Anteil der nicht redundanten im Verhältnis zu den identifizierten Proteinen in Klammern

Im Striatum und Cerebellum gibt es zahlreiche Proteine, die durch mehr als einen Spot auf dem Gel repräsentiert werden, somit ist die Zahl der nicht redundanten Proteine kleiner als die Zahl der identifizierten. Darüber hinaus wird auch bei der Anzahl nicht redundanter Proteine sehr klar, dass sich deutlich mehr Veränderungen beim 10 Tage alten Striatum (67 nicht redundante Proteine, siehe Tabelle 25) als beim 10 Tage alten Cerebellum (28 nicht redundante Proteine, siehe Tabelle 26) finden. Die identifizierten nicht redundanten Proteine sind in Tabelle 32 und Tabelle 33 im Anhang zu den Ergebnissen dokumentiert.

Den quantitativen Zusammenhang zwischen unterschiedlich exprimierten Spots auf den Gelen, ausgestochenen und identifizierten Spots und nicht redundanten Proteinen zeigt Abbildung 9 in der Übersicht für das Striatum und das Cerebellum im Vergleich.

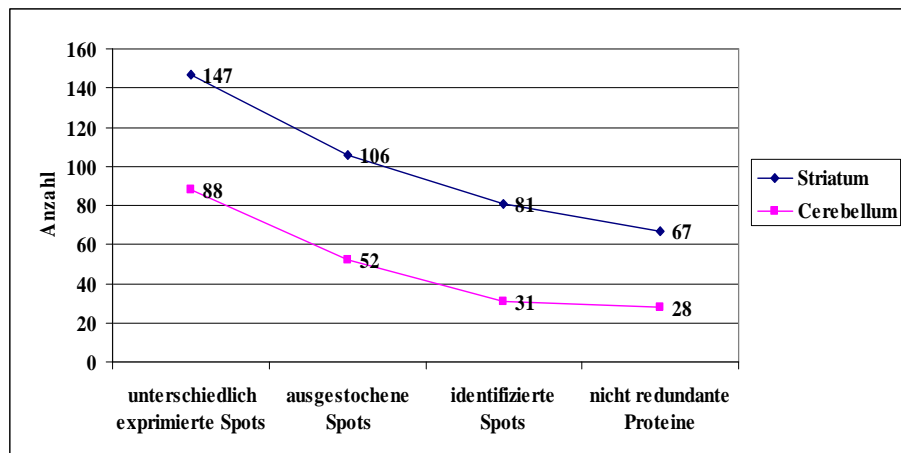


Abbildung 9: Vom ausgestochenen Spot bis zum identifizierten, nicht redundanten Protein

Gegenüberstellung der Anzahl unterschiedlich exprimierter Spots (mindestens 10 % Expressionsänderung), ausgestochener und identifizierter Spots und nicht redundanter Proteine für das Striatum und Cerebellum 10 Tage im Vergleich. Dargestellt ist jeweils die Gesamtanzahl.

Nach der quantitativen Analyse der frühen Altersstufe erfolgte nun die qualitative Untersuchung der mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine. Zur genaueren Analyse wurde hier eine Untersuchung der beteiligten Stoffwechselwege durchgeführt.

3.2.2 Bestimmung der durch HD betroffenen Stoffwechselwege

Um ein genaueres Verständnis der Vorgänge zu erhalten, die eine Rolle in der frühen Pathogenese der HD spielen könnten, wurde eine KEGG-Analyse zur Identifizierung der Pathways mit am meisten veränderten Proteinen beim 10 Tage alten Striatum und Cerebellum durchgeführt (siehe Kapitel 2.9.). Eine signifikante Veränderung eines Pathways bestand bei mindestens zwei, vorzugsweise drei, daran beteiligten veränderten Proteinen und $p < 0,01$. Der Cut-off für die Anzahl der Proteine wurde gewählt, um sicherzustellen, dass eine genügend große Anzahl von Proteinen eines Pathways beteiligt ist, um diesen als spezifisch verändert im Rahmen des Pathomechanismus der Erkrankung zu betrachten.

3.2.2.1 Signifikant veränderte Pathways nur im Striatum

Ein erstes auffälliges Ergebnis der KEGG-Analyse besteht darin, dass sich im Cerebellum kein einziger signifikant veränderter Pathway findet, wohingegen im Striatum sechs Pathways signifikante Veränderungen zeigen (siehe Abbildung 10).

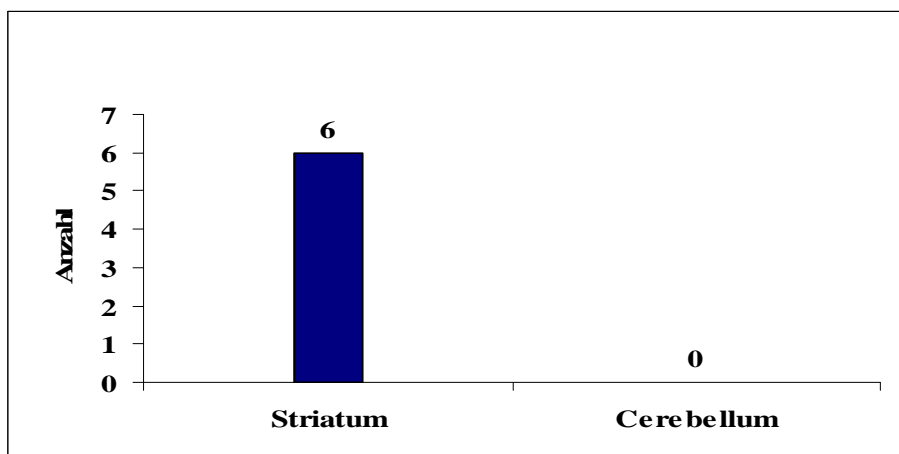


Abbildung 10: Signifikant veränderte Pathways im Striatum und im Cerebellum bei 10 Tagen.

Eine signifikante Veränderung bestand, wenn mindestens zwei an einem Pathway beteiligte Proteine verändert waren und $p < 0,01$. Angegeben ist die Gesamtanzahl der veränderten Pathways.

Bei der weiteren Untersuchung der veränderten Pathways wird sich die Arbeit daher auf das Striatum beschränken, da beim Cerebellum kein Pathway die Signifikanzkriterien erfüllte.

3.2.2.2 Frühe Störung zentraler Stoffwechselwege im Striatum

Die beim Striatum signifikant veränderten Pathways sowie die Anzahl der jeweils veränderten Proteine sind in Tabelle 27 dargestellt. In der Tabelle wird nicht zwischen Pathways mit vermehrter oder verminderter Proteinexpression differenziert.

Tabelle 27: Signifikant veränderte Pathways im Striatum 10 Tage gesamt

KEGG-Pathway	Anzahl beteiligter Proteine
Axonleitung und –sprossung	3
Glykolyse/Glukoneogenese	3
Pentosephosphatweg	3
Neurodegeneration	2
Propanoatmetabolismus	2
Fruktose- und Mannosemetabolismus	2

Eine signifikante Veränderung bestand, wenn mindestens zwei an einem Pathway beteiligte Proteine verändert waren und $p < 0,01$.

Es wird ersichtlich, dass bereits in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung zentrale Abläufe in der Zelle verändert sind. Dies betrifft insbesondere den Energiehaushalt der Zelle, wo drei Pathways verändert sind (Glykolyse/Glukoneogenese, Pentosephosphatweg, Fruktose- und Mannosemetabolismus), den Aminosäurestoffwechsel (Propanoatmetabolismus), die Axonleitung und –sprossung und den Zelltod (Neurodegeneration), bei denen jeweils ein Pathway signifikante Veränderungen aufweist (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Veränderte Pathways und betroffene zentrale Abläufe in der Zelle, Striatum 10 Tage

Zentrale Abläufe in der Zelle	veränderte Pathways im Einzelnen
Energiestoffwechsel	Glykolyse/Glukoneogenese Pentosephosphatweg Fruktose – und Mannosemetabolismus
Aminosäurestoffwechsel	Propanoatmetabolismus
Axonleitung und –sprossung	Axonleitung
Zelltod	Neurodegeneration

Die betroffenen zentralen Abläufe in der Zelle mit der jeweiligen Anzahl an signifikant veränderten Pathways werden in Abbildung 11 grafisch dargestellt.

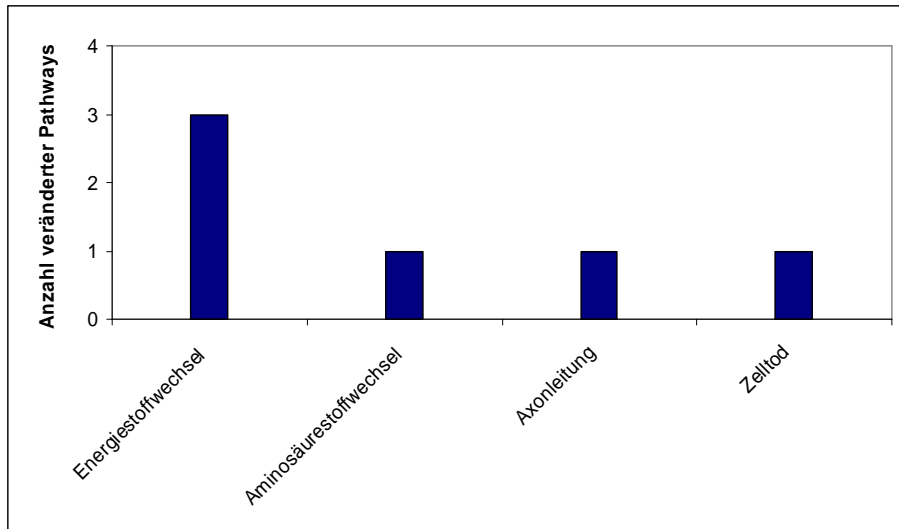


Abbildung 11: Veränderte Pathways in verschiedenen zentralen Abläufen der Zelle, Striatum 10 Tage

Eine signifikante Veränderung bestand, wenn mindestens zwei an einem Pathway beteiligte Proteine verändert waren und $p < 0,01$.

Betrachtet man die bei den einzelnen Pathways beteiligten Proteine genauer (siehe Tabelle 32), so zeigt sich, dass teilweise zentrale Proteine verändert sind. Der Genname ist in Klammern angegeben. So findet sich beim Pathway für die Axonleitung und –sprossung eine Veränderung der Cyclin-dependant Kinase 5 (*Cdk5*). Bei der Glykolyse sind Aldolase C (*Aldoc*), Phosphofruktokinase (*Pfkm*) und Laktatdehydrogenase B (*LdhB*) verändert.

3.2.2.3 Mehrzahl der veränderten Pathways zeigt verminderte Proteinexpression

Führt man die in Kapitel 2.9. beschriebene KEGG-Analyse für die nicht redundanten Proteine mit vermehrter bzw. verminderter Expression jeweils getrennt durch, erhält man eine Aussage darüber, welche veränderten Pathways eine verringerte und welche eine vermehrte Proteinexpression zeigen. Auffällig ist hierbei, dass fünf Pathways eine verminderte Proteinexpression aufweisen, nur einer hingegen eine erhöhte (siehe Tabelle 29, Tabelle 30 und Abbildung 12).

Tabelle 29: Pathways mit vermehrter Proteinexpression, 10 Tage Striatum

KEGG-Pathway	Anzahl beteiligter Proteine
Propanoatmetabolismus	2

Eine signifikante Veränderung bestand, wenn mindestens zwei an einem Pathway beteiligte Proteine verändert waren und $p < 0,01$.

Tabelle 30: Pathways mit verminderter Proteinexpression, 10 Tage Striatum

KEGG Pathway	Anzahl beteiligter Proteine
Purinmetabolismus	2
Pentosephosphatweg	2
Glykolyse/Glukoneogenese	2
Axonleitung	2
Fruktose- und Mannosemetabolismus	2

Eine signifikante Veränderung bestand, wenn mindestens zwei an einem Pathway beteiligte Proteine verändert waren und $p < 0,01$.

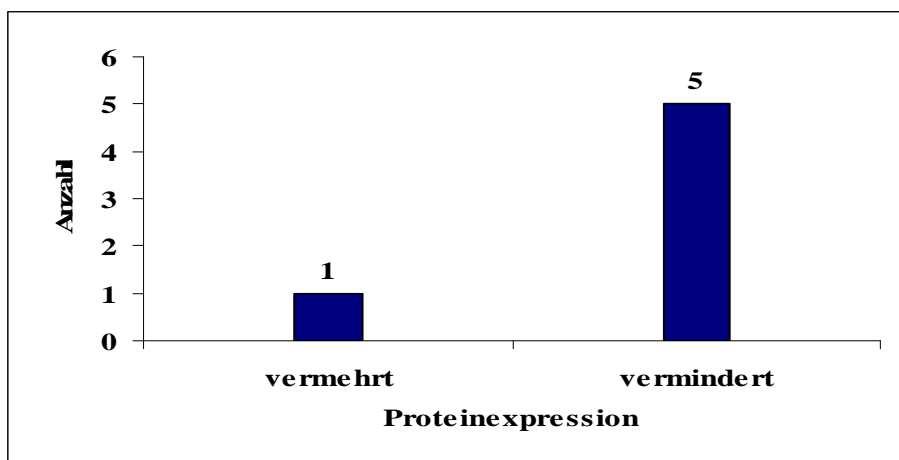


Abbildung 12: Signifikant veränderte Pathways mit vermehrter und verminderter Proteinexpression, Striatum 10 Tage

Eine signifikante Veränderung bestand, wenn mindestens zwei an einem Pathway beteiligte Proteine verändert waren und $p < 0,01$.

3.2.2.4 Alle am Energiestoffwechsel der Zelle beteiligten Pathways zeigen eine verminderte Proteinexpression

Wie aus Tabelle 30 ersichtlich wird, weisen alle Pathways, die am Energiemetabolismus der Zelle beteiligt sind und eine signifikante Veränderung bei der jüngsten Altersstufe des Striatums zeigen, eine verminderte Proteinexpression auf. Dies betrifft die Pathways für Glykolyse/Glukoneogenese, den Pentosephosphatweg und den Fruktose-/Mannosestoffwechsel. Die anderen Pathways weisen jeweils Proteine mit vermehrter oder verminderter Expression auf.

3.2.3 Veränderungen bei HD auf Einzelproteinebene zeigen, dass zentrale Systeme der Zelle betroffen sind

Wie unter 3.2.2. dargestellt, findet sich im 10 Tage alten Cerebellum kein einziger signifikant veränderter Pathway, wohingegen das 10 Tage alte Striatum sechs Pathways aufweist, die signifikante Veränderungen zeigen. Auffällig ist allerdings, dass die Anzahl der beteiligten Proteine an den veränderten Pathways relativ gering ist. So finden sich bei Betrachtung des Gesamtstriatums ohne Berücksichtigung von Mehr – und Mindereexpression insgesamt sechs signifikant veränderte Pathways (siehe Tabelle 27). Davon finden sich bei drei Pathways (Axonleitung, Glykolyse/Glukoneogenese, Pentosephosphatweg) jeweils drei veränderte Proteine und bei drei Pathways (Neurodegeneration, Propanoatmetabolismus, Fruktose- und Mannosemetabolismus) jeweils zwei veränderte Proteine (siehe Tabelle 27). Betrachtet man die Pathways mit vermehrter und verminderter Proteinexpression getrennt, so findet sich kein einziger, der mehr als zwei veränderte Proteine aufweist. Zwar sind alle erforderlichen Signifikanzkriterien erfüllt, trotzdem ist die Anzahl der beteiligten Proteine relativ gering, vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass der angelegte Cut-off bei zwei veränderten Proteinen liegt (siehe Kapitel 3.2.2.).

Daher wurde die Betrachtung auf die Ebene einzelner signifikant veränderter Proteine ausgedehnt (siehe Tabelle 32 und Tabelle 33), die unter Umständen nicht pathwayspezifisch sind, aber trotzdem zentrale Systeme der Zelle betreffen.

Bei Betrachtung der veränderten individuellen Proteine bei der jüngsten Altersstufe des Striatums fallen zahlreiche Veränderungen in zentralen Systemen der Zelle auf. Betroffen sind beispielsweise Proteine des Zytoskeletts, des Ubiquitin-Proteasom-Systems, des mitochondrialen Stoffwechsels, der Transkription und des Vesikeltransports. Verändert sind weiterhin Proteine, die bei oxidativem Stress und bei der Heat-Shock-Antwort betroffen sind. Eine Übersicht über die auf Ebene der einzelnen Proteine betroffenen Systeme der Zelle mit den zugehörigen veränderten Proteinen und entsprechenden Gennamen gibt Tabelle 31.

Tabelle 31: Veränderte Einzelproteine, Striatum 10 Tage

Betroffenes Zellsystem	Gennamen	Veränderte Proteine	Expression
Zytoskelett	<i>Actb</i>	Aktin β	↑
	<i>Actr3</i>	ARP3	↓
	<i>Tpm 3</i>	Tropomyosin 3	↑
	<i>Tpm 4</i>	Tropomyosin 4	↑
	<i>Tbca</i>	Tubulin Cofactor A	↑
	<i>Tuba 1</i>	Tubulin α 1	↓
Ubiquitin-Proteasom-System	<i>Psm5</i>	Proteasom Subunit α 5	↑
	<i>Skp1a</i>	S-Phase Kinase-assoziiertes Protein 1A	↓
	<i>Ube2v1</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	↓
	<i>Uchl1</i>	Ubiquitin Carboxyhydrolase L1	↑
	<i>Usp14</i>	Ubiquitin-spezifische Peptidase 14	↓
Mitochondrialer Stoffwechsel	<i>Acadvl</i>	Acyl-CoenzymA-Dehydrogenase	↑
	<i>Bdh1</i>	3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	↓
	<i>Immt</i>	Mitochondrial inner membrane protein	↓
Transkription	<i>Hnrpk</i>	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein K	↑
	<i>Ddx5</i>	DEAD box polypeptide 5	↑
Vesikeltransport	<i>Cltb</i>	Clathrin-light-Polypeptid	↑
	<i>Lin7a</i>	Lin7a	↑
Oxidativer Stress	<i>Prdx1</i>	Peroxiredoxin 1	↓
	<i>Prdx2</i>	Peroxiredoxin 2	↑
Heat-Shock-Antwort	<i>Hspa8</i>	Hsc 70	↓
	<i>Hspa9</i>	Grp 75	↑

Veränderte Einzelproteine, entsprechende Gennamen und betroffenes Zellsystem, 10 Tage altes Striatum. Vermehrte (↑) und verminderte (↓) Expression

Es sind also jenseits der softwaregestützten Pathway-Analyse auch zahlreiche weitere zentrale Proteine der Zelle betroffen. Diese Veränderungen finden sich bezeichnenderweise beim Cerebellum nicht (siehe Tabelle 32 und Tabelle 33).

Tabelle 32: Gesamtliste aller identifizierten, nicht redundanten Proteine, 10 Tage Striatum

Gennname	Proteinname	Ratio	Hit Score	Sequence coverage [%]	MS-Art
Acadvl	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain [Rattus norvegicus]	1,235121872	177	38	MALDI
Actb	actin beta - rat	1,229505734	441	2	ESI
Actr3	ARP3 actin-related protein 3 homolog [Mus musculus]	0,753617858	565	20	ESI
Adprh	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase	1,19812817	512	31	ESI
Aldoc	aldolase C, fructose-biphosphate [Rattus norvegicus]	0,883265779	124	37	MALDI
Anxa5	Chain , Annexin V	0,820233463	304	9	ESI
Apoe	ORF2	0,830069231	153	14	ESI
Aprt	adenine phosphoribosyl transferase (predicted) [Rattus norvegicus]	1,34675005	346	10	ESI
Bdh1	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor	0,880139586	143	39	MALDI
CAP2B	F-actin capping protein beta subunit [Homo sapiens]	1,783449109	236	1	ESI
Cbr1	carbonyl reductase [Rattus norvegicus]	0,765666667	86	27	MALDI
Cct5	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon) [Rattus norvegicus]	0,871206572	288	1	ESI
Cdk5	cyclin-dependent kinase 5 [Rattus norvegicus]	0,83044074	67	20	MALDI
Clpp	Putative ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	1,217218632	261	31	ESI
Citb	clathrin, light polypeptide (Lcb) [Rattus norvegicus]	1,221856858	387	22	ESI
Ddx5	Dead box polypeptide 5	1,331160632	239	45	MALDI
Dpysl2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	0,771529436	536	15	ESI
Eef1a1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 [Rattus norvegicus]	1,18907748	64	19	MALDI
Fth1	Ferritin heavy chain (Ferritin H subunit)	1,436038129	420		ESI
Gdi1	rab GDI alpha [Rattus norvegicus]	0,725363638	410	12	ESI
Gdi2	GDP dissociation inhibitor 2 [Rattus norvegicus]	1,489625374	171	7	ESI
Gstm1	Chain A, Glutathione S-Transferase (Isoenzyme 3-3)	1,109335419	174	59	MALDI
Harpb64	hypothetical protein [Rattus norvegicus]	1,209786136	199	25	ESI
Hn1	hematological and neurological expressed sequence 1 [Rattus norvegicus]	1,861111111	131	3	ESI
Hnrpdl	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like [Rattus norvegicus]	1,303852723	126	4	ESI
Hnrpk	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K [Mus musculus]	1,19834428	740	19	ESI
Hsd17b10	Chain A, Rat Brain 3-Hydroxyacyl-Coa Dehydrogenase Binary Complex With Nadh And Estradiol	1,295482815	186	73	MALDI
Hspa8	Hsc 70	0,699073545	109	20	ESI
Hspa9	Grp 75	1,10314554	1443	4	ESI
Immt	Mitochondrial inner membrane protein [Rattus norvegicus]	0,743701842	158	4	ESI
Impdh2	inosine monophosphate dehydrogenase 2 [Rattus norvegicus]	0,849814248	172	39	MALDI
Ldhb	lactate dehydrogenase B [Rattus norvegicus]	1,393420097	211	45	ESI
Lin7a	lin-7 homolog a [Rattus norvegicus]	1,279744255	115	40	MALDI
LOC315970	hypothetical protein LOC315970 [Rattus norvegicus]	1,414327855	240	44	ESI
LOC365574	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 [Rattus norvegicus]	1,219049478	42	13	ESI
LOC684096	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	1,197915973	401	4	ESI
Lzic	leucine zipper and CTNBP1 domain containing [Rattus norvegicus]	0,644036598	160	5	ESI
MGC124555	Calumenin precursor (O35783)	1,294630622	374	2	ESI
Naca	nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide [Mus musculus]	1,190284949	241	18	ESI
Ndrp4	N-myc downstream regulated 4 [Rattus norvegicus]	0,637776312	33	1	ESI
Nme2	Nucleoside diphosphate kinase B	0,881830545	146	84	MALDI
Pebp1	phosphatidylethanolamine binding protein [Rattus norvegicus]	1,611813318	272	100	ESI
Pfkm	Phosphofructokinase, muscle [Rattus norvegicus]	0,769733191	112	18	MALDI
Ppp1r7	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7 [Rattus norvegicus]	0,862677923	325	3	ESI
Ppp3r1	calcineurin B [Rattus sp.]	1,362681528	125		ESI
Prdx1	Peroxiredoxin 1	0,843595407	98	50	MALDI
Prdx2	peroxiredoxin 2 [Rattus norvegicus]	1,360993437	356		ESI
PsmA5	proteasome subunit, alpha type 5 [Mus musculus]	1,401149211	184	100	ESI
Ptbp1	polypyrimidine tract binding protein 1 isoform b [Rattus norvegicus]	1,267437764	71	26	MALDI
Rbp1	Chain , Cellular Retinol Binding Protein (Crpb) Complexed With All-Trans Retinol	1,36129	96		ESI
RDG1311558	Myosin-4 (Myosin heavy chain B)	1,137048437	754	16	ESI
RDG1560049	Dual specificity protein phosphatase 3 (T-DSP11) [Rattus norvegicus]	1,146779092	65		ESI
RDG1308373	Uncharacterized protein C2orf32 homolog	0,855554132	78	33	MALDI
Sfxn3	sideroflexin 3 [Rattus norvegicus]	0,331218797	184	44	MALDI
Sh3g12	similar to SH3-domain GRB2-like 2 [Rattus norvegicus]	0,699251391	363	2	ESI
Skp1a	S-phase kinase-associated protein 1A [Rattus norvegicus]	0,877738679	388	4	ESI
SuclA2	succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit	1,993044918	148	100	ESI
Tagln3	transgelin 3 [Rattus norvegicus]	0,825525277	175	52	MALDI
Taldo1	transaldolase [Rattus norvegicus]	1,160815038	420	3	ESI
Tbca	tubulin cofactor a [Rattus norvegicus]	1,150740173	636		ESI
Tpm3	tropomyosin 3	1,272166749	134	13	ESI
Tpm4	tropomyosin 4 [Rattus norvegicus]	1,117649864	767	35	ESI
Tpt1	tumor protein, translationally-controlled 1 [Mus musculus]	1,287488145	145	100	ESI
Tuba1	tubulin alpha	0,718451081	243	7	ESI
Ube2v1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 [Mus musculus]	0,89026817	161	51	MALDI
Uchl1	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 [Rattus norvegicus]	1,119900549	507	5	ESI
Usp14	ubiquitin specific protease 14 [Rattus norvegicus]	0,711755274	183	10	ESI

Dargestellt sind alle identifizierten, nicht redundanten Proteine mit $p < 0,05$ für das Striatum, 10 Tage. Angegeben sind neben dem Gennamen der Proteinname und die MS-Art. Ein MS-Hit-Score > 32 ist signifikant und äquivalent zu $p < 0,05$. Eine Ratio < 1 zeigt eine verminderte Expression des Proteins an, bei einer Ratio > 1 findet sich eine vermehrte Expression. Unter Sequence Coverage versteht man die prozentuale Abdeckung der Aminosäuresequenz eines Proteins mit bei der Identifizierung gefundenen Peptiden.

Tabelle 33: Gesamtliste aller identifizierten, nicht redundanten Proteine, 10 Tage Cerebellum

Genname	Proteinname	Ratio	Hit Score	Sequence coverage [%]	MS-Art
Adk	adenosine kinase [Rattus norvegicus]	1,408829737	472	0,22	ESI
Anxa4	annexin A4 [Rattus norvegicus]	2,225665179	198	0,13	ESI
Atad3a	ATPase family, AAA domain containing 3A [Rattus norvegicus]	1,15663351	253	44	MALDI
Cbx1	Chromobox protein homolog 1	0,853615571	285		ESI
CBX3	chromobox homolog 3 [Homo sapiens]	0,873976766	285	0,28	ESI
Coro1c	slingshot homolog 1 [Rattus norvegicus]	3,907025663	75	14	MALDI
Cte1	cytosolic acyl-CoA thioesterase 1 [Rattus norvegicus]	1,447766323	81	19	MALDI
Ddx5	Dead box polypeptide 5	1,284954726	280	48	MALDI
Dlat	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	0,860160856	166	0,07	ESI
EIF1AX	X-linked eukaryotic translation initiation factor 1A [Homo sapiens]	0,870763094	258	0,31	ESI
Fdxr	ferredoxin reductase [Rattus norvegicus]	1,278618311	128	35	MALDI
Gdi2	GDP dissociation inhibitor 2 [Rattus norvegicus]	1,141952951	178	0,07	ESI
Gorasp2	Golgi reassembly-stacking protein 2 (GRS2)	1,311641321	58	0,01	ESI
Hnrpa0	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 isoform 2 [Mus musculus]	0,876915738	102	30	MALDI
Kif3b	Kinesin-like protein KIF3B	0,775603208	126	21	MALDI
Mylc2b	myosin regulatory light chain	0,883464067	529	0,51	ESI
Nipsnap3a	NIPSNAP-related protein isoform 1 [Rattus norvegicus]	1,499983999	62	35	MALDI
P4hb	Prolyl 4-hydroxylase subunit beta	0,790710336	328	0,13	ESI
Pdcd3	phosducin-like 3 [Rattus norvegicus]	0,746183765	140	0,12	ESI
RBBP7	Histone-binding protein RBBP7	1,1584965	94	0,05	ESI
RGD1564560	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 (DEAD box protein 6)	1,269071138	164	45	MALDI
Sfxn3	Sideroflexin 3 [Rattus norvegicus]	0,231915301	134	34	MALDI
Spfh2	SPFH domain family, member 2 [Rattus norvegicus]	1,167167727	477	0,23	ESI
Srprb	transferrin [Rattus norvegicus]	1,246414927	113	27	MALDI
Stmn1	stathmin 1 [Rattus norvegicus]	0,804891958	327	0,4	ESI
Tpm3_v1	tropomyosin	0,84704634	710	0,45	ESI
Txn1	thioredoxin [Rattus norvegicus]	0,808536571	192	0,22	ESI
Ywhaz	14-3-3 zeta isoform	1,109335419	96	0,09	ESI

Dargestellt sind alle identifizierten, nicht redundanten Proteine mit $p < 0,05$ für das Cerebellum, 10 Tage. Angegeben sind neben dem Gennamen der Proteinname und die MS-Art. Ein MS-Hit-Score > 32 ist signifikant und äquivalent zu $p < 0,05$. Eine Ratio < 1 zeigt eine verminderte Expression des Proteins an, bei einer Ratio > 1 findet sich eine vermehrte Expression. Unter Sequence Coverage versteht man die prozentuale Abdeckung der Aminosäuresequenz eines Proteins mit bei der Identifizierung gefundenen Peptiden.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es im Striatum bereits im sehr frühen präsymptomatischen Stadium (10 Tage) zu zahlreichen Veränderungen auf Proteinebene kommt. Auch das Cerebellum, als primär nicht von der Erkrankung betroffene Gehirnregion, weist zahlreiche Veränderungen auf, in der präsymptomatischen Altersstufe (10 Tage) jedoch deutlich weniger als das Striatum. Divergieren Striatum und Cerebellum hinsichtlich der Anzahl gefundener Veränderungen zu Beginn der Erkrankung noch stark, gleichen sie sich in deren Verlauf zunehmend einander an. Es besteht für beide Gehirnregionen ein vom Krankheitsstadium unabhängiger Peak der Proteinveränderungen bei 70 Tagen, der beim Cerebellum ausgeprägter ist als beim Striatum. Die präsymptomatische (10 Tage) und die Altersstufe mit am weitesten fortgeschrittener Pathologie (465 Tage) liegen trotz sehr unterschiedlicher Krankheitsphänotypen relativ eng beieinander, was die Anzahl der Veränderungen angeht. Im Striatum ist die Änderung der Proteinkonzentration pro Isoform größer als im Cerebellum. Dieser Unterschied nimmt im Krankheitsverlauf zu. Ebenso

unterscheidet sich die zeitliche Dynamik der Veränderung pro Proteinisoform im Striatum deutlich von der beim Cerebellum.

Um die pathogenetische Rolle der frühesten Altersstufe zu erhellen, wurden die Proteine des 10 Tage alten Striatums und Cerebellums massenspektrometrisch identifiziert. Es wurde auch bei der Untersuchung der nicht redundanten Proteine deutlich, dass sich im präsymptomatischen Striatum deutlich mehr Veränderungen finden als im Cerebellum. Bei der anschließenden KEGG-Pathway-Analyse fand sich im Cerebellum kein einziger relevant veränderter Pathway, wohingegen das Striatum jeweils sechs signifikant veränderte Pathways zeigte, wovon fünf eine verminderte Proteinexpression aufwies. Am meisten betroffen scheint der Energiestoffwechsel der Zelle zu sein: hier sind drei Pathways verändert, die alle eine verminderte Proteinexpression zeigen. Ebenfalls betroffen sind andere zentrale Bereiche der Zelle wie Axonleitung, Aminosäuremetabolismus und Zelltod. Allerdings sind auch zahlreiche, nicht-pathway-assoziierte Proteine verändert, die weitere zentrale Bereiche der Zelle betreffen, unter anderem Zytoskelett, Ubiquitin-Proteasom-System, mitochondrialer Stoffwechsel, Transkription, oxidativer Stress, Heat-shock-Antwort und Vesikeltransport.

Die beschriebenen Veränderungen sowohl auf Pathway-Ebene als auch auf Ebene der individuellen Proteine finden sich beim Cerebellum nicht.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines Großgel-2D-Elektrophorese-gestützten Ansatzes Proteomveränderungen im zeitlichen Verlauf der HD untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt lag hierbei auf der Identifizierung sehr früher Veränderungen auf Proteinebene. Als Krankheitsmodell diente ein transgenes Rattenmodell mit 51 Polyglutaminrepeats, das einen relativ späten Krankheitsbeginn (late-onset) mit Verhaltensauffälligkeiten und langsam progredienter motorischer Symptomatik zeigt. Es wurden drei Untersuchungszeitpunkte (Altersstufen) gewählt: 10 Tage als sehr frühe, präsymptomatische Altersstufe, 70 Tage als frühe, symptomatische Altersstufe und 465 Tage als mittlere Altersstufe mit fortgeschrittener Symptomatik. Es wurden zwei Gehirnregionen untersucht. Beim untersuchten Striatum handelt es sich um eine stark und schon früh von HD betroffene Gehirnregion, das ebenfalls untersuchte Cerebellum ist erst deutlich später betroffenen. Für jede der drei Altersstufen und jede der beiden Gehirnregionen wurden jeweils 5 Probenpaare, d. h. jeweils eine HD- und eine Kontrollprobe untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass es im Striatum bereits im sehr frühen präsymptomatischen Stadium (10 Tage) zu zahlreichen Veränderungen auf Proteinebene kommt. Auch das Cerebellum, als primär nicht von der Erkrankung betroffene Gehirnregion, weist viele Veränderungen auf, in der präsymptomatischen Altersstufe (10 Tage) jedoch deutlich weniger als das Striatum. Dies bedeutet, dass zu Beginn der Erkrankung Striatum und Cerebellum hinsichtlich der Anzahl gefundener Veränderungen noch stark divergieren, sie gleichen sich aber in deren Verlauf (ab 70 Tagen) einander zunehmend an. Es besteht für beide Gehirnregionen ein vom Krankheitsstadium unabhängiger Peak der Proteinveränderungen bei 70 Tagen, der besonders in seiner Steilheit beim Cerebellum ausgeprägter ist als beim Striatum. Die präsymptomatische (10 Tage) und die Altersstufe mit am weitesten fortgeschrittener Pathologie (465 Tage) liegen trotz sehr unterschiedlicher Krankheitsphänotypen relativ eng beieinander, was die Anzahl der Veränderungen betrifft. Im Striatum ist die durchschnittliche Änderung der Proteinkonzentration pro Isoform größer als im Cerebellum. Dieser Unterschied nimmt im Krankheitsverlauf zu. Ebenso unterscheidet sich die zeitliche Dynamik der Veränderung pro Isoform im Striatum deutlich von der des Cerebellums. Vergleicht man die erste (10 Tage) und die letzte Altersstufe (465 Tage), nimmt im Striatum die Konzentrationsänderung im Verlauf der Erkrankung zu, während sie im Cerebellum im frühesten und spätesten Stadium gleich ist. Die gefundenen Veränderungen zeigen sich sowohl ohne als auch mit Einführung einer minimalen Expressionsveränderung der Proteine von 10 %.

In einem nächsten Schritt wurden die bei der jüngsten Altersstufe (10 Tage) veränderten Proteine durch Massenspektrometrie identifiziert. Bei der Untersuchung der nicht redundanten Proteine wurde deutlich, dass sich im präsymptomatischen Striatum deutlich mehr Veränderungen finden als im Cerebellum. Bei der anschließenden KEGG-Pathway-Analyse zeigte sich, dass im Cerebellum kein einziger Pathway verändert ist, während sich im Striatum jeweils sechs signifikant veränderte Pathways finden. Davon zeigen fast alle (fünf) eine verminderte Proteinexpression. Die meisten Veränderungen betreffen den Energiestoffwechsel der Zelle: hier sind drei Pathways verändert, die alle eine verminderte Proteinexpression zeigen. Allerdings sind auch andere zentrale Bereiche der Zelle betroffen wie Axonleitung, Aminosäuremetabolismus und Zelltod. Darüber hinaus sind zahlreiche, nicht pathway-assoziierte Proteine verändert, die weitere zentrale Bereiche der Zelle betreffen, unter anderem Zytoskelett, Ubiquitin-Proteasom-System, oxidativer Stress, Heat-shock-Antwort und Vesikeltransport. Die beschriebenen Veränderungen sowohl auf Pathway-Ebene als auch auf Ebene der individuellen Proteine finden sich beim Cerebellum nicht.

4.1 Früheste Proteomstudie zu HD im Tiermodell

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung sehr früher Proteomveränderungen bei HD. Präsymptomatische Veränderungen auf Proteinebene sind für das Verständnis der Erkrankung von zentraler Bedeutung. Durch die frühe Veränderung zentraler Proteine kann die Entwicklung und Funktion der Zelle nachhaltig und auf lange Sicht geschädigt werden. Bildgebende Verfahren am Menschen zeigen schon bei präsymptomatischen Genträgern anatomische [96-98] und funktionale [99-101] Veränderungen im Gehirn. Darüber hinaus ist bei präsymptomatischen Genträgern mehrfach ein gestörter Glukosemetabolismus insbesondere im Striatum gezeigt worden [102-104]. Offensichtlich gibt es also schon vor Ausbruch der Erkrankung weitgehende Veränderungen im Gehirn.

Die Proteomuntersuchungen von Tiermodellen für HD sind in ihrer Zahl beschränkt [110,112-115]. Sie wurden alle am R6/2-Mausmodell durchgeführt und konzentrierten sich in ihrer Mehrzahl auf spätere Phasen der Erkrankung. Beim R6/2-Modell treten erste Symptome im Alter von 3,5 Wochen in Form kognitiver Defizite auf, erste motorische Symptome entwickeln sich im Alter von 5 Wochen [130]. Bei drei der angeführten Arbeiten lag der früheste Untersuchungszeitpunkt bei 4 Wochen [112,113,115], also bereits nach Auftreten von Symptomen. Eine der Studien hatte als Untersuchungszeitpunkt 12 Wochen [114], was einem bereits weit fortgeschrittenen Krankheitsphänotyp entspricht. Nur eine Arbeit untersuchte mit 2 Wochen einen präsymptomatischen Erkrankungszeitpunkt [110], der

allerdings nur 1,5 Wochen vor der Entwicklung erster Symptome und nur 3 Wochen vor Ausbruch der motorischen Symptomatik liegt.

Demgegenüber wurde in dieser Arbeit eine viel frühere Phase der Erkrankung untersucht (10 Tage). Beim verwendeten CAG-51-Rattenmodell kommt es im Alter von 4 Wochen zu ersten subtilen Symptomen in Form von Angstreduktion, erste motorische Defizite werden dagegen erst im Alter von 6 Monaten beobachtet und erste kognitive Defizite im Alter von 9 Monaten [121]. Der gewählte frühe Untersuchungszeitpunkt von 10 Tagen liegt also 2,5 Wochen vor Beginn erster emotionaler Auffälligkeiten, mehr als 5,5 Monate vor Ausbruch der motorischen Symptomatik und mehr als 8,5 Monate vor Beginn kognitiver Defizite. Somit handelt es sich um den frühesten bisher in einer Proteomstudie für HD im Tiermodell untersuchten Erkrankungszeitpunkt. Umso bemerkenswerter ist die hohe Anzahl an Veränderungen, die bereits zu diesem Zeitpunkt vorhanden sind – eine neuer Befund, der bisher in keiner Proteomstudie für HD gezeigt werden konnte.

4.2 Die Einführung einer minimalen Expressionsänderung bestätigt die gefundenen Ergebnisse und erhöht die Stringenz

Die Daten im Ergebnisteil wurden jeweils mit und ohne eine minimale Expressionsänderung der Proteine untersucht. Dies konnte anhand der mit DELTA2D ermittelten, quantitativen Daten leicht umgesetzt werden. Die Grenze von 10 % minimaler Expressionsänderung wurde durch frühere Studien in unserem Labor gefunden [110,114]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigt auch diese Arbeit, dass die grundlegenden Aussagen bei der Datenauswertung erhalten bleiben, wenn man eine zusätzliche Beschränkung von 10 % Expressionsveränderung einführt. Da dadurch die Stringenz erhöht wird, sollten die Werte mit einer minimalen Expressionsänderung von 10 % Grundlage der Auswertung von Proteomstudien sein.

4.3 Veränderungen im Energiestoffwechsel sowie anderen zentralen Bereichen der Zelle gehen dem HD- Krankheitsphänotyp weit voraus

4.3.1 KEGG-Pathways

Es konnte gezeigt werden, dass im Striatum bei der frühesten untersuchten Altersstufe (10 Tage), also noch deutlich vor Auftreten erster Symptome, bereits zahlreiche Veränderungen auf Proteinebene zu finden sind. Die Anzahl der bereits früh veränderten Proteine liegt etwa im

gleichen Größenbereich wie die Veränderungen bei der letzten Krankheitsstufe mit fortgeschrittenem Phänotyp. Dies deckt sich mit neuesten Erkenntnissen für das R6/2 – Mausmodell [110].

Die veränderten Proteine der präsymptomatischen Altersstufe (10 Tage) wurden für das Striatum und Cerebellum mittels Massenspektrometrie identifiziert und einer KEGG-Pathway-Analyse unterzogen. Dabei zeigten sich im Striatum jeweils sechs signifikant veränderte Pathways (einer \uparrow , fünf \downarrow), im Cerebellum kein einziger.

4.3.1.1 Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels

Der Energiestoffwechsel der Zelle scheint von den frühen Veränderungen am stärksten betroffen zu sein. Drei der im Striatum veränderten Pathways sind dem zellulären Energiestoffwechsel zuzuordnen: Glykolyse/Glukoneogenese, Pentosephosphatweg und Fruktose-/Mannosemetabolismus. Alle drei Pathways zeigen eine verminderte Proteinexpression. Aldolase (*Aldoc*) und Phosphofruktokinase (*Pfkm*) sind als zentrale Enzyme der Glykolyse vermindert exprimiert, während die Lakdehydrogenase (*Ldhd*), ein weiteres Schlüsselenzym der Glykolyse, vermehrt exprimiert wird. Vor einiger Zeit konnte im Zellkulturmodell für HD gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von *Pfkm* den polyglutamininduzierten Zelltod verzögern kann [131]. Somit könnte die beobachtete frühe Expressionsverminderung der *Pfkm* Teil eines Pathomechanismus bei HD sein.

Die vorliegenden Ergebnisse decken sich mit Erkenntnissen zahlreicher anderer Arbeiten, wo wiederholt und in verschiedenen Krankheitsmodellen frühe Veränderungen im Energiemetabolismus bei HD aufgezeigt werden konnten [13,111,132]. Interessanterweise legen die Ergebnisse funktionaler Bildgebung (PET) mit Messung des Glukoseverbrauchs beim Menschen einen Hypometabolismus im Gehirn präsymptomatischer Genträger für HD nahe [102-104]. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Mausmodell wiederholt ein früher Hypermetabolismus mit gesteigerter Glykolyse [110,132]. Eine schlüssige Erklärung für diesen Widerspruch gibt es bisher nicht. In der vorliegenden Arbeit, bei der Untersuchung eines Rattenmodells für HD, zeigen jedoch alle veränderten Pathways, die am Energiestoffwechsel beteiligt sind, eine verminderte Proteinexpression, was den Befunden beim Menschen besser entspricht als die Ergebnisse aus den Mausmodellen.

Die frühe Störung des Energiemetabolismus bei HD könnte ihre Ursache in der durch polyQ-Htt verminderten Expression von PGC-1 α haben, einem Coaktivator der Transkription, der zahlreiche Stoffwechselwege der Zelle beeinflusst [90,133].

4.3.1.2 Zentrales Protein Cdk5

Im Pathway der Axonleitung/-sprossung konnte eine verminderte Expression der Cyclin-dependant Kinase 5 (*Cdk5*) gezeigt werden. Die *Cdk5* ist eine für die Entwicklung des Gehirns und die Aufrechterhaltung seiner Funktion zentrale Kinase. Sie wirkt einerseits neuroprotektiv, unter pathologischen Umständen hingegen wird sie durch Bindung an p25 übermäßig aktiviert und trägt zur Neurodegeneration bei zahlreichen Erkrankungen des ZNS wie AD, PD und HD bei. Diese Doppelfunktion hat ihr die Bezeichnung „Jekyll-und-Hyde-Kinase“ eingebracht [134]. Auch bei HD ist ihre Rolle nicht vollständig geklärt. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *Cdk5* bei HD neuroprotektiv wirkt, indem sie Htt phosphoryliert und dadurch seine Toxizität vermindert [135-137]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen könnte also die hier gefundene früh verminderte Expression von *Cdk5* einen Verlust ihrer neuroprotektiven Funktion implizieren und damit zur Pathogenese von HD beitragen. Andererseits zeigte sich in einer aktuellen Arbeit, dass *Cdk5* durch pathologische Aktivierung den exzitotoxischen Zelltod bei HD fördert [138]. Weitere Forschung wird notwendig sein, um die Funktion der *Cdk5* bei HD vollständig zu klären.

4.3.2 Veränderungen auf Einzelproteinebene

Betrachtet man die Veränderungen auf Ebene der nicht KEGG-pathway-assoziierten Proteine im Striatum, so fällt auf, dass zahlreiche weitere zentrale Bereiche der Zelle betroffen sind.

4.3.2.1 Proteine des Zytoskeletts

Insgesamt sind sechs Proteine des Zytoskeletts verändert: Aktin β (*Actb*), ARP3 (*Actr3*), Tropomyosin 3 (*Tpm3*), Tropomyosin 4 (*Tpm4*), Tubulin Cofaktor A (*Tbca*) und Tubulin α 1 (*Tuba1*). Dies stimmt mit Erkenntnissen aus früheren Arbeiten überein, in denen gezeigt wurde, dass Veränderungen insbesondere der auch hier betroffenen Mikrotubuli mit den damit einhergehenden intrazellulären Transportstörungen Teil der Pathologie bei HD sind [139]. Das unerwartete und neue Ergebnis dieser Arbeit ist der frühe Zeitpunkt dieser Veränderungen.

4.3.2.2 Ubiquitin-Proteasom-System

Zusätzlich finden sich fünf veränderte Proteine, die dem Ubiquitin-Proteasom-System der Zelle zuzuordnen sind: Proteasom Subunit α 5 (*Psm α 5*), S-Phase Kinase-assoziiertes Protein 1A (*Skp1a*), Ubiquitin-conjugating enzyme E2 (*Ube2v1*), Ubiquitin Carboxyhydrolase L1 (*Uchl1*) und Ubiquitin-spezifische Peptidase 14 (*Usp14*). Eine Störung des Ubiquitin-

Proteasom-Systems wird mittlerweile als einer der Hauptmechanismen des neuronalen Untergangs bei HD angesehen. Zahlreiche Arbeiten haben dies hervorgehoben. Zuletzt wurde eine globale Störung des Ubiquitin-Systems bei HD nachgewiesen [68].

4.3.2.3 Mitochondrialer Stoffwechsel

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, dass neben der bereits diskutierten pathway-assoziierten Störung des frühen Energiehaushalts bei HD Proteine auf Einzelzebene verändert sind, die den mitochondrialen Stoffwechsel betreffen: Acyl-CoenzymA-Dehydrogenase (*Acadvl*), 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (*Bdh1*) und Mitochondrial inner membrane protein (*Immt*). Somit könnte ein früh gestörter mitochondrialer Stoffwechsel Teil der schon beschriebenen Störung des Energiestoffwechsels (Energiehaushalt) bei HD sein [13,111]. Wie bereits erörtert könnte dies mit einer gestörten Transkription von PGC-1 α zusammenhängen [90,133].

4.3.2.4 Transkription

Es fanden sich Veränderungen zweier Proteine, die im Zusammenhang mit der Transkription stehen (Heterogenous nuclear ribonucleoprotein K (*Hnrpk*) und DEAD box polypeptide 5 (*Ddx5*)). Eine generelle Störung der Transkription gilt im Zusammenhang mit der Pathologie von HD als gesichert, worauf bereits zahlreiche Arbeiten hingewiesen haben [72-75,140].

4.3.2.5 Vesikeltransport

Es wurde mehrfach gezeigt, dass bei HD der Vesikeltransport, beispielsweise Endo- und Exozytose, gestört sind [39]. Es konnte in dieser Arbeit nun gezeigt werden, dass bereits in einem sehr frühen Erkrankungsstadium zwei Proteine verändert sind, die am Vesikeltransport beteiligt sind, zum einen Lin7a (*Lin7a*), zum anderen die leichte Kette des für die Endozytose zentralen Proteins Clathrin (*Cltb*). In diesem Zusammenhang wurde eine enge funktionale Verbindung zwischen dem Huntingtin interacting protein 1 (*Hip1*) und Clathrin nachgewiesen [141].

4.3.2.6 Oxidativer Stress

Peroxiredoxine sind zellschützende antioxidative Proteine, die bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen verändert sind [114]. Sie sind an der Oxidativen-Stress-Antwort der Zelle beteiligt. In einer aktuellen Proteomstudie an humanem Post-mortem-Gewebe wurde die veränderte Expression zahlreicher Peroxiredoxine im Gehirn nachgewiesen [142]. In dieser

Arbeit konnte die Veränderung von Peroxiredoxin 1 (*Prdx1*) und Peroxiredoxin 2 (*Prdx2*) bereits im präsymptomatischen Krankheitsstadium gezeigt werden.

4.3.2.7 Heat-Shock-Antwort

Es zeigt sich weiterhin eine veränderte Expression zweier Proteine, die an der Heat-Shock-Antwort der Zelle beteiligt sind: Grp 75 (*Hspa9*) und Hsc 70 (*Hspa8*). Es wurde mehrfach nachgewiesen, dass hohe Konzentrationen an Hsc 70 (*Hspa8*) die Zelle vor dem polyglutamininduzierten Zelltod schützen können [143,144]. Die hier gefundene früh verminderte Expression Hsc 70 könnte somit durch eine verminderte zellprotektive Funktion zur Pathogenese von HD beitragen.

Generell kann also festgestellt werden, dass in der vorliegenden Studie viele Veränderungen gefunden wurden, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, sowohl auf Pathway- als auch auf Einzelproteinebene. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Veränderungen schon sehr früh und ohne Symptomatik auftreten, was den Kenntnisstand über dynamische Veränderungen beim Fortschreiten von HD entscheidend erweitert.

4.4 Vom Schweregrad der Erkrankung unabhängiger Peak der Veränderungen bei 70 Tagen

Als weiteres bemerkenswertes Ergebnis zeigte sich, dass der Peak der Proteinveränderungen für beide Gehirnregionen bei 70 Tagen liegt, also zu einem Zeitpunkt, an dem ein früher und milder Krankheitsphänotyp ohne motorische Symptome vorherrscht. Ungewöhnlich ist dabei insbesondere die Tatsache, dass die Altersstufe mit weit fortgeschrittenem Phänotyp (465 Tage) deutlich weniger Veränderungen aufweist. Der Schweregrad scheint also nicht von der Anzahl der zu diesem Zeitpunkt veränderten Proteine abzuhängen.

Neuere Ergebnisse aus Mausmodellen für HD [110] und AD [145] zeigten durch einen longitudinalen Vergleich der einzelnen Altersstufen bei gesunden Kontrolltieren einen Peak an Proteinveränderungen bei etwa 2 Monaten. Dieses Alter entspricht der Adoleszenz von Mäusen und Ratten und ist durch eine erhöhte Plastizität mit zahlreichen Neuerschaltungen und Differenzierungen im Gehirn gekennzeichnet [145]. Der zu diesem Zeitpunkt auftretende Peak bei den Proteinveränderungen ist also physiologisch begründet und durch die hohe Dynamik in der Gehirnentwicklung bedingt. Im Mausmodell für die AD (APP23) konnte nun gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Kontrollmäusen dieser Peak im Verlauf der Entwicklung der APP23-Mäuse nicht auftritt, was eine schon früh angelegte Störung

kognitiver Funktionen nahelegt. Die Vermutung liegt also nahe, dass die Krankheit durch frühe Veränderungen auf molekularer Ebene gekennzeichnet ist, die die adoleszenzspezifische hohe Plastizität im Gehirn unterdrücken [145]. Ob der Peak durch die Erkrankung vollständig supprimiert oder nur verschoben wird, bleibt eine bislang noch offene Frage.

Ein longitudinaler Vergleich zwischen den einzelnen Altersstufen wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da zu wenige Zeitpunkte untersucht wurden und der letzte Zeitpunkt (465 Tage) sehr weit vom mittleren (70 Tage) entfernt lag. Beim Vergleich von HD- und Kontrollproben zeigte sich jedoch ein Peak an Proteinveränderungen bei 70 Tagen, also bei etwa 2 Monaten. Analog zu den dargelegten Überlegungen im Mausmodell für AD könnte man nun spekulieren, dass durch polyQ-Htt eine frühe Veränderung im Gehirn ausgelöst wird, die die hohe neuronale Plastizität während der Adoleszenz der kranken Tiere bei etwa 2 Monaten unterdrückt oder verschiebt. Es würden sich im untersuchten Rattenmodell bei gesunden Kontrolltieren zahlreiche plastizitätsbedingte Veränderungen finden, die bei kranken Tieren HD-bedingt fehlen. Dies könnte den Peak der Veränderungen bei 70 Tagen erklären. Der Peak würde also nicht durch ein „Mehr“ sondern ein „Weniger“ an Veränderungen bei HD entstehen. Da dieser Peak auch im Cerebellum zu finden ist, könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass HD weit früher als bisher angenommen Proteinveränderungen im ganzen Gehirn verursacht [146].

Dies macht deutlich, dass eine Theorie linearer krankheitsspezifischer Proteinveränderungen - je fortgeschrittener die Erkrankung, desto zahlreicher sind die Veränderungen - nicht zutreffend sein kann. Vielmehr scheinen Proteinveränderungen im Gehirn hochdynamisch zu sein und auch von physiologischen Prozessen wie Wachstum und Differenzierung des Gesamtorganismus abzuhängen [110,145]. Eine hohe Anzahl an gefundenen Veränderungen muss also keinesfalls mit der Schwere der Erkrankung zusammenhängen.

4.5 Starker Expressionsoverlap bei HD mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen

Viele Veränderungen auf Proteinebene sind nicht krankheitsspezifisch, sondern finden sich bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen. Dies könnte daran liegen, dass verschiedene pathogene Veränderungen letztlich dieselben Pathways beeinflussen [147]. Dafür spricht, dass unterschiedliche neurodegenerative Erkrankungen oft einen ähnlichen Krankheitsphänotyp zeigen. Durch Vergleich von insgesamt 14 Proteomstudien für vier verschiedene neurodegenerative Erkrankungen (Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), AD, PD, und HD)

konnten in einer aktuellen Übersichtsarbeit zahlreiche Proteine identifiziert werden, die bei mehreren der genannten Erkrankungen verändert sind [148]. Man spricht in diesem Fall von Expressionsoverlap.

Die in Tabelle 32 und Tabelle 33 aufgeführten Proteine wurden für das Striatum und das Cerebellum mit den Daten von Zabel et al. (2008) verglichen. Dabei fanden sich für das Striatum zahlreiche Proteine, die auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen verändert sind. Im Gegensatz dazu zeigte sich beim Cerebellum nur bei einem Protein eine Übereinstimmung. Lediglich für Peroxiredoxin 1 war eine Änderung auch bei HD bekannt, die anderen aufgeführten Proteine waren in den eingeschlossenen Studien nicht als bei HD verändert beschrieben worden. Im Folgenden sind die Proteine aufgelistet, die einen Overlap mit den in dieser Arbeit gefundenen Veränderungen zeigen. Dahinter sind die Krankheiten angegeben, bei denen sie als verändert gefunden wurden.

Tabelle 34: Expressionsoverlap früh veränderter Proteine bei HD mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen

Gehirnregion	Verändertes Protein	Expressionsoverlap mit
Striatum	Peroxiredoxin 1 (<i>Prdx1</i>)	AD, PD und HD
	Aktin β (<i>Aktb</i>)	AD, PD und ALS
	Peroxiredoxin 2 (<i>Prdx2</i>)	AD und PD
	Nukleosid-Diphosphatase-Kinase (<i>Nme2</i>)	PD und ALS
	Aldolase C (<i>Aldoc</i>)	AD und PD
	Dihydropyrimidinase-related Protein 2 (<i>Dpysl2</i>)	AD und PD
	Hsc 70 (<i>Hspa8</i>)	AD und PD
	Grp 75 (<i>Hspa9</i>)	AD und PD
	Ubiquitin-Ca-Terminal-Hydrolase 1 (<i>Uchl1</i>)	PD und AD
Cerebellum	Stathmin 1 (<i>Stmn1</i>)	ALS

Aufstellung nach Zabel et al. 2008 [148]

Die aufgeführten Proteine zeigen also einen signifikanten Expressionsoverlap zwischen unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen und können daher nicht als krankheitsspezifisch angesehen werden. Eine Veränderung dieser Proteine scheint generell für einen gemeinsamen pathologischen Prozess zu sprechen. So konnte in einer aktuellen Arbeit gezeigt werden, dass durch Hyper- bzw. Hypoosmose teilweise ähnliche Veränderungen auf Proteinebene ausgelöst werden können wie durch neurodegenerative Erkrankungen (AD, PD

und HD) [147]. Die Spezifität der einzelnen neurodegenerativen Erkrankung ergibt sich daher vermutlich weniger durch die Art der Veränderung (die durch Expressionsoverlap bei vielen pathologischen Zuständen ähnlich ist) als vielmehr durch den Ort im Gehirn und das spezifische Milieu, in dem diese Veränderungen stattfinden [148]. Dafür spricht, dass im Striatum ein deutlich größerer Expressionsoverlap mit anderen Erkrankungen gefunden wurde als im Cerebellum. Im Fall von HD könnte es also sein, dass nicht die Tatsache krankheitsspezifisch ist, dass diese Proteine verändert sind, sondern dass sie im Striatum verändert sind und nicht im Cerebellum.

4.6 Obwohl das Cerebellum schon früh im Verlauf stark betroffen ist, zeigen sich Unterschiede in der Pathologie

Ein auffälliges Ergebnis bestand darin, dass Striatum und Cerebellum bei der Anzahl der gefundenen Veränderungen zu Beginn der Erkrankung stark divergieren, sich aber schon früh im Verlauf (ab 70 Tagen) einander annähern. Dies bestätigt die aus neuropathologischen [26] und bildgebenden Untersuchungen [98] bekannte Tatsache, dass HD ab einem gewissen Krankheitsstadium keineswegs auf Striatum und Cortex beschränkt bleibt, sondern das gesamte Gehirn betrifft. Die hier gefundenen Ergebnisse legen nahe, dass dies möglicherweise früher im Krankheitsverlauf geschieht, als bisher angenommen [146]. Die mittlere Altersstufe von 70 Tagen entspricht einem frühen Erkrankungsstadium, an dem die Tiere noch fast 4 Monate von motorischen und fast 7 Monate von kognitiven Symptomen entfernt sind. Die einzige detektierbare Verhaltensauffälligkeit zu diesem frühen Zeitpunkt besteht in einer verminderten Angstreaktion. Die Möglichkeiten, frühe Veränderungen in anderen Gehirnregionen neuropathologisch nachzuweisen, sind naturgemäß sehr eingeschränkt, da die meisten an HD Erkrankten in einem weit fortgeschrittenen Stadium versterben. Bildgebende Verfahren sind trotz großer Verfeinerung noch immer zu grob, um subtile Veränderungen schon früh zu detektieren.

Es zeigte sich als weiteres erstaunliches Ergebnis, dass im Striatum die Proteinveränderung pro Isoform im Schnitt größer ist als im Cerebellum, wobei dieser Unterschied im Krankheitsverlauf noch zunimmt. Ebenso unterscheidet sich die zeitliche Dynamik der Veränderung pro Isoform im Striatum deutlich von der des Cerebellums. Vergleicht man die erste (10 Tage) und die letzte Altersstufe (465 Tage) nimmt im Striatum die Konzentrationsänderung pro Isoform im Verlauf der Erkrankung zu, während sie im Cerebellum gleich bleibt. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass trotz ähnlicher Anzahl an Veränderungen ab 70 Tagen die Krankheit in beiden Gehirnregionen stark

unterschiedlich verläuft. Dies wird auch durch den klinischen Krankheitsphänotyp beim Menschen bestätigt, der in erster Linie von extrapyramidalmotorischer und kortikaler Symptomatik geprägt ist, weniger von cerebellärer.

Zur Klärung dieser Hypothesen müssten für das Striatum und das Cerebellum die Proteine der anderen beiden Altersstufen identifiziert werden (70 Tage und 465 Tage), so dass dann genauere Aussagen zur Krankheitsspezifität der Veränderungen gefällt werden könnten.

4.7 Transgenes Rattenmodell eignet sich gut für die Untersuchung früher Krankheitsstadien in unterschiedlichen Gehirnregionen

Viele Proteomstudien zu HD am Tiermodell wurden am transgenen R6/2-Mausmodell durchgeführt [110,112-115]. Es hat sich als gutes Modell für die Erforschung der Erkrankung erwiesen, da es zahlreiche Schlüsselmerkmale von HD zeigt: progrediente motorische Symptomatik, Ausbildung von NIIs, kognitiven Defiziten und emotionalen Auffälligkeiten. Allerdings ähnelt es durch die sehr hohe Zahl an CAG-Repeats (zwischen 141 und 157) und dem dadurch bedingten sehr frühen Erkrankungsbeginn mit rapidem Verlauf eher der seltenen juvenilen Form von HD beim Menschen. Dies macht das Modell weniger geeignet für eine Erforschung der Adult-onset-Form von HD, wie sie beim Menschen in den meisten Fällen auftritt [42].

Demgegenüber bietet das transgene CAG-51-Rattenmodell deutliche Vorteile. Die relativ geringe Zahl von 51 CAG-Repeats bewirkt einen verzögerten (late-onset) Krankheitsbeginn mit progredienter motorischer Symptomatik, dem wie beim Menschen emotionale Auffälligkeiten vorausgehen [120]. Dadurch bildet es den häufigsten Adult-onset-Krankheitsverlauf beim Menschen deutlich besser ab als das R6/2-Mausmodell. Der späte Krankheitsbeginn macht das Modell insbesondere zum Studium früher Veränderungen sehr geeignet. Im Hinblick auf eine Proteomstudie bietet es weitere entscheidende Vorteile gegenüber dem Mausmodell. Durch das größere Gehirnvolumen der Ratte können verschiedene Gehirnregionen leicht und sicher getrennt präpariert und untersucht werden, was bei der Maus nicht so einfach möglich ist. Proteomstudien lassen keine Amplifikationen des Probenmaterials zu und sind daher auf ausreichende Probenmengen angewiesen. Größere Gehirnregionen ermöglichen die Entnahme größerer Probenmengen, was Fehlerquellen bei der Proteomstudie in Bezug auf die Gehirnregionsspezifität deutlich verringert.

Trotzdem ist kein Krankheitsmodell für HD perfekt, und so hat auch das transgene CAG-51-Rattenmodell Nachteile. Obwohl es wesentliche pathogenetische Schlüsselmomente der Erkrankung gut abbildet, ist die verzögerte Entwicklung kognitiver Symptome mit 9 Monaten,

also 3 Monate nach Beginn der motorischen Symptomatik, für die menschliche Form der HD untypisch. Beim Menschen gehen kognitive Defizite der motorischen Symptomatik in vielen Fällen voraus [10]. Außerdem ist davon auszugehen, dass bestimmte beim Menschen auftretende komplexe psychische und kognitive Symptome beim Tier keine Entsprechung haben [116]. Darüber hinaus deckt das Modell nicht den ganzen Zeitraum der Erkrankung ab. Die kranken Tiere sterben mit durchschnittlich 24 Monaten früher als ihre Wildtyp- Artgenossen, die bis zu 18 Monate länger leben [149], aber es ist nicht klar, ob die terminale Phase pathogenetisch der von HD beim Menschen ähnelt. So könnte es sein, dass die CAG-51-Ratten zwar vorzeitig sterben, aber nicht an HD, sondern an einer anderen durch die genetische Manipulation bedingten Störung.

Ein genereller Nachteil transgener Tiermodelle im Gegensatz zu Knock-in-Modellen besteht darin, dass das krankheitsverursachende Gen zusätzlich zu den normalen Allelen des Tieres eingebracht wird. Dies führt dazu, dass transgene Tiere drei Kopien des Gens besitzen. Das entspricht nicht der Genetik beim Menschen, der stets nur zwei Kopien des Gens trägt. Somit könnte das zusätzlich eingebrachte Gen mit anderen Abläufen in der Zelle interferieren und eine Pathologie verursachen, die nicht für die menschliche Form der HD spezifisch ist [117].

5 Zusammenfassung

Zur Identifizierung früher Veränderungen im Krankheitsverlauf der HD wurde in dieser Arbeit ein Großgel-2D-Elektrophorese-gestützter Proteomics-Ansatz in Kombination mit Massenspektrometrie verwendet. Als Krankheitsmodell diente das transgene CAG-51-Rattenmodell, das mit einem verzögerten Krankheitsbeginn und progredienter motorischer, emotionaler und kognitiver Symptomatik wesentliche pathogenetische Momente bei HD gut abbildet. Es eignet sich in besonderem Maße zur Untersuchung früher Veränderungen. Es wurden zwei unterschiedliche Gehirnregionen untersucht: das Striatum als primärer Ort der Pathologie bei HD und das Cerebellum als deutlich später betroffene Region. Untersucht wurden drei Altersstufen: eine präsymptomatische, eine frühe und eine mittlere, wobei die präsymptomatische mit 10 Tagen den frühesten bisher in einer Proteomstudie für HD im Tiermodell untersuchten Zeitpunkt darstellt.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit zeigte sich, dass es bereits im präsymptomatischen Stadium zu deutlichen Veränderungen auf Proteinebene im Striatum kommt, welche sich beim Cerebellum nicht in diesem Ausmaß finden. Eine Pathwayanalyse ergab im Striatum jeweils sechs signifikant veränderte Pathways, von denen fast alle (fünf) eine verminderte Proteinexpression zeigten. Im Cerebellum zeigte sich hingegen kein einziger signifikant veränderter Pathway. Die Veränderungen im Striatum betreffen in erster Linie den Energiehaushalt der Zelle im Sinne eines frühen Hypometabolismus im Gehirn, der sich auch beim Menschen findet. Allerdings sind auch andere zentrale Bereiche der Zelle betroffen: Axonleitung, Aminosäuremetabolismus und Zelltod. Auf der Ebene nicht-pathway-assoziiertes Proteine finden sich Veränderungen in den Bereichen Zytoskelett, Ubiquitin-Proteasom-System, mitochondrialer Stoffwechsel, Transkription, oxidativer Stress, Heat-shock-Antwort und Vesikeltransport. Es konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass diese Veränderungen bereits sehr früh im Krankheitsverlauf Bestandteil der Pathologie bei HD sind.

Ein weiteres, unerwartetes Ergebnis war ein Peak der Proteinveränderungen, der beim Striatum und beim Cerebellum bei etwa 2 Monaten liegt – ein frühes Erkrankungsstadium mit sehr milder Symptomatik. Der Peak ist damit von der Schwere der Erkrankung unabhängig. Analog zu Erkenntnissen bei HD und AD im Mausmodell wird hier die Vermutung geäußert, dass die fortschreitende HD-Pathologie zu einer Unterdrückung oder Verschiebung der physiologischen hohen Plastizität im Gehirn adoleszenter Ratten bei etwa 2 Monaten führen könnte, was den hier gefundenen Peak erklären würde. Dies würde eine schon früh gestörte

Plastizität im Gehirn implizieren und könnte ein Korrelat für die frühen kognitiven Störungen bei HD sein. In jedem Fall zeigte sich deutlich, dass eine Theorie von im Krankheitsverlauf linearen Veränderungen der Anzahl der Proteine nicht zutreffend sein kann.

Striatum und Cerebellum divergieren zu Beginn der Erkrankung noch stark, was die Anzahl der Veränderungen betrifft, nähern sich aber schon früh im Verlauf (ab 70 Tagen) einander an. Dies könnte dafür sprechen, dass HD schon früher als bisher angenommen andere Gehirnregionen als Striatum und Cortex betrifft. Allerdings legt die gefundene unterschiedliche Dynamik der Veränderung pro Isoform in Striatum und Cerebellum einen in beiden Gehirnregionen unterschiedlichen Krankheitsverlauf nahe. Zur Klärung dieser Frage müssten die Proteine der beiden späteren Altersstufen massenspektrometrisch identifiziert werden. Dies würde Aussagen zur Krankheitsspezifität der Veränderungen zu allen drei Untersuchungszeitpunkten im Striatum und im Cerebellum erlauben.

Für das Striatum konnte ein deutlicher Expressionsoverlap mit Proteinen nachgewiesen werden, die auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie AD, PD und ALS verändert sind. Dies spricht für die Theorie, dass weniger die Art der Veränderungen krankheitsspezifisch ist, als vielmehr der Ort im Gehirn und das spezifische Milieu, in dem sie stattfinden.

A. Literaturverzeichnis

1. Wanker E, Dröge A: Structural biology of Huntington's disease. in Harper P (ed): Huntington's Disease. Oxford: Oxford University Press, 2002, 327.
2. Margolis RL, Ross CA: Expansion explosion: new clues to the pathogenesis of repeat expansion neurodegenerative diseases. Trends Mol Med 2001;7:479-482.
3. 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 1993;72:971-983.
4. Kremer B: Clinical neurology of Huntington's disease. in Harper P (ed): Huntington's Disease. Oxford: Oxford University Press, 2002, 28-61.
5. Harper P: Huntington's disease: a historical background. in Harper P (ed): Huntington's Disease. Oxford: Oxford University Press, 2002, 3-27.
6. Ho LW, Carmichael J, Swartz J, Wytttenbach A, Rankin J, Rubinsztein DC: The molecular biology of Huntington's disease. Psychol Med 2001;31:3-14.
7. Norremolle A, Riess O, Epplen JT, Fenger K, Hasholt L, Sorensen SA: Trinucleotide repeat elongation in the Huntingtin gene in Huntington disease patients from 71 Danish families. Hum Mol Genet 1993;2:1475-1476.
8. Zuhlke C, Riess O, Schroder K, Siedlaczek I, Epplen JT, Engel W, Thies U: Expansion of the (CAG)_n repeat causing Huntington's disease in 352 patients of German origin. Hum Mol Genet 1993;2:1467-1469.
9. Claes S, Van Zand K, Legius E, Dom R, Malfroid M, Baro F, Godderis J, Cassiman JJ: Correlations between triplet repeat expansion and clinical features in Huntington's disease. Arch Neurol 1995;52:749-753.
10. Craufurd D, Snowden J: Neuropsychological and neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. in Harper P (ed): Huntington's Disease. Oxford: Oxford University Press, 2002, 62-94.
11. Penney JB, Jr., Young AB, Shoulson I, Starosta-Rubenstein S, Snodgrass SR, Sanchez-Ramos J, Ramos-Arroyo M, Gomez F, Penchaszadeh G, Alvir J, et al.: Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. Mov Disord 1990;5:93-99.
12. Petersen A, Gil J, Maat-Schieman ML, Bjorkqvist M, Tanila H, Araujo IM, Smith R, Popovic N, Wierup N, Norlen P, Li JY, Roos RA, Sundler F, Mulder H, Brundin P: Orexin loss in Huntington's disease. Hum Mol Genet 2005;14:39-47.
13. Mochel F, Charles P, Seguin F, Barritault J, Coussieu C, Perin L, Le Bouc Y, Gervais C, Carcelain G, Vassault A, Feingold J, Rabier D, Durr A: Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. PLoS ONE 2007;2:e647.
14. Nance MA, Sanders G: Characteristics of individuals with Huntington disease in long-term care. Mov Disord 1996;11:542-548.

15. Durr A, Hahn-Barma V, Brice A, Pecheux C, Dode C, Feingold J: Homozygosity in Huntington's disease. *J Med Genet* 1999;36:172-173.
16. Foroud T, Gray J, Ivashina J, Conneally PM: Differences in duration of Huntington's disease based on age at onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;66:52-56.
17. Telenius H, Kremer HP, Theilmann J, Andrew SE, Almqvist E, Anvret M, Greenberg C, Greenberg J, Lucotte G, Squitieri F, et al.: Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)_n repeat length is the sex of the affected parent. *Hum Mol Genet* 1993;2:1535-1540.
18. Seneca S, Fagnart D, Keymolen K, Lissens W, Hasaerts D, Debulpaep S, Desprechins B, Liebaers I, De Meirleir L: Early onset Huntington disease: a neuronal degeneration syndrome. *Eur J Pediatr* 2004;163:717-721.
19. Ribai P, Nguyen K, Hahn-Barma V, Gourfinkel-An I, Vidailhet M, Legout A, Dode C, Brice A, Durr A: Psychiatric and cognitive difficulties as indicators of juvenile huntington disease onset in 29 patients. *Arch Neurol* 2007;64:813-819.
20. Sharp AH, Loev SJ, Schilling G, Li SH, Li XJ, Bao J, Wagster MV, Kotzuk JA, Steiner JP, Lo A, et al.: Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 1995;14:1065-1074.
21. Dure LSt, Landwehrmeyer GB, Golden J, McNeil SM, Ge P, Aizawa H, Huang Q, Ambrose CM, Duyao MP, Bird ED, et al.: IT15 gene expression in fetal human brain. *Brain Res* 1994;659:33-41.
22. Myers RH, MacDonald ME, Koroshetz WJ, Duyao MP, Ambrose CM, Taylor SA, Barnes G, Srinidhi J, Lin CS, Whaley WL, et al.: De novo expansion of a (CAG)_n repeat in sporadic Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;5:168-173.
23. Benjamin CM, Adam S, Wiggins S, Theilmann JL, Copley TT, Bloch M, Squitieri F, McKellin W, Cox S, Brown SA, et al.: Proceed with care: direct predictive testing for Huntington disease. *Am J Hum Genet* 1994;55:606-617.
24. Rubinsztein DC, Leggo J, Coles R, Almqvist E, Biancalana V, Cassiman JJ, Chotai K, Connarty M, Crauford D, Curtis A, Curtis D, Davidson MJ, Differ AM, Dode C, Dodge A, Frontali M, Ranen NG, Stine OC, Sherr M, Abbott MH, Franz ML, Graham CA, Harper PS, Hedreen JC, Hayden MR, et al.: 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* 1996;59:16-22.
25. Sharp AH, Ross CA: Neurobiology of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 1996;3:3-15.
26. Vonsattel JP, DiFiglia M: Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:369-384.
27. Kosinski CM, Cha JH, Young AB, Persichetti F, MacDonald M, Gusella JF, Penney JB, Jr., Standaert DG: Huntingtin immunoreactivity in the rat neostriatum: differential accumulation in projection and interneurons. *Exp Neurol* 1997;144:239-247.

28. Andrade MA, Bork P: HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 1995;11:115-116.
29. Kaltenbach LS, Romero E, Becklin RR, Chettier R, Bell R, Phansalkar A, Strand A, Torcassi C, Savage J, Hurlburt A, Cha GH, Ukani L, Chepanoske CL, Zhen Y, Sahasrabudhe S, Olson J, Kurschner C, Ellerby LM, Peltier JM, Botas J, Hughes RE: Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet* 2007;3:e82.
30. White JK, Auerbach W, Duyao MP, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME: Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat Genet* 1997;17:404-410.
31. Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, et al.: Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 1995;269:407-410.
32. Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Cataudella T, Leavitt BR, Hayden MR, Timmusk T, Rigamonti D, Cattaneo E: Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 2003;35:76-83.
33. Canals JM, Checa N, Marco S, Akerud P, Michels A, Perez-Navarro E, Tolosa E, Arenas E, Alberch J: Expression of brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons is regulated by striatal target area. *J Neurosci* 2001;21:117-124.
34. Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF: Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* 2001;276:24713-24718.
35. Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F: Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 2004;118:127-138.
36. McGuire JR, Rong J, Li SH, Li XJ: Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J Biol Chem* 2006;281:3552-3559.
37. DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N: Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997;277:1990-1993.
38. Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castano JG, Aronin N, DiFiglia M: Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* 2000;20:7268-7278.
39. Velier J, Kim M, Schwarz C, Kim TW, Sapp E, Chase K, Aronin N, DiFiglia M: Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp Neurol* 1998;152:34-40.
40. Cornett J, Cao F, Wang CE, Ross CA, Bates GP, Li SH, Li XJ: Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export. *Nat Genet* 2005;37:198-204.

41. Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A: Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 1996;13:196-202.
42. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP: Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996;87:493-506.
43. Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst CA, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, Dure LS, Lindsey R, Hersch SM, Jope RS, Albin RL, Detloff PJ: Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 1997;91:753-763.
44. Gutekunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, Rye D, Ferrante RJ, Hersch SM, Li XJ: Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 1999;19:2522-2534.
45. Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP: Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 1997;90:537-548.
46. Sapp E, Penney J, Young A, Aronin N, Vonsattel JP, DiFiglia M: Axonal transport of N-terminal huntingtin suggests early pathology of corticostriatal projections in Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:165-173.
47. Wellington CL, Singaraja R, Ellerby L, Savill J, Roy S, Leavitt B, Cattaneo E, Hackam A, Sharp A, Thornberry N, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR: Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *J Biol Chem* 2000;275:19831-19838.
48. Graham RK, Deng Y, Slow EJ, Haigh B, Bissada N, Lu G, Pearson J, Shehadeh J, Bertram L, Murphy Z, Warby SC, Doty CN, Roy S, Wellington CL, Leavitt BR, Raymond LA, Nicholson DW, Hayden MR: Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 2006;125:1179-1191.
49. Hermel E, Gafni J, Propp SS, Leavitt BR, Wellington CL, Young JE, Hackam AS, Logvinova AV, Peel AL, Chen SF, Hook V, Singaraja R, Krajewski S, Goldsmith PC, Ellerby HM, Hayden MR, Bredesen DE, Ellerby LM: Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ* 2004;11:424-438.
50. Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, Bromm M, Kazemi-Esfarjani P, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Hayden MR: Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* 1996;13:442-449.
51. Lunke A, Lindenberg KS, Ben-Haiem L, Weber C, Devys D, Landwehrmeyer GB, Mandel JL, Trotter Y: Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* 2002;10:259-269.

52. Kim MJ, Jo DG, Hong GS, Kim BJ, Lai M, Cho DH, Kim KW, Bandyopadhyay A, Hong YM, Kim DH, Cho C, Liu JO, Snyder SH, Jung YK: Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:9870-9875.
53. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH: Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
54. Kim M, Lee HS, LaForet G, McIntyre C, Martin EJ, Chang P, Kim TW, Williams M, Reddy PH, Tagle D, Boyce FM, Won L, Heller A, Aronin N, DiFiglia M: Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *J Neurosci* 1999;19:964-973.
55. Lunke A, Mandel JL: A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 1998;7:1355-1361.
56. Hackam AS, Singaraja R, Wellington CL, Metzler M, McCutcheon K, Zhang T, Kalchman M, Hayden MR: The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *J Cell Biol* 1998;141:1097-1105.
57. Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME: Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 1998;95:55-66.
58. Chun W, Lesort M, Tucholski J, Ross CA, Johnson GV: Tissue transglutaminase does not contribute to the formation of mutant huntingtin aggregates. *J Cell Biol* 2001;153:25-34.
59. Peters PJ, Ning K, Palacios F, Boshans RL, Kazantsev A, Thompson LM, Woodman B, Bates GP, D'Souza-Schorey C: Arfaptin 2 regulates the aggregation of mutant huntingtin protein. *Nat Cell Biol* 2002;4:240-245.
60. Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT: Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5355-5358.
61. Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE: Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 1997;90:549-558.
62. Meriin AB, Mabuchi K, Gabai VL, Yaglom JA, Kazantsev A, Sherman MY: Intracellular aggregation of polypeptides with expanded polyglutamine domain is stimulated by stress-activated kinase MEKK1. *J Cell Biol* 2001;153:851-864.
63. Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B, DeFranco DB, Orr HT, Zoghbi HY: Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* 1998;19:148-154.
64. Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H, Wanker EE: Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 2001;12:1393-1407.

65. Suhr ST, Senut MC, Whitelegge JP, Faull KF, Cuizon DB, Gage FH: Identities of sequestered proteins in aggregates from cells with induced polyglutamine expression. *J Cell Biol* 2001;153:283-294.
66. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR: Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 2001;292:1552-1555.
67. Jana NR, Zemskov EA, Wang G, Nukina N: 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* 2001;10:1049-1059.
68. Bennett EJ, Shaler TA, Woodman B, Ryu KY, Zaitseva TS, Becker CH, Bates GP, Schulman H, Kopito RR: Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* 2007;448:704-708.
69. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT, Jr.: Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 2000;39:2552-2563.
70. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Sten C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Naslund J, Lannfelt L: The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* 2001;4:887-893.
71. Ross CA: Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* 2002;35:819-822.
72. Schaffar G, Breuer P, Boteva R, Behrends C, Tzvetkov N, Strippel N, Sakahira H, Siegers K, Hayer-Hartl M, Hartl FU: Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Mol Cell* 2004;15:95-105.
73. Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim YM, Standaert DG, Hersch SM, Mouradian MM, Young AB, Tanese N, Krainc D: Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 2002;296:2238-2243.
74. Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE, Thompson LM: The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6763-6768.
75. Nucifora FC, Jr., Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA: Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 2001;291:2423-2428.
76. Peters MF, Nucifora FC, Jr., Kushi J, Seaman HC, Cooper JK, Herring WJ, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA: Nuclear targeting of mutant Huntingtin increases toxicity. *Mol Cell Neurosci* 1999;14:121-128.
77. Sanchez I, Xu CJ, Juo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J: Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 1999;22:623-633.

78. Gervais FG, Singaraja R, Xanthoudakis S, Gutekunst CA, Leavitt BR, Metzler M, Hackam AS, Tam J, Vaillancourt JP, Houtzager V, Rasper DM, Roy S, Hayden MR, Nicholson DW: Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1. *Nat Cell Biol* 2002;4:95-105.
79. Ho LW, Brown R, Maxwell M, Wyttenbach A, Rubinsztein DC: Wild type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease. *J Med Genet* 2001;38:450-452.
80. Rigamonti D, Sipione S, Goffredo D, Zuccato C, Fossale E, Cattaneo E: Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J Biol Chem* 2001;276:14545-14548.
81. Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE: Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 1995;15:3775-3787.
82. Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW: Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8093-8097.
83. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E: Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 2001;293:493-498.
84. Strand AD, Baquet ZC, Aragaki AK, Holmans P, Yang L, Cleren C, Beal MF, Jones L, Kooperberg C, Olson JM, Jones KR: Expression profiling of Huntington's disease models suggests that brain-derived neurotrophic factor depletion plays a major role in striatal degeneration. *J Neurosci* 2007;27:11758-11768.
85. Lynch G, Kramar EA, Rex CS, Jia Y, Chappas D, Gall CM, Simmons DA: Brain-derived neurotrophic factor restores synaptic plasticity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2007;27:4424-4434.
86. Schapira AH: Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta* 1999;1410:159-170.
87. Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT: Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 2002;5:731-736.
88. Bogdanov MB, Ferrante RJ, Kuemmerle S, Klivenyi P, Beal MF: Increased vulnerability to 3-nitropropionic acid in an animal model of Huntington's disease. *J Neurochem* 1998;71:2642-2644.
89. Schapira AH: Mitochondrial function in Huntington's disease: clues for pathogenesis and prospects for treatment. *Ann Neurol* 1997;41:141-142.
90. Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D: Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 2006;127:59-69.

91. Bates GP: Huntington's disease. Exploiting expression. *Nature* 2001;413:691, 693-694.
92. Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM: Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 2001;413:739-743.
93. Savinainen A, Garcia EP, Dorow D, Marshall J, Liu YF: Kainate receptor activation induces mixed lineage kinase-mediated cellular signaling cascades via post-synaptic density protein 95. *J Biol Chem* 2001;276:11382-11386.
94. Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG: Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 1998;396:433-439.
95. Stack EC, Dedeoglu A, Smith KM, Cormier K, Kubilus JK, Bogdanov M, Matson WR, Yang L, Jenkins BG, Luthi-Carter R, Kowall NW, Hersch SM, Beal MF, Ferrante RJ: Neuroprotective effects of synaptic modulation in Huntington's disease R6/2 mice. *J Neurosci* 2007;27:12908-12915.
96. Harris GJ, Codori AM, Lewis RF, Schmidt E, Bedi A, Brandt J: Reduced basal ganglia blood flow and volume in pre-symptomatic, gene-tested persons at-risk for Huntington's disease. *Brain* 1999;122 (Pt 9):1667-1678.
97. Aylward EH, Sparks BF, Field KM, Yallapragada V, Shpritz BD, Rosenblatt A, Brandt J, Gourley LM, Liang K, Zhou H, Margolis RL, Ross CA: Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* 2004;63:66-72.
98. Thieben MJ, Duggins AJ, Good CD, Gomes L, Mahant N, Richards F, McCusker E, Frackowiak RS: The distribution of structural neuropathology in pre-clinical Huntington's disease. *Brain* 2002;125:1815-1828.
99. Reading SA, Dziorny AC, Peroutka LA, Schreiber M, Gourley LM, Yallapragada V, Rosenblatt A, Margolis RL, Pekar JJ, Pearlson GD, Aylward E, Brandt J, Bassett SS, Ross CA: Functional brain changes in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* 2004;55:879-883.
100. Feigin A, Ghilardi MF, Huang C, Ma Y, Carbon M, Guttman M, Paulsen JS, Ghez CP, Eidelberg D: Preclinical Huntington's disease: compensatory brain responses during learning. *Ann Neurol* 2006;59:53-59.
101. Wolf RC, Sambataro F, Vasic N, Schonfeldt-Lecuona C, Ecker D, Landwehrmeyer B: Aberrant connectivity of lateral prefrontal networks in presymptomatic Huntington's disease. *Exp Neurol* 2008;213:137-144.
102. Kuwert T, Lange HW, Boecker H, Titz H, Herzog H, Aulich A, Wang BC, Nayak U, Feinendegen LE: Striatal glucose consumption in chorea-free subjects at risk of Huntington's disease. *J Neurol* 1993;241:31-36.
103. Antonini A, Leenders KL, Spiegel R, Meier D, Vontobel P, Weigell-Weber M, Sanchez-Pernaute R, de Yebenez JG, Boesiger P, Weindl A, Maguire RP: Striatal

- glucose metabolism and dopamine D2 receptor binding in asymptomatic gene carriers and patients with Huntington's disease. *Brain* 1996;119 (Pt 6):2085-2095.
104. Ciarmiello A, Cannella M, Lastoria S, Simonelli M, Frati L, Rubinsztein DC, Squitieri F: Brain white-matter volume loss and glucose hypometabolism precede the clinical symptoms of Huntington's disease. *J Nucl Med* 2006;47:215-222.
 105. Feigin A, Tang C, Ma Y, Mattis P, Zgaljardic D, Guttman M, Paulsen JS, Dhawan V, Eidelberg D: Thalamic metabolism and symptom onset in preclinical Huntington's disease. *Brain* 2007;130:2858-2867.
 106. Murphy KP, Carter RJ, Lione LA, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ: Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 2000;20:5115-5123.
 107. Mazarakis NK, Cybulska-Klosowicz A, Grote H, Pang T, Van Dellen A, Kossut M, Blakemore C, Hannan AJ: Deficits in experience-dependent cortical plasticity and sensory-discrimination learning in presymptomatic Huntington's disease mice. *J Neurosci* 2005;25:3059-3066.
 108. Bibb JA, Yan Z, Svenningsson P, Snyder GL, Pieribone VA, Horiuchi A, Nairn AC, Messer A, Greengard P: Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6809-6814.
 109. Fossale E, Wheeler VC, Vrbanac V, Lebel LA, Teed A, Mysore JS, Gusella JF, MacDonald ME, Persichetti F: Identification of a presymptomatic molecular phenotype in Hdh CAG knock-in mice. *Hum Mol Genet* 2002;11:2233-2241.
 110. Zabel C, Mao L, Woodman B, Rohe M, Wacker MA, Klare Y, Koppelstatter A, Nebrich G, Klein O, Grams S, Strand A, Luthi-Carter R, Hartl D, Klose J, Bates G: A large number of protein expression changes occur early in life and precede phenotype onset in a mouse model for Huntington's disease. *Mol & Cell Proteomics* 2008;in press.
 111. Gines S, Seong IS, Fossale E, Ivanova E, Trettel F, Gusella JF, Wheeler VC, Persichetti F, MacDonald ME: Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Hum Mol Genet* 2003;12:497-508.
 112. Zabel C, Chamrad DC, Priller J, Woodman B, Meyer HE, Bates GP, Klose J: Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington's disease. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:366-375.
 113. Zabel C, Klose J: Influence of Huntington's disease on the human and mouse proteome. *Int Rev Neurobiol* 2004;61:241-283.
 114. Zabel C, Sagi D, Kaindl AM, Steireif N, Klare Y, Mao L, Peters H, Wacker MA, Kleene R, Klose J: Comparative proteomics in neurodegenerative and non-neurodegenerative diseases suggest nodal point proteins in regulatory networking. *J Proteome Res* 2006;5:1948-1958.

115. Perluigi M, Poon HF, Maragos W, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, Cini C, De Marco C, Butterfield DA: Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:1849-1861.
116. Heng MY, Tallaksen-Greene SJ, Detloff PJ, Albin RL: Longitudinal evaluation of the Hdh(CAG)150 knock-in murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2007;27:8989-8998.
117. Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH: Animal models of Huntington's disease. *Ilar J* 2007;48:356-373.
118. Schilling G, Becher MW, Sharp AH, Jinnah HA, Duan K, Kotzuk JA, Slunt HH, Ratovitski T, Cooper JK, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Ross CA, Borchelt DR: Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* 1999;8:397-407.
119. Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR: A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 1999;23:181-192.
120. von Horsten S, Schmitt I, Nguyen HP, Holzmann C, Schmidt T, Walther T, Bader M, Pabst R, Kobbe P, Krotova J, Stiller D, Kask A, Vaarmann A, Rathke-Hartlieb S, Schulz JB, Grasshoff U, Bauer I, Vieira-Saecker AM, Paul M, Jones L, Lindenberg KS, Landwehrmeyer B, Bauer A, Li XJ, Riess O: Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2003;12:617-624.
121. Nguyen HP, Kobbe P, Rahne H, Worpel T, Jager B, Stephan M, Pabst R, Holzmann C, Riess O, Korr H, Kantor O, Petrasch-Parwez E, Wetzel R, Osmand A, von Horsten S: Behavioral abnormalities precede neuropathological markers in rats transgenic for Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2006;15:3177-3194.
122. Cao C, Temel Y, Blokland A, Ozen H, Steinbusch HW, Vlamings R, Nguyen HP, von Horsten S, Schmitz C, Visser-Vandewalle V: Progressive deterioration of reaction time performance and choreiform symptoms in a new Huntington's disease transgenic ratmodel. *Behav Brain Res* 2006;170:257-261.
123. Petrasch-Parwez E, Nguyen HP, Lobbecke-Schumacher M, Habbes HW, Wiczorek S, Riess O, Andres KH, Dermietzel R, Von Horsten S: Cellular and subcellular localization of Huntingtin [corrected] aggregates in the brain of a rat transgenic for Huntington disease. *J Comp Neurol* 2007;501:716-730.
124. Bauer A, Zilles K, Matusch A, Holzmann C, Riess O, von Horsten S: Regional and subtype selective changes of neurotransmitter receptor density in a rat transgenic for the Huntington's disease mutation. *J Neurochem* 2005;94:639-650.
125. Kantor O, Temel Y, Holzmann C, Raber K, Nguyen HP, Cao C, Turkoglu HO, Rutten BP, Visser-Vandewalle V, Steinbusch HW, Blokland A, Korr H, Riess O, von Horsten S, Schmitz C: Selective striatal neuron loss and alterations in behavior correlate with impaired striatal function in Huntington's disease transgenic rats. *Neurobiol Dis* 2006;22:538-547.

126. Klose J, Kobalz U: Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995;16:1034-1059.
127. Klose J: Large-gel 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 1999;112:147-172.
128. Nebrich G, Herrmann M, Sagi D, Klose J, Giavalisco P: High MS-compatibility of silver nitrate-stained protein spots from 2-DE gels using ZipPlates and AnchorChips for successful protein identification. *Electrophoresis* 2007;28:1607-1614.
129. Klose J: Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 1999;112:67-85.
130. Stack EC, Kubilus JK, Smith K, Cormier K, Del Signore SJ, Guelin E, Ryu H, Hersch SM, Ferrante RJ: Chronology of behavioral symptoms and neuropathological sequela in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J Comp Neurol* 2005;490:354-370.
131. Kita H, Carmichael J, Swartz J, Muro S, Wytenbach A, Matsubara K, Rubinsztein DC, Kato K: Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling. *Hum Mol Genet* 2002;11:2279-2287.
132. Browne SE, Beal MF: The energetics of Huntington's disease. *Neurochem Res* 2004;29:531-546.
133. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM: Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 2005;1:361-370.
134. Cruz JC, Tsai LH: A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2004;14:390-394.
135. Luo S, Vacher C, Davies JE, Rubinsztein DC: Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity. *J Cell Biol* 2005;169:647-656.
136. Anne SL, Saudou F, Humbert S: Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons. *J Neurosci* 2007;27:7318-7328.
137. Kaminosono S, Saito T, Oyama F, Ohshima T, Asada A, Nagai Y, Nukina N, Hisanaga S: Suppression of mutant Huntingtin aggregate formation by Cdk5/p35 through the effect on microtubule stability. *J Neurosci* 2008;28:8747-8755.
138. Paoletti P, Vila I, Rife M, Lizcano JM, Alberch J, Gines S: Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci* 2008;28:10090-10101.
139. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, Saudou F: Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 2007;27:3571-3583.
140. McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH: CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 2000;9:2197-2202.

141. Legendre-Guillemain V, Metzler M, Lemaire JF, Philie J, Gan L, Hayden MR, McPherson PS: Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) regulates clathrin assembly through direct binding to the regulatory region of the clathrin light chain. *J Biol Chem* 2005;280:6101-6108.
142. Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabisco E: Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* 2008;45:667-678.
143. Jana NR, Tanaka M, Wang G, Nukina N: Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum Mol Genet* 2000;9:2009-2018.
144. Novoselova TV, Margulis BA, Novoselov SS, Sapozhnikov AM, van der Spuy J, Cheetham ME, Guzhova IV: Treatment with extracellular HSP70/HSC70 protein can reduce polyglutamine toxicity and aggregation. *J Neurochem* 2005;94:597-606.
145. Hartl D, Rohe M, Mao L, Staufenbiel M, Zabel C, Klose J: Impairment of adolescent hippocampal plasticity in a mouse model for Alzheimer's disease precedes disease phenotype. *PLoS ONE* 2008;3:e2759.
146. Gutekunst C, Norflus F, Hersch S: The neuropathology of Huntington's disease. in Harper P (ed): *Huntington's Disease*. Oxford: Oxford University Press, 2002, 251-275.
147. Mao L, Hartl D, Nolden T, Koppelstatter A, Klose J, Himmelbauer H, Zabel C: Pronounced alterations of cellular metabolism and structure due to hyper- or hypo-osmosis. *J Proteome Res* 2008;7:3968-3983.
148. Zabel C, Andrew A, Mao L, Hartl D: Protein expression overlap: more important than which proteins change in expression? *Expert Rev Proteomics* 2008;5:187-205.
149. <http://aceanimals.com/SpragueDawley.htm>

B. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	2D-Großgelelektrophorese, erste (1D) und zweite (2D) Dimension	31
Abbildung 2:	Repräsentatives analytisches 2D-Gel des Striatums der Ratte.....	34
Abbildung 3:	Veränderte Proteinisoformen für Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf.....	42
Abbildung 4:	Veränderte Proteinisoformen für Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf, mindestens 10 % Expressionsänderung	44
Abbildung 5:	Änderung der Gesamtproteinkonzentration für Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf	46
Abbildung 6:	Änderung der Gesamtproteinkonzentration für Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf, mindestens 10% Expressionsänderung.....	47
Abbildung 7:	Relative Konzentrationsänderung pro veränderter Proteinisoform für Striatum und Cerebellum im HD-Krankheitsverlauf	51
Abbildung 8:	Relative Konzentrationsänderung pro veränderter Proteinisoform für Striatum und Cerebellum im HD-Verlauf, mindestens 10 % Expressionsänderung.....	52
Abbildung 9:	Vom ausgestochenen Spot bis zum identifizierten, nicht redundanten Protein	58
Abbildung 10:	Signifikant veränderte Pathways im Striatum und im Cerebellum bei 10 Tagen.	59
Abbildung 11:	Veränderte Pathways in verschiedenen zentralen Abläufen der Zelle, Striatum 10 Tage	61
Abbildung 12:	Signifikant veränderte Pathways mit vermehrter und verminderter Proteinexpression, Striatum 10 Tage	62

C. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Protokoll zur Proteingestamtextraktion.....	22
Tabelle 2:	Zusammensetzung des Separationsgels	26
Tabelle 3:	Zusammensetzung des Caggels.....	27
Tabelle 4:	Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele.....	29
Tabelle 5:	Unterschiedlich exprimierte Proteinisoformen im Striatum	41
Tabelle 6:	Unterschiedlich exprimierte Proteinisoformen im Cerebellum	41
Tabelle 7:	Unterschiedlich exprimierte Proteinisoformen im Striatum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression	43
Tabelle 8:	Unterschiedlich exprimierte Proteinisoformen im Cerebellum, mindestens 10% veränderte Proteinkonzentration	43
Tabelle 9:	Änderung der Gesamtproteinkonzentration im Striatum	45
Tabelle 10:	Änderung der Gesamtproteinkonzentration im Cerebellum	45
Tabelle 11:	Änderung der Gesamtproteinkonzentration im Striatum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression	47
Tabelle 12:	Änderung der Gesamtproteinkonzentration im Cerebellum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression	47
Tabelle 13:	Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform für Striatum und Cerebellum	49
Tabelle 14:	Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform für Striatum und Cerebellum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression	49
Tabelle 15:	Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform im HD-Verlauf im Striatum ...	51
Tabelle 16:	Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform im HD-Verlauf im Cerebellum	51
Tabelle 17:	Proteinkonzentrationsänderung pro Isoform im HD-Verlauf im Striatum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression	52
Tabelle 18:	Proteinkonzentrationsänderung pro Proteinisoform im HD-Verlauf im Cerebellum, mindestens 10 % veränderte Proteinexpression	52
Tabelle 19:	Peakverlauf Striatum und Cerebellum bezogen auf Proteinisoformanzahl...	53
Tabelle 20:	Peakverlauf Striatum und Cerebellum bezogen auf Gesamtproteinkonzentration	54

Tabelle 21:	Übereinstimmung Striatum und Cerebellum bezogen auf Proteinisoformanzahl	54
Tabelle 22:	Übereinstimmung Striatum und Cerebellum bezogen auf Gesamtproteinkonzentration	55
Tabelle 23:	Proteinisoformidentifizierungen, Striatum 10 Tage	56
Tabelle 24:	Proteinisoformidentifizierungen, Cerebellum 10 Tage	57
Tabelle 25:	Nicht redundante Proteine, Striatum 10 Tage	57
Tabelle 26:	Nicht redundante Proteine, Cerebellum 10 Tage	58
Tabelle 27:	Signifikant veränderte Pathways im Striatum 10 Tage gesamt.....	60
Tabelle 28:	Veränderte Pathways und betroffene zentrale Abläufe in der Zelle, Striatum 10 Tage	60
Tabelle 29:	Pathways mit vermehrter Proteinexpression, 10 Tage Striatum	61
Tabelle 30:	Pathways mit verminderter Proteinexpression, 10 Tage Striatum	62
Tabelle 31:	Veränderte Einzelproteine, Striatum 10 Tage	64
Tabelle 32:	Gesamtliste aller identifizierten, nicht redundanten Proteine, 10 Tage Striatum	65
Tabelle 33:	Gesamtliste aller identifizierten, nicht redundanten Proteine, 10 Tage Cerebellum	66
Tabelle 34:	Expressionsoverlap früh veränderter Proteine bei HD mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen.....	76

D. Abkürzungsverzeichnis

A) Allgemeine Abkürzungen

1D	Erste Dimension
2D	Zweite Dimension
3-NP	3-Nitropropionsäure
ACN	Acetonitril
AD	Alzheimer-Erkrankung
Ag	Silber
APS	Ammoniumpersulfatlösung
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
Bp	Basenpaar
CAG	Cytosin-Adenin-Guanin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-binding Protein
cDNA	complementary DNA
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium)-1-propansulfonat
CREB	cAMP response element binding
DIGE	Differential In Gel Electrophoresis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpi	Dots per inch
DTT	Dithiotreitol
ESI	Elektrospray-Ionisierung
fMRI	Funktionelle Magnetresonanztomographie
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
H ₂ O	Wasser
HAP	Huntingtin-associated Protein
HCl	Salzsäure
HD	Huntington-Erkrankung
HDRCG	Huntington's Disease Collaborative Research Group
HIP	Huntingtin-interacting Protein
HPLC	High-Performance Flüssigkeits-Chromatographie
Htt	Huntingtin
Hsp	Heat Shock Protein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
KCL	Kaliumchlorid
Da	Dalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC	Flüssigkeitschromatographie
LTP	Long Term Potentiation
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisation
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGF	MASCOT Generic Format Files
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
Mw	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIIIs	Neuronal Intranuclear Inclusions
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDA	Piperazindiacrylamid
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGC-1 α	Peroxisome-proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α
pH	Potentia hydrogenii
pI	Isoelektrischer Punkt
polyQ-Htt	Huntingtin mit pathologisch verlängerter Polyglutaminsequenz
PSD	Post-synaptic Density
PSD95	Post-synaptic Density Protein 95
QA	Quinolinsäure
RME	rezeptorvermittelte Endozytose
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodiumdodecylphosphat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylphosphat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
TAF-130	TBP-associated Factor 130
TBP	TATA-binding Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of flight
Tpr	Translocated promoter region
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volume per volume
WEBGESTALT	WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit
w/v	Weight per volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

B) Physikalische Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung = 9,81 m/ s ²
h	Stunde
l	Liter
M	Molar (mol/l)
m	Meter
min	Minute
mol	Mol
s	Sekunde

C) Präfixe physikalischer Einheiten

k	Kilo (10 ³)
m	Milli (10 ⁻³)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
n	Nano (10 ⁻⁹)
p	Pico (10 ⁻¹²)

E. Danksagung

Ich danke Herrn Prof Dr. rer nat. Dr. med. Joachim Klose für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Fragestellung in seinem Labor zu untersuchen.

Herrn Dr. rer. nat. Claus Zabel danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die stetige Bereitschaft zur kritischen Auseinandersetzung. Seine fachliche Kompetenz und die wertvollen Anregungen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Durch kritische Durchsicht des Manuskripts hat er die Zahl der Ungereimtheiten im Text reduziert.

Frau Dr. med. Angela M. Kaindl möchte ich für die exzellente wissenschaftliche Betreuung danken.

Mein Dank gilt Frau Yvonne Kläre für die hervorragende technische Hilfe. Frau Grit Nebrich und Frau Silke Becker danke ich für die Proteinidentifizierungen.

Insbesondere danke ich meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung.

F. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

G. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Alexander Andreew, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Frühe Proteomveränderungen im Gehirn bei einem transgenen Rattenmodell für die Huntington-Erkrankung“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift