

Neurologische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Conrad)

Apoptose als möglicher Pathomechanismus der Nervenzelldegeneration beim M. Huntington

Immunhistochemische und Western Blot Untersuchung menschlichen und transgenen murinen *post-mortem*-Gehirngewebes zur Stadien-abhängigen Bildung der Komponenten des Apoptosom-Komplexes

Tamara Kiechle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:
1. apl.Prof. Dr. A. Weindl, Ph.D.
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Diese Dissertation wurde am 19.05.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 02.02.2005 angenommen.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern

ABKÜRZUNGEN:

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APAF1	Apoptosis protease activating factor 1
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARD	Caspase recruitment domain
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alii
g	Gramm
g	Gravitation
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
h	Stunden
IgG	Immunglobulin G
kD	kiloDalton
L	Liter
M	Mol
M.	Morbus
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NADPH	Nicotinamid-Adenin -Dinukleotid-Hydrogen -Phosphat
NB	Nucleotide binding
Ncl.	Nucleus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N-terminal	“Stickstoff-endig” = am Stickstoffende gelegen
o.g.	oben genannt
PCR	Polymerase chain reaction
RNS	Ribonukleinsäure
TUNEL	Terminal desoxynucleotidyltransferase-mediated in situ nick end labeling
u.a.	unter anderen
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung	7
1.1. Historische Einführung	7
1.2. Klinisches Bild	8
1.3. Epidemiologie	9
1.4. Genetischer Hintergrund und Genprodukt Huntingtin	9
1.5. Neuropathologie	11
1.5.1. Striatum	11
1.5.1.1. Selektiver Nervenzellverlust im Striatum	13
1.5.1.2. Mittelgroße be dornte Neuronen besonders betroffen	13
1.5.1.3. Mittelgroße unbedornte NADPH-Diaphorase-positive Neuronen bleiben verschont	14
1.5.2. Zerebraler Kortex	15
1.5.3. Beteiligung weiterer Strukturen	15
1.6. Apoptose	16
1.6.1. Inzidenz	16
1.6.2. Morphologie	17
1.6.3. Kinetik	18
1.6.4. Mitochondrien und Apoptose	18
1.6.5. Caspasen	19
1.6.6. Apoptose als möglicher Mechanismus des Zelltodes neurodegenerativer Erkrankungen	21
1.6.6.1. M. Huntington	21
1.6.6.2. Vergleich zu anderen CAG-Repeat-Krankheiten	21
2. Problemstellung	23

3. Material und Methoden	24
3.1. Material	24
3.1.1. Gewebeproben	24
3.1.1.1. Humanes Gehirngewebe	24
3.1.1.2. Transgenes Mausgehirngewebe	25
3.1.2. Verbrauchsmaterial	26
3.1.2.1. Antikörper	26
3.1.2.2. Lösungen für die Immunhistochemie	28
3.1.2.3. Lösungen für Western Blot Verfahren	29
3.2. Methoden	31
3.2.1. Immunhistochemie	31
3.2.1.1. Gewebeaufbereitung und Färbetechnik	31
3.2.1.2. Fertigstellung der Präparate	32
3.2.2. Western Blot Verfahren	32
3.2.2.1. Gewebeaufbereitung	32
3.2.2.2. Western Blot Technik und Färbung der Nitrozellulosestreifen	33
3.3. Auswertung	34
3.3.1. Immunhistochemische Auswertung	34
3.3.2. Western Blot Auswertung	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Cytochrom C	36
4.1.1. Immunhistochemie	36
4.1.1.1. Cytochrom C in menschlichem Hirngewebe	36
4.1.1.2. Cytochrom C in transgenem Maushirngewebe	39
4.1.2. Western Blot Analyse	41
4.1.2.1. Cytochrom C in menschlichem Hirngewebe	41
4.1.2.2. Cytochrom C in transgenem Maushirngewebe	41

4.2. Caspase -9	43
4.2.1. Immunhistochemie	43
4.2.1.1. Caspase-9 in menschlichem Hirngewebe	44
4.2.1.2. Caspase-9 in transgenem Maushirngewebe	46
4.2.2. Western Blot Analyse	47
4.2.2.1. Caspase-9 in menschlichem Hirngewebe	47
4.2.2.2. Caspase-9 in transgenem Maushirngewebe	48
5. Diskussion	50
5.1. Kritische Beurteilung von Material und Methodik	50
5.1.1. Gewebeprouben	50
5.1.2. Antikörper	51
5.1.3. Labortechniken	52
5.2. Interpretation der Ergebnisse	52
5.2.1. Aktivierung des Apoptosom-Komplexes bei M. Huntington Patienten und transgenen Mäusen	52
5.2.1.1. Umverteilung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol	53
5.2.1.2. Aktivierte Caspase-9 verstärkt nachweisbar in schweren pathologischen Stadien	55
5.2.1.3. Caspase-3 Aktivierung nur in sehr schweren pathologischen Stadien nachweisbar	56
5.2.1.4. Diskrepanz des zeitlichen Auftretens der Cytochrom C-, Caspase-9- und Caspase-3-Immunreaktivität	56
5.3. Zusammenfassung und Einordnung der Ergebnisse in die vorhandene Literatur	57
5.3.1. Intrinsischer Weg der Apoptose womöglich erst in späten pathologischen Stadien bedeutend	57
5.3.2. Rolle des expandierten Polyglutamintrakts des mutierten Huntingtin	58
5.3.3. Mögliche Apoptose-modulierende Faktoren	60

5.3.4. Weitere pathologische Mechanismen, die zum Zelltod führen können	62
5.3.4.1. Mechanismen, denen eine späte Rolle in der Neurodegeneration zugeordnet wird	62
5.3.4.2. Transkriptionelle Fehlregulation	63
5.3.5. Caspasen-Aktivierung und Apoptosemechanismen bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen	64
5.4. Ausblick und therapeutische Ansätze	65
5.4.1. Angriffspunkte zur Therapie	66
5.4.1.1. Genereller Ansatzpunkt	66
5.4.1.2. Ansatz an der energetischen Dysfunktion	66
5.4.1.3. Hemmung von Caspasen	67
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis	71
8. Danksagung	80
9. Lebenslauf	81

1. Einleitung

1.1. Historische Einführung

Das als M. Huntington (Chorea Huntington, Chorea major, erbliche Chorea, erblicher Veitstanz) bekannte Krankheitsbild, das zu einem großen Teil als Ursache für choreatische Bewegungsstörungen angesehen wird, ist bereits in Papyrusrollen der Pharaonenzeit erwähnt worden. Im Laufe der Zeit folgten weitere Beschreibungen, beispielsweise im Mittelalter, in dem auch der Name Veitstanz geprägt wurde. In dieser Zeit wurden nicht selten die an M. Huntington Erkrankten vorgeführt und bei Hexenverbrennungen umgebracht. Eine sehr umfangreiche Beschreibung der Krankheit mit vererbten choreatischen Bewegungsstörungen und Demenz wurde bereits 1859 von Johan Christian Lund, einem praktizierenden norwegischen Arzt vorgelegt. Da diese Beschreibung allerdings über ein Jahrhundert lang nicht ins Englische übersetzt wurde, ist ihr keinerlei Bedeutung beigemessen worden.

Wenig später jedoch hielt im Alter von nur 21 Jahren der 1850 geborene George Huntington auf einem Symposium in Ohio 1872 einen bis heute viel beachteten Vortrag über diese Krankheit, deren Charakteristika er als choreatische Bewegungen, mentale Beteiligung und autosomal-dominante („It never skips a generation...“) Vererbung beschrieb. Seine Darstellung wurde als äußerst präzise und bildhaft, zugleich aber auch als sehr prägnant anerkannt. Das Interesse des jungen Arztes erwachte aus einer Beobachtung, die er im Alter von 8 Jahren auf einer gemeinsamen Visitenfahrt mit seinem Vater gemacht hatte und später so beschrieb:

„It made a most enduring impression upon my boyish mind which was my very first impulse to choosing chorea as my virgin contribution to medical lore. Driving with my father through a wooded road leading from East Hampton to Amagansett we suddenly came upon two women, mother and daughter, both tall and thin, almost cadaverous, both bowing, twisting, grimacing. I stared in wonderment, almost in fear. What could it mean?“

(aus G. Huntingtons Erinnerung mit 59 Jahren)

Die Frage, was es mit dieser Krankheit auf sich hat, versuchen bis heute zahlreiche Forschergruppen zu klären. Ein erster Durchbruch erfolgte 1983, als Gusella et al. durch die Anwendung polymorpher DNS-Marker das beim M. Huntington betreffende Gen auf Chromosom 4 entdeckten (Gusella et al., 1983). Einen weiteren Meilenstein stellte dann 1993 die Identifizierung des verantwortlichen Gens (IT15) und des Genproduktes (Huntingtin) mit einer expandierten CAG-Wiederholung im kodierenden Bereich dar (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Doch bis heute sind trotz intensiver Erforschungen und Erkenntnisse weiterhin die pathophysiologischen Vorgänge, die schließlich zum Tod der Nervenzellen führen, sowie deren Korrelation zur klinischen Symptomatik unklar.

1.2. Klinisches Bild

Der M. Huntington ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die sich für gewöhnlich im Erwachsenenalter zwischen 35 und 50 Jahren manifestiert. Er ist gekennzeichnet durch choreatische Bewegungsstörungen und psychiatrische Veränderungen, sowie durch einen progressiven Abbau intellektueller Fähigkeiten bis hin zur Demenz. Dabei gehen erste kognitive Veränderungen wie Merkfähigkeits- und Gedächtnisstörungen den choreatischen Bewegungsstörungen oft jahrelang voraus, und somit sind Fehldiagnosen zu Beginn häufig. Ohne positive Familienanamnese wird die richtige Diagnose meist erst beim Auftreten der typischen choreatischen Hyperkinesien gestellt. Es gesellen sich im Weiteren eine Muskelhypotonie und zusätzliche psychiatrische Erscheinungsbilder wie Demenz, Abbau intellektueller Fähigkeiten, Störungen von Auffassung, Orientierung, Denken, Affektivität, Psychosen, Zwangshandlungen und Persönlichkeitsveränderungen hinzu. Die Erkrankung verläuft chronisch progressiv, und die Patienten versterben in einem kachektischen Zustand 10-25 Jahre nach Beginn der Erkrankung. Eine Sonderform stellt mit ca. 10% Anteil die sogenannte „Westphal-Variante“ dar, die durch einen früheren, juvenilen Beginn vor dem 20. Lebensjahr und akinetisch-rigide Bewegungsstörungen, Dystonie, okulomotorische Störungen, progressive Demenz und zerebrale Anfälle gekennzeichnet ist. Der Krankheitsverlauf ist mit durchschnittlich 10 Jahren kürzer als bei der adulten Form (Weindl und Conrad, 1996; Marshall and Shoulson, 1997).

1.3. Epidemiologie

Epidemiologischen Untersuchungen zufolge liegt die Prävalenz für M. Huntington weltweit bei ca. 5-10/100.000 (Conneally, 1984). Die ermittelten Daten für Europa liegen mit 4-8/100.000 Personen nur minimal unter den oben genannten (Harper, 1992). Besonders selten findet sich die Erkrankung mit einer Prävalenz von 0,1/100.000 in Finnland (Palo et al., 1987) und 0,5/100.000 in Japan (Narabayashi, 1973). Die weltweit höchste Dichte wird im Staat Zulia in Venezuela in einer Population mit inzwischen mehr als 10.000 Individuen beobachtet. Man nimmt an, dass diese von einem gemeinsamen Vorfahren am Maracaibosee abstammen (Penney et al. 1990). Die unterschiedlichen Werte können durch bestimmte Migrationsmuster von Völkern und in starker Bevölkerungsexpansion begründet sein. Das seltene Auftreten in Japan und Finnland könnte durch die stärkere geographische Isolierung der Bevölkerung bedingt sein. Prinzipiell kann der M. Huntington je doch alle Menschen unabhängig von Geschlecht, Rasse oder geographischem Lebensraum betreffen (Harper, 1992).

1.4. Genetik und Genprodukt Huntingtin

Der M. Huntington ist eine autosomal-dominante Erkrankung. Der Defekt wurde 1983 von Gusella et al. auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (4p16.3) lokalisiert (Gusella et al., 1983). Ein Jahrzehnt später wurde dann das zugehörige, bisher unbekannte Gen identifiziert und IT 15 („interesting transcript 15“) oder Huntingtin-Gen benannt. Erstaunlicherweise war für das krankhaft veränderte Gen nicht eine einfache Punktmutation verantwortlich, sondern die Expansion einer (CAG)_n-Trinukleotidsequenz (Cytosin-Adenin-Guanidin) im kodierenden Bereich des Exon 1 (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Die CAG-Einheiten auf normalen Chromosomen weisen eine Streubreite zwischen 6 und 35 Wiederholungen auf, während bei M. Huntington Erkrankten die Wiederholungen der CAG-Einheiten bei 40 bis zu über 100 Wiederholungen liegen. Bei Wiederholungen, die in diesem Bereich liegen, muss zu praktisch 100% mit einem Auftreten der Erkrankung in der normalen Lebensspanne gerechnet werden. Bei einer Anzahl von über 60 CAG-Wiederholungen ist ein juveniler Beginn zu erwarten (Gusella und MacDonald, 1997). In dem Bereich mit 36-39 CAG-Wiederholungen kann man eine inkomplette Penetranz beobachten, d.h. es besteht für die Betroffenen die Möglichkeit, in ihrer normalen Lebensspanne an M. Huntington zu erkranken oder bis ins hohe Alter bzw. bis zum Tod erscheinungsfrei zu bleiben (Rubinsztein et

al., 1996; McNeil et al., 1997). Außerdem besteht zwischen CAG-Wiederholungsanzahl und Erkrankungsbeginn eine umgekehrt proportionale Beziehung, d.h. Personen mit hoher CAG-Anzahl erkranken früh, während Personen mit niedriger Anzahl erst spät erkranken (Gusella und MacDonald, 1997).

Während die CAG-Wiederholungen relativ stabil in der Mitose sind, kann es in der Meiose zu Verkürzungen, häufiger jedoch zu Expansionen kommen. Dies ist wesentlich öfter während der Spermatogenese als in der Oogenese zu beobachten. Die Mutationshäufigkeit ist dabei in den normalen, kurzen CAG-Wiederholungen sehr niedrig, bei Wiederholungen zwischen 40-75 Einheiten aber bei bis zu 70% (Zühlke et al., 1993). Diese meiotische Instabilität erklärt auch das Auftreten so genannter sporadischer Fälle im Sinne von Neumutationen. Während die Eltern erscheinungsfrei bleiben und eine intermediäre oder hochnormale Anzahl von CAG-Wiederholungen in ihrem Erbgut tragen, kommt es in den überwiegenden Fällen in der Spermatogenese zu einer Expansion in den krankheitsauslösenden Bereich (paternale Transmission) (Goldberg et al., 1993; De Rooij et al., 1993).

Interessanterweise ist der M. Huntington die erste entdeckte Erkrankung, bei der der Phänotyp unabhängig von der Anzahl der mutierten Allele ausgeprägt ist. Die Träger homozygoter Anlagen unterscheiden sich weder klinisch noch im Verlauf der Erkrankung von denen mit heterozygoter Anlage. Diese Tatsache zeigt, dass die Anlage eines gesunden Gens weder den fatalen Verlauf hinauszögern noch den klinischen Zustand bessern kann (Wexler et al., 1987; Myers et al., 1989).

Das Huntingtin-Gen kodiert das Protein, das als Huntingtin bezeichnet wird und durch die expandierte (CAG)_n-Trinukleotid-Sequenz zur Synthese einer verlängerten (Glutaminsäure)_n-Kette am N-terminalen Ende des Proteins führt (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Huntingtin ist Untersuchungen zufolge in der Evolution hochgradig konserviert geblieben (Gusella und MacDonald, 1997) und wird nicht nur in neuronalen, sondern auch in nicht-neuronalen Geweben wie z.B. Lymphoblasten exprimiert (Li et al., 1993). Da der Verlust eines Huntingtin-Allels zu keinerlei Anomalien führt (Ambrose et al., 1994) und weiterhin eine Heterozygotie gegenüber Homozygotie im mutierten Huntingtin-Gen keinen Vorteil in der Ausprägung bietet (Wexler et al., 1987), ist ein einfacher Funktionsverlust des Proteins nicht anzunehmen. Stattdessen wird ein „toxic gain of function“, d.h. eine durch den verlängerten Polyglutamintrakt verursachte, neu erworbene toxische Eigenschaft vermutet. Dabei ist allerdings auch die physiologische Rolle des Huntingtins bei Gesunden nicht bekannt (Gusella und MacDonald, 1997). Eine wichtige Rolle in der embryonalen

Entwicklung des Nervensystems wird jedoch aufgrund von Versuchen an Knock-out-Mäusen angenommen (Duyao et al., 1995; Zeitlin et al., 1995).

1.5. Neuropathologie

Der M. Huntington zeichnet sich pathologisch durch eine generalisierte Atrophie des Gehirns aus. So ist bei Autopsien von M. Huntington Patienten das Gewicht des Gehirns um durchschnittlich 30% geringer als bei normalen (nicht-neurologischen) Kontrollen. Besonders und bereits früh betroffen ist dabei das Striatum mit einer Verminderung der Querschnittsfläche des Nucleus caudatus um 57% und des Putamens um 64%. Je nach Schritthöhe fällt auch ein 2,5-fach bis zu 13-fach dilatiertes Ventrikelsystem auf, das durch entsprechende Atrophie der Gehirnstrukturen bedingt ist. Des Weiteren ist auch die Querschnittsfläche der Großhirnrinde mit bis zu 29%, der weißen Substanz mit bis zu 34% und des Thalamus mit 28% im Vergleich zu normalen Kontrollen stark reduziert (de la Monte et al., 1988).

1.5.1. Striatum

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde das Striatum mit Nucleus caudatus und Putamen als besonders stark betroffene Struktur bei M. Huntington identifiziert. Das Striatum zeigt dabei in fast allen Fällen von M. Huntington (95%) eine symmetrische bilaterale Atrophie, die von auffälligem Nervenzellverlust und Astroglieose begleitet ist. Dabei folgt die striatale Degeneration einem geordneten topographischen Muster. Die ersten Veränderungen treten im medialen Bereich und im Schwanz des Ncl. caudatus, sowie im dorsalen Bereich des Putamens auf. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass in der koronaren Ebene die dorsalen Bereiche des Striatums stärker und früher betroffen sind als die ventralen und der Ncl. caudatus stärker als das Putamen. Im Laufe der Erkrankung breitet sich der Nervenzellverlust in dorso-ventraler, antero-posteriorer und medio-lateraler Richtung aus und wird parallel dazu von Astroglieose begleitet. Letzteres wird allerdings eher auf ein Überleben der Astrozyten in einem schrumpfenden Striatum zurückgeführt als auf eine reaktive Astrozytose (Lange et al., 1976). Nur der ventrale Bereich des Striatums und der Ncl. accumbens bleiben im Verlauf des Nervenzellverlustes und der Atrophie relativ verschont (Kowall et al., 1987; Hersch und Ferrante, 1997; Vonsattel und DiFiglia, 1998).

Auf der Grundlage dieser Beobachtungen entwarfen 1985 Vonsattel et al. ein Klassifikationssystem, das sowohl makroskopische als auch mikroskopische Kriterien, sowie das Ausmaß der Gliose berücksichtigt. Die fünf definierten Stadien 0-4 entsprechen auch jeweils der dem Stadium charakteristischen klinischen Symptomatik (Vonsattel et al., 1985).

Stadium 0 ist gekennzeichnet durch eine positive Familienanamnese für M. Huntington und erhebliche Hinweise auf entsprechende klinische Symptomatik, aber makroskopisch ist es nicht von Kontrollen zu unterscheiden. Nicht-signifikante Zellzählungen ergeben im Kopf des Ncl. caudatus bereits einen Nervenzellverlust von 30-40%. Zu Stadium 1 werden die Fälle gezählt, die makroskopisch noch nicht besonders durch Atrophie auffallen, mikroskopisch aber bereits einen Nervenzellverlust von 50% im Bereich des Kopfes des Ncl. caudatus aufweisen. Diese Veränderungen werden von einer leicht erkennbaren Astrozytose begleitet. Besonders der Schwanz des Ncl. caudatus ist kleiner als bei Kontrollen. Im Stadium 2 stellt sich bereits bei grober Betrachtung eine Atrophie des Striatums und eine leichte Vergrößerung des Ventrikels dar, jedoch mit Beibehaltung der konvexen Begrenzung durch den Ncl. caudatus. Mikroskopisch fällt im Ncl. caudatus und im dorsalen Bereich des Putamens ein zunehmender Nervenzellverlust mit begleitender Astrozytose auf. Der Globus pallidus ist minimal oder gar nicht betroffen. Das Stadium 3 ist charakterisiert durch eine deutliche makroskopische Atrophie des Ncl. caudatus, der z.T. nur noch einen dünnen Streifen bildet, und des Putamens. Die Begrenzung zum Ventrikel ist geradlinig statt konvex. Sowohl im Ncl. caudatus als auch im Putamen zeigt sich ein schwerer Nervenzellverlust und eine Astroglieose, die deutlich stärker ausgeprägt sind als in Stadium 2. Nun ist auch der Globus pallidus im lateralen Bereich von der Astrozytose betroffen. Die schwersten Ausprägungen bestehen im Stadium 4. Der Ncl. caudatus ist bis auf einen dünnen Streifen atrophisch geschrumpft, die mediale Begrenzung zum Ventrikel ist konkav, und dieser ist stark ausgeweitet. Das Putamen ist durch die Atrophie deutlich verkleinert, so auch der Globus pallidus. Der Nervenzellverlust, der in diesem Stadium 95% beträgt, und die Astrozytose sind am schwersten ausgeprägt und diffus verteilt (Vonsattel et al., 1985; Hersch und Ferrante, 1997; Vonsattel und DiFiglia, 1998).

1.5.1.1. Selektiver Nervenzellverlust im Striatum

Im Striatum ist es möglich, eine unterschiedliche Organisation der Nervenzellen zu beschreiben. So lassen sich die Neuronen nach Nissl-Färbung in kleine, mittelgroße und große unterscheiden. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung durch Golgi-Färbung aufgrund der Tatsache, ob die Nervenzellen bedornt oder unbedornt sind. Dabei sind im Striatum bis zu 80% den mittelgroßen bedornten Nervenzellen zuzurechnen. Diese sind als Hauptteil der projizierenden Neuronen im Striatum identifiziert worden und beim M. Huntington besonders stark und früh dem Zelltod unterworfen. Die mittelgroßen und großen unbedornten Neuronen stellen mit ca. 10-20% eine weitere große Subpopulation dar und sind wohl ausschließlich an lokalen striatalen intrinsischen Schaltkreisen beteiligt. Wie unten näher beschrieben, wird ein Teil der großen unbedornten Neuronen bei M. Huntington in besonderem Maße verschont. Der Rest der Neuronen besteht aus einer weiteren mittelgroßen bedornten Gruppe und einer kleinen mit unterschiedlicher Bedornung. Eine weitere Unterteilung der jeweiligen Subpopulationen erfolgt durch Neurotransmitter und Neuropeptide, die in unterschiedlichen Kombinationen in den Nervenzellen ko-lokalisiert sind (Beal und Martin 1986).

1.5.1.2. Mittelgroße bedornte Neuronen besonders betroffen

Die besonders stark betroffenen mittelgroßen bedornten Neuronen zeigen in Golgi-Imprägnierung in den frühen, moderaten Stadien Zeichen von Proliferation. Das Dendritenwachstum ist gekennzeichnet durch eine markante Rückwärtsorientierung der distalen Dendritensegmente mit kurzen Verzweigungen sowie einer Erhöhung der dendritischen Dornendichte. In den späten Stadien stehen dann die Kennzeichen der Degeneration mit gestutzten dendritischen Verzweigungen, gelegentlich fokalen Schwellungen der Dendriten und einem ausgeprägten Verlust der Bedornung im Vordergrund (Graveland et al., 1985; Ferrante et al., 1991; Hersch und Ferrante 1997).

In den mittelgroßen bedornten Neuronen wurden GABA (Gamma-Amino-Buttersäure), Substanz P, (Met-)Enkephalin, Dynorphin, TGF („transforming growth factor“) und Calbindin D28k identifiziert. In M. Huntington Striata wird eine Verarmung der Neuropeptide GABA, Enkephalin und Substanz P beobachtet. GABA wird als Transmitter der mittelgroßen inhibitorischen Neuronen verwendet.

Weiterhin lassen sich die mittelgroßen unbedornten Neuronen in zwei Gruppen unterteilen, die entweder Enkephalin oder Substanz P als Neurotransmitter verwenden. Besonders in den frühen Stadien der Erkrankung sind die Enkephalin-haltigen Nervenzellen betroffen, welche normalerweise zum Globus pallidus externus projizieren. Durch den Verlust kommt es zu einer exzessiven Hemmung des Ncl. subthalamicus, die über eine verminderte Aktivität des Globus pallidus internus und über eine verminderte Hemmung des Thalamus zu einer erhöhten Erregung der Großhirnrinde und damit zur Bildung von choreatischen Bewegungsstörungen führt. Die Substanz P-haltigen Neuronen projizieren dagegen zum Globus pallidus internus (Beal und Martin 1986; Hersch und Ferrante, 1997) und sind weniger stark und später betroffen. Sind im Verlauf sowohl die Enkephalin- als auch Substanz P-haltigen Nervenzellen annähernd gleichermaßen untergegangen, stehen rigid-akinetische Bewegungsstörungen im Vordergrund (Albin et al., 1990; Hersch und Ferrante, 1997).

Eine Subpopulation bedornter mittelgroßer Neuronen ist durch das Kalzium bindende Protein Calbindin D28k gekennzeichnet, dem eine Aufgabe im Kalziumpuffervermögen der Zelle und somit in der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase zugeordnet wird. Auch diese Subpopulation ist bei M. Huntington in dramatischem Ausmaß betroffen (Seto-Ohshima et al., 1988; DiFiglia et al., 1989).

1.5.1.3. Mittelgroße unbedornte NADPH-Diaphorase-positive Neuronen bleiben verschont

Unter den Subpopulationen der mittelgroßen und großen unbedornten und spärlich bedornten Neuronen ist die Gruppe der mittelgroßen unbedornten NADPH-Diaphorase positiven Neuronen besonders hervorzuheben. Außer NADPH-Diaphorase enthalten sie die Neuropeptide Somatostatin und Neuropeptid Y. Diese Neuronen bleiben geradezu auffällig verschont von der Neurodegeneration beim M. Huntington. Diese Neuronengruppe macht in normalem striatalen Gewebe nur einen Bruchteil der Nervenzellen aus, stellt aber in den späten Stadien bis zu 30% der verbleibenden Nervenzellen dar. Die Dichte dieser Neuronen ist in späten Stadien 4-5fach erhöht; ein Effekt, der einerseits durch die Resistenz dieser Subpopulation gegen die Nervenzelldegeneration und andererseits durch die umliegende Gewebeschrumpfung bedingt ist. Aber auch die Aktivität der NADPH-Diaphorase ist in diesen Stadien deutlich erhöht. Ein diskutierter Schutzmechanismus dieser Zellen könnte die NADPH-Diaphorase selbst sein, die auf bestimmte Zellnoxen detoxifizierend wirkt (Dawbarn

et al., 1985; Ferrante et al., 1985, 1987; Kowall et al., 1987; Beal et al., 1988; Hersch und Ferrante, 1997).

1.5.2. Zerebraler Kortex

Wie oben bereits beschrieben (s. 1.5.), gehen auch Großhirnrinde und weiße Substanz mit einem deutlichen Querschnittsverlust im Verlauf der Erkrankung einher. Dabei ist die Atrophie besonders deutlich in okzipitalen Bereichen, aber auch im frontalen, medialen post-zentralen und primär motorischen Kortex. Die Atrophie nimmt deutlich mit Fortschreiten der Erkrankung zu und ist mit Verlust der Substanz Phaltigen Neuronen und einer relativen Aussparung der Somatostatin/Neuropeptid Y-haltigen Neuronen verbunden. Dabei sind besonders die großen Pyramidenzellen der Schichten III, V und VI betroffen. So liegen in Autopsien Nervenzellverluste von 71% in der Schicht V und 57% in der Schicht VI des frontalen Kortex vor. Diese degenerativen Veränderungen könnten entweder primär genetisch festgelegt sein oder durch eine retrograde Degeneration durch deren Projizierungsmuster in den Ncl. caudatus zustande kommen, was allerdings unwahrscheinlicher sein dürfte. Diese deutlichen Atrophieerscheinungen können für klinische Symptome wie Demenz, Apathie und Depression wenigstens zum Teil verantwortlich gemacht werden (Beal und Martin, 1986; Cudkowicz und Kowall, 1990; Hedreen et al., 1991; Sotrel et al, 1991; Hersch und Ferrante, 1997).

1.5.3. Beteiligung weiterer Strukturen

Neben Striatum und Kortex sind weitere Hirnregionen von der Degeneration betroffen. Pathologische Veränderungen im Sinne von Nervenzellverlust und Atrophie werden in unterschiedlichem Maße auch im Globus pallidus, Thalamus, Hypothalamus und in der Kleinhirnrinde beobachtet (Übersicht in Hersch und Ferrante, 1997).

1.6. Apoptose

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und beschreibt das Abfallen von Blumenblättern oder von Blättern eines Baumes. Ptose kann mit fallen oder zerfallen übersetzt werden. Dieser Begriff wurde Anfang der Siebziger Jahre für eine bis dahin wenig beachtete Form des Zelltods geprägt, die sich wesentlich von der bis dahin hauptsächlich betrachteten Nekrose unterscheidet. Als Hauptsynonym wird heute der Ausdruck „Programmierter Zelltod“ benutzt. Bevor im Folgenden näher auf die Inzidenz, Morphologie, Biochemie und Kinetik der Apoptose eingegangen werden soll, soll hier im Gegensatz dazu noch der Begriff Nekrose definiert werden. Nekrose ist eine Form des Zelltods, die zytologisch durch Zellkernveränderungen wie Pyknose, Karyorrhexis und Karyolyse, Eosinophilie des Zytoplasmas und Anschwellen der Zelle auffällt. Das umliegende Gewebe wird durch Entzündungszellen wie Leukozyten infiltriert, und es findet eine Demarkation des nekrotischen Gewebes mit Randsaumbildung und Bildung von Granulationsgewebe statt (Peschyrembel, 1994). Apoptotischer Zelltod unterscheidet sich von nekrotischem Zelltod in Struktur, Mechanismus und Folgen (Wyllie, 1981; Trump et al., 1981).

1.6.1. Inzidenz

Obwohl der apoptotische Zelltod erst relativ spät als eigene Entität beschrieben wurde, ist dessen große Bedeutung schnell eingeschätzt worden. Wyllie ging bereits 1981 davon aus, dass Apoptose wesentlich häufiger in lebendem Gewebe auftritt als Nekrose (Wyllie, 1981). Der programmierte Zelltod spielt in der Entwicklung des Embryos und Fetus, in der Entwicklung des Gehirns, des normalen Zellumsatzes eines Gewebes und vielen weiteren Vorgängen wie beispielsweise Atrophien oder auch Reifungsvorgängen in verschiedenen Organen eine entscheidende Rolle (Übersicht bei Kerr et al., 1972 und Arends und Wyllie, 1991).

1.6.2. Morphologie

Charakteristisch für Apoptose - im Gegensatz zur Nekrose – ist das Auftreten in einzelnen, verstreuten Zellen (Kerr et al., 1972). Die morphologischen Vorgänge kann man in drei Phasen gliedern. Im ersten Stadium kommt es zu einer Reduktion der Größe des Nukleus mit Kondensation des Chromatins (Arends und Wyllie, 1991), das als große, kompakte Masse an die nukleare Membran angrenzt. Dabei erscheint die Kernmembran gewunden und später auch eingekerbt, der Nukleolus ist vergrößert und dessen Granula wirken grobkörnig und zerstreut (Wyllie et al., 1980). Im Bereich des Zytosols kommt es zu einer Volumenreduktion mit Schrumpfung der Zellorgane, die zunächst ihre Struktur beibehalten. Das glatte endoplasmatische Retikulum dagegen schwillt an und beginnt mit der Zellmembran zu fusionieren. Zu diesem Zeitpunkt löst sich die betroffene Zelle aus dem Zellverband. Im zweiten Stadium wirft die Zellmembran Blasen, und sowohl Nukleus als auch zytosolische Organelle zerfallen in Fragmente und bilden glatte, membrangebundene apoptotische Körperchen („apoptotic bodies“) (Arends und Wyllie, 1991). Diese sind kompakt gepackt und von variabler Größe, beinhalten dennoch strukturell und chemisch sehr gut erhaltene Überreste des Zellinhaltes (Kerr et al., 1972). Diese werden ins umliegende Gewebe abgegeben und von Nachbarzellen oder mononukleären Phagozyten aufgenommen. Bei diesem Vorgang kommt es zu keiner inflammatorischen Begleitreaktion mit Zeichen einer exsudativen Entzündungsreaktion oder Einwandern von neutrophilen Granulozyten (Wyllie et al., 1980). In der letzten Phase kommt es in den Zellen, die die apoptotischen Körperchen aufgenommen haben, zur Aktivierung von lysosomalen Enzymen, um die apoptotischen Körperchen abzubauen. Dies geschieht mit einer hohen Geschwindigkeit (Wyllie et al., 1980), und die Nachbarzellen werden dabei auch zu einer erhöhten Synthese von lysosomalen Enzymen angeregt (Ballard und Holt, 1968). Wenn nun apoptotische Körperchen nicht von anderen Zellen aufgenommen werden und somit dem kontrollierten Abbau entkommen, kann es im freien Gewebe zu einem Anschwellen der Körperchen und zur Membranruptur kommen. Dies wird als sekundäre Nekrose bezeichnet, da es den morphologischen Veränderungen der Nekrose ähnlich, aber durch die deutlich kleineren Zellfragmente abzugrenzen ist (Wyllie et al., 1980). Somit stellen die Zellabbauvorgänge durch Programmierteren Zelltod eine schnelle und effektive Methode dar, ohne jedoch umliegendes vitales und nicht zum Tod verurteiltes Gewebe durch die Freisetzung gefährlicher Zellinhalte zu schädigen.

1.6.3. Kinetik

Es ist schwierig, genaue Zeitangaben über apoptotische Abläufe zu machen. Einerseits reagieren verschiedene Gewebe unterschiedlich schnell auf verschiedene Auslöser und andererseits laufen diese Vorgänge nie synchron ab und sind daher schwer zu messen, da bereits verdaute Zellen in einem Gewebeschnitt verpasst werden können. Sanderson zeigte, dass die Veränderungen in der Zelle, die mit Kondensation des Chromatins, Schrumpfung der Zellorganellen und Blasenbildung an der Zellmembran einhergehen, bereits innerhalb von wenigen Minuten vollendet sein können. In den nächsten ein bis zwei Stunden findet der Abbau der Überreste mittels sekundärer Nekrose statt (Sanderson, 1976). In ähnlichen Studien zeigen Wyllie et al., dass die durchschnittliche lichtmikroskopische Darstellung von apoptotischen Körperchen in experimentell verursachter Apoptose in Rattennebenierenrinde zwischen 12 und 18 Stunden liegt (Wyllie et al., 1980). Insgesamt erscheint es schwierig, Zellen mit apoptotischen Körperchen zu erfassen, da deren Entsorgung ein sehr rasch ablaufender Vorgang ist (Übersicht in Wyllie et al, 1980).

1.6.4. Mitochondrien und Apoptose

Mitochondrien spielen bei der Entscheidung über Leben und Tod einer Zelle eine entscheidende Rolle, die über deren Eigenschaft als Energielieferant hinausgeht. So geht eine Dysfunktion der Mitochondrien entweder mit Apoptose oder Nekrose einher (Desagher und Martinou, 2000; Green und Reed, 1998; Roy und Nicholson, 2000), je nachdem, wie schwer der Insult und wie hoch die verbleibende ATP-Menge ist. Mitochondrien spielen im Rahmen der Apoptose eine Schlüsselrolle, die über mehrere, zum Teil in gegenseitiger Beziehung stehende, Mechanismen zustande kommt. Diese sind u.a. Unterbrechung der Elektronentransportkette und des Energiemetabolismus, eine Dysfunktion des Redox-Potentials mit Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen und die Freisetzung von Caspase-aktivierenden Proteinen ins Zytosol (Green und Reed, 1998). Zur Freisetzung Caspase-aktivierender Proteine, wie Cytochrom C, werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. So könnte Cytochrom C, das sich im intermembranösen Raum befindet, durch eine Schwellung der Mitochondrien durch Einstrom von Wasser und löslicher Stoffe zu einer Ruptur nur der äußeren Membran und folgender Freisetzung ins Zytosol führen. Eine weitere Möglichkeit stellt die „permeability transition pore“ (PTP) dar, die durch Apposition transmembraner

Proteine zustande kommt (Desagher und Martinou, 2000). Kalzium-Ionen, verminderte ATP-Konzentrationen, anorganisches Phosphat, reaktive Sauerstoffradikale, pH-Veränderungen und ein niedriges Membranpotential erlauben ein Öffnen dieses Kanals, der schließlich über osmotisches Anschwellen zu einer Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führt. Auch Bax, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl2-Familie, könnte über Bindung an diese „permeability transition pore“ die Öffnung bewirken (Crompton, 1999). Das anti-apoptotische Bcl-2 kann dagegen bei Überexprimierung die Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran verhindern (Beal, 2000). Das so ins Zytosol gelangende Cytochrom C bildet gemeinsam mit Apaf1 und dATP/ATP durch Oligomerization den Apoptosom-Komplex. Dieser ist in der Lage, Pro-Caspase-9 zu binden und zu aktivieren (Li et al., 1997, Saleh et al., 1999; Zou et al., 1999). Pro-Caspase-9 kann nur bei Vollständigkeit dieses Apoptosom-Komplexes gespalten werden. Die aktivierte Caspase-9 kann sowohl weitere Pro-Caspase-9 Moleküle aktivieren, als auch nachfolgend weitere Mitglieder der Caspasen-Familie, die ihrerseits als Ausführungsorgane der Apoptose gelten und somit die Zelle zerstören.

1.6.5. Caspasen

Die Familie der Caspasen nimmt im Rahmen der Apoptose eine wichtige Rolle ein. Dabei wird ein extrinsischer und ein intrinsischer Weg unterschieden. Der extrinsische wird durch Aktivierung von Caspase-8 über „death receptors“ vermittelt, während der intrinsische über Cytochrom C Freisetzung und Bildung des Apoptosom-Komplexes mit Aktivierung von Caspase-9 und folgender Aktivierung von Caspase-3 vermittelt wird (Thornberry und Lazebnik, 1998). Da sich in neuronalem Gewebe nur niedrige Mengen von Caspase-8-Transkripten finden (Cohen, 1997), ist davon auszugehen, dass der für neurodegenerative Erkrankungen ausschlaggebende Weg der intrinsische sein dürfte. Deshalb wird hier nur auf die relevanten Caspasen dieses Weges eingegangen.

Caspasen sind eine Familie von Cystein-Proteasen, die ihre Substrate nach Asparaginsäureresten spalten. Sie werden als inaktive Vorläufer, den Pro-Caspasen, gebildet und besitzen kaum oder keine eigene katalytische Aktivität. Sie können aber nach Aktivierung sich selbst oder andere Caspasen durch negative oder positive Rückkopplungsmechanismen beeinflussen. Sie sind hochspezifisch für ihre Substrate (Cohen, 1997; Thornberry und Lazebnik, 1998) und daher geeignet als Enzyme einer für die Zelle so folgenschweren

Kaskade, an deren Ende der Tod einer Zelle steht. Die bislang vierzehn identifizierten Caspasen lassen sich funktionell in Initiator- und Exekutions-/Effektor-Caspasen untergliedern, und ein paar lassen sich unabhängig von der Apoptose Entzündungsvorgängen zuordnen. Zu den Initiator-Caspasen gehören Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-10, zu den ausführenden Caspasen gehören Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7 (Thornberry und Lazebnik, 1998).

Caspase-9 (ICE-LAP6, Mch6) ist die Initiator-Caspase des intrinsischen Apoptosewegs und wird durch den Apoptosom-Komplex aktiviert. Dabei wird das strukturell der Caspase-3 sehr ähnliche Enzym von seiner Vorläuferform mit einer molekularen Masse von ca. 47kD in zwei Untereinheiten von jeweils 37kD und 10kD gespalten, um in aktiver Form weitere Effektor-Caspasen zu prozessieren (Cohen, 1997).

Die Effektor-Caspasen wiederum spalten eine Vielzahl von Proteinen, wie die Apoptose-antagonisten Bcl-2 und Bcl-xl sowie Kinasen, die für die zytoplasmatische und nukleäre Kondensation, sowie die zelluläre Abtrennung und Erkennung durch Phagozyten verantwortlich sind. Weitere Substrate sind beispielsweise Gelsolin und Lamin, deren Spaltung eine Zerstörung des Aktinfilament-Netzwerkes bewirkt. Weiterhin verursachen sie DNS Fragmentierung und Bildung apoptotischer Körperchen. Auch zytosolische Endonukleasen wie CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) werden aktiviert (Übersicht in Cryns und Yuan, 1998).

Caspase-3 (CPP32, Yama, Apopain) stellt die Schlüssel-Effektor-Caspase dar und wird durch Caspase-9 von seiner inaktiven Form mit 32kD in seine aktive Form von 17kD überführt (Krajewska et al., 1997). Caspase-3 spaltet während der Apoptose wichtige strukturelle Proteine wie PARP (poly(ADP-ribose)polymerase), DNA-PK (ein DNA-Reparaturenzym), Proteinkinasen und Bestandteile von Splicingkomplexen (U1-70 kD) (Cohen, 1997). Interessanterweise werden auch die neurodegenerative Erkrankungen betreffenden Proteine wie Huntingtin (Goldberg et al., 1996), Präsenilin 1 und 2 (Kim et al., 1997, Vito et al., 1997) und das DRPLA Protein (Miyashita et al., 1997) durch Caspase-3 gespalten. Nachdem ersichtlich wurde, welche schwerwiegende Folgen die Aktivierung einer solchen Kaskade für eine Zelle bedeutet, konnte auch eine Anzahl von Caspase-Inhibitoren identifiziert werden (Cryns und Yuan, 1998).

1.6.6. Apoptose als möglicher Mechanismus des Zelltodes neurodegenerativer Erkrankungen

1.6.6.1. M. Huntington

Wie oben bereits erwähnt, können Mitochondrien sowohl nekrotischen als auch apoptotischen Zelltod auslösen, der in neuronalen Zellpopulationen auch nebeneinander existieren kann. Dabei entscheidet der Schweregrad des Insults oder die Toxizität des auslösenden Agens in Abhängigkeit der Höhe des bestehenden ATP-Levels, ob es zur Nekrose oder Apoptose kommt (Beal, 2000). Beim M. Huntington wird ein Defekt des mitochondrialen Energiemetabolismus vermutet, der sich auf Funde wie erhöhte Laktosespiegel und verringerte Phosphokreatinspiegel stützt. Des Weiteren führen mitochondriale Toxine zu einer selektiven Degeneration des Striatums im Tierversuch. *Post-mortem*-Untersuchungen von menschlichen Geweben von M. Huntington Erkrankten zeigen eine starke Verminderung der Aktivität der mitochondrialen Komplexe II und III, und zu einem geringeren Grad auch Komplex IV. Da die Anfälligkeit der Mitochondrien mit der Länge der CAG-Wiederholungen korreliert, wird eine sekundäre mitochondriale Dysfunktion angenommen (Beal, 2000). Beim Nervenzelltod beim M. Huntington kommt es zu keiner nennenswerten inflammatorischen Begleitreaktion. Zur Abklärung der Frage, ob bei M. Huntington apoptotische Prozesse für den Nervenzelluntergang verantwortlich sind, wurde eine Technik namens TUNEL verwendet. Dabei werden *in situ* Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNS erkannt, die für den programmierten Zelltod typisch sind. Der Nachweis dieser Strangbrüche im Striatum von M. Huntington Patienten macht das Vorkommen von Apoptose wahrscheinlich (Dragunow et al., 1995; Portera-Cailliau et al., 1995), beweist ihn aber ohne entsprechende Morphologie nicht definitiv. Zudem wird Apoptose als ein Mechanismus bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel bei M. Alzheimer (Shimohama, 2000), vermutet.

1.6.6.2. Vergleich zu anderen CAG-Repeat-Krankheiten

Bis heute sind neben dem M. Huntington mindestens 10 weitere Erkrankungen identifiziert, die auf einer expandierten (CAG)_n-Trinukleotid-Sequenz beruhen. Darunter befinden sich die Dentatorubropallidolysiane Atrophie (DRPLA), die Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA

oder Kennedy-Erkrankung), die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA 3 oder Machado-Joseph-Erkrankung), die Spinozerebellären Ataxien 1, 2, 6, 7 und 12. Ihnen sind folgende Merkmale gemeinsam: Sie äußern sich alle als autosomal-dominante neurodegenerative Erkrankungen (Ausnahme ist die SBMA), besitzen eine (CAG)_n-Trinukleotid-Sequenz im kodierenden Bereich des Gens, die sich als verlängerter Polyglutamintrakt äußert. Die Anzahl der CAG-Einheiten ist in der Meiose, besonders in der Gametogenese instabil, und das Phänomen der Antizipation korreliert mit zunehmender Länge. Ihre klinische Manifestation findet im mittleren Lebensalter statt und zieht einen progressiven bilateralen, symmetrischen Nervenzellverlust nach sich und endet mit dem Tod. Bei all diesen Erkrankungen wird eine neu erworbene toxische Eigenschaft des Proteins mit dem verlängerten Polyglutamintrakt angenommen (Gusella und MacDonald, 1997; Young, 1998). Allerdings sind die jeweiligen Proteine nicht miteinander verwandt, und zum Teil sind deren physiologische Funktionen noch nicht bekannt (Ausnahmen bilden die SBMA und die SCA Typ 6). Miyashita et al. zeigten für die DRPLA experimentell, dass expandierte Polyglutaminsequenzen zum einen zu nukleären Aggregaten und apoptotischen Veränderungen im Zellkern, zum anderen auch zu einer Aktivierung von Initiator- und Effektor-Caspasen führen (Miyashita et al., 1999). Des Weiteren wird in Zellkulturen, die das mutierte DRPLA-Protein exprimieren, ein höherer prozentualer Anteil von apoptotischen Zellen beobachtet (Igarashi et al., 1998; Sato et al., 1999). *In vitro* ist es möglich, das DRPLA-Protein mittels rekombinanter Caspase-3 zu spalten. Dieses stellt somit ein Substrat der Effektor-Caspase-3 dar (Miyashita et al., 1997). Die Zellen bei SBMA, die einen mit verlängerter Polyglutaminsequenz ausgestatteten Androgen-Rezeptor besitzen, zeigen eine erhöhte Bereitschaft zum apoptotischen Zelltod. Auch dieser Androgen-Rezeptor wird von einer Caspase-3-ähnlichen Caspase gespalten (Ellerby et al., 1999). Neben Huntingtin werden also Atrophin-1 (DRPLA-Protein), Ataxin-3 (SCA 3) und der Androgen-Rezeptor (SBMA) in apoptotischen Extrakten gespalten, und alle werden von einer oder mehreren Caspasen, die am apoptotischen Zelltod beteiligt sind, prozessiert (Wellington et al., 1998).

2. Problemstellung

Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, einschließlich dem M. Huntington, findet der zur Atrophie führende Nervenzellverlust ohne wesentliche histologische inflammatorische Begleitreaktion statt. Mitochondrien spielen beim Nervenzelltod beim M. Huntington eine Rolle und es gibt eine Vielzahl von Hinweisen auf eine Beteiligung durch Apoptose. Auch das mutierte Protein Huntingtin wird durch Effektor-Caspasen, die an der Apoptose beteiligt sind, gespalten. Unter der Annahme, dass der intrinsische Weg der Apoptose beim M. Huntington für den Nervenzellverlust mitverantwortlich ist, sollten die den Apoptosom-Komplex bildenden Komponenten freigesetzt bzw. aktiviert werden.

Die hier vorliegende Dissertationsarbeit soll daher die Freisetzung bzw. Aktivierung einzelner Komponenten des Apoptosom-Komplexes aufzeigen und in zeitlichen Zusammenhang zum Stadium der Erkrankung setzen. Folgende Hypothesen sollten hierfür überprüft werden:

- Der erste Schritt zur Apoptosom-Formation stellt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol dar. Daher sollte es beim M. Huntington zu einer Umverteilung des Cytochroms C von der mitochondrialen in die zytosolische Fraktion kommen.
- Zur Apoptosom-Bildung ist die aktivierte Form der Caspase-9 notwendig. Diese sollte daher neben der Pro-Caspase-9 ebenfalls beim M. Huntington nachweisbar sein. Durch Bildung des Apoptosom-Komplexes wird Caspase-3 aktiviert und sollte daher auch nachweisbar sein.
- Da bereits zu Beginn der Erkrankung ein großer Teil der Nervenzellen untergeht, sollte sowohl die Cytochrom C-Umverteilung als auch der Nachweis der Caspasen-9 und -3 in frühen pathologischen Stadien darstellbar sein.

Zur Überprüfung dieser Überlegungen wird in dieser Studie Striatumgewebe von M. Huntington Patienten und von transgenen Mäusen der Linie R6/2 immunhistochemisch aufgearbeitet, und zur Bestätigung werden die Proteine mittels Western Blot Verfahren nachgewiesen. Dabei wird Gewebe aller Erkrankungsstadien verwendet.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Gewebeproben

3.1.1.1. Humanes Gehirngewebe

Die bei dieser Untersuchung verwendeten menschlichen Gehirngewebeproben stammen aus dem Bedford VA Medical Center Brain Tissue Archive (Bedford/USA), von dem St. Louis Medical Center (St. Louis/USA) und von der Emory University (Atlanta/USA).

Dabei wurden striatale Gewebeproben von 19 klinisch und genetisch diagnostizierten MH-Patienten verwendet. *Post mortem* wurde die Diagnose M. Huntington jeweils bestätigt und den pathologischen Stadien (Vonsattel et al., 1985) nach eingeteilt: Zwei Stadium 1, drei Stadium 2, fünf Stadium 3 und neun Stadium 4 Patienten (mittleres Alter 64,7 Jahre, im Bereich von 58-73 Jahre). Bei der Mehrzahl der M. Huntington Patienten (14/19) wurde eine CAG-repeat Analyse durchgeführt, die im Bereich von 41 und 52 Wiederholungen lag.

Für die Kontrollen wurden striatale Gewebeproben von sechs Patienten vergleichbaren Alters (mittleres Alter 68,1 Jahre, im Bereich von 62-79 Jahre) ohne bekannte neurologische Erkrankung verwendet.

Nach einem mittleren *post-mortem*-Intervall von 8,1h (Intervallbereich zwischen 4-20h) wurden alle Gehirne frisch seziiert. Die für die Immunhistochemie verwendeten Gehirne wurden in 4°C kalter 2%iger Paraformaldehyd-Lysin-Periodat-Lösung über 24-36h fixiert. Anschließend wurden die Gewebelöcke mit 0,1M PBS-Puffer gespült und über die nächsten 36h in Frostschutzmittel mit einer ansteigenden Konzentration von 10% Glycerol / 2%DMSO-Lösung bzw. 20% Glycerol / 2%DMSO-Lösung eingelegt. Mit einem Mikrotom (Zeiss) wurden serielle Gefrierschnitte in koronarer Schnittebene mit einer Dicke von 50µm angefertigt, beginnend mit der anterioren Kommissur bis zum rostralen Segment des Neostriatums. Die Gewebeschnitte wurden für die nachfolgende histochemische Bearbeitung in Sammelbehältern mit 0,1M PBS-Puffer / 0,08% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

Die für die Western Blot Verfahren verwendeten Gehirne wurden mittels flüssiger Stickstoff-Vaporisation schockgefrostet und bei -20°C gelagert. Dafür wurden 6 Stadium 3, 6 Stadium 4 und 6 Kontrollgehirne ohne bekannte neurologische Erkrankung benutzt.

3.1.1.2. Transgenes Mausgehirngewebe

Transgene Mäuse der Linie R6/2 mit 145 eingeschleusten CAG-repeats im Exon 1 des Huntingtin-Gens und negative Kontrollen aus dem selben Wurf wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME/USA) bezogen. Die Männchen der R6/2 Linie wurden mit den Weibchen ihrer Abstammungslinie gekreuzt (B6 CBAFI/J). Die Jungen wurden mittels PCR Assays genotypisiert, die DNS dafür wurde aus Schwanzgewebe gewonnen. Die transgenen Tiere wurden in einer modifizierten, abgesperrten Einrichtung in Käfigen mit 34 gleichgeschlechtlichen Tieren gehalten, einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus und freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser ausgesetzt.

Für die Immunhistochemie wurden Gruppen von den transgen negativen und transgen positiven Tieren (jeweils n=8-10) aus derselben „f“-Generation zu den Zeitpunkten 28, 63 und 90 Tagen verwendet. Dabei wurden die Tiere in eine tiefe Anästhesie mittels CO₂ versetzt und nach Eröffnung des Brustkorbes transkardial mit 4% gepufferter Paraformaldehyd-Lysin-Periodat-Lösung perfundiert. Nach der Fixierung wurden die Gehirne entnommen und weitere 24-36 Stunden in 4% Paraformaldehyd-Lysin-Periodat-Lösung postfixiert.

Anschließend wurden die Mausgehirne mit 0,1M PBS-Puffer gespült und über die nächsten 36h in Frostschutzmittel mit einer ansteigenden Konzentration von 10% Glycerol/2%DMSO- bzw. 20% Glycerol/2%DMSO-Lösung eingelegt. Mit einem Mikrotom (Zeiss) wurden serielle Gefrierschnitte in koronarer Schnittebene mit einer Dicke von 50µm angefertigt, beginnend von der anterioren Kommissur bis zum rostralen Segment des Striatums. Die Gewebeschnitte wurden für die nachfolgende histochemische Bearbeitung in Sammelbehältern mit 0,1M PBS-Puffer/0,08% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

Die für Western Blot Analysen benötigten Tiere der R6/2 Linie aus dem gleichen Wurf (Gruppen von transgen negativen und transgen positiven mit jeweils n=8-10) wurden zu den Zeitpunkten von 28, 63 und 90 Tagen getötet und die Gehirne sofort frisch entnommen, tiefgekühlt und für die Western Blots verwendet.

3.1.2. Verbrauchsmaterial

3.1.2.1. Antikörper

- **Anti-Cytochrom C von PharMingen**

Bezogen von PharMingen International (San Diego, CA/USA); verwendet in einer Verdünnung von 1:500 für immunhistochemische Anwendungen und Western Blot Verfahren.

Anti-Cytochrom C ist ein gereinigter monoklonaler Maus-AK, der das Cytochrom C (Apaf2) aus der Klasse der Cytochrome von Mensch, Maus, Ratte, Pferd und Taube erkennt. Cytochrom C ist ein wasserlösliches peripheres Membranprotein, das Elektronen vom Coenzym QH₂-Cytochrom C-Reduktase-Komplex zum Cytochrom C-Oxidase-Komplex in der mitochondrialen Atmungskette transportiert. Des Weiteren wird einer Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien eine wichtige Rolle in der Apoptose zugeschrieben, mit einer folgenden Aktivierung von Caspasen, u.a. Caspase-3 (s.o.).

In Western Blot Analysen wandert Cytochrom C als 15 kD-Bande.

Ausgewählte Literaturstellen: Boyer et al. (1977), Liu et al. (1996), Jemmerson et al. (1991).

- **Anti-Cytochrom C von Zymed**

Bezogen von Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA/USA); verwendet in einer Verdünnung von 1:500 für immunhistochemische Anwendungen.

Auch dieses Anti-Cytochrom C ist ein gereinigter monoklonaler Maus-AK, der das Cytochrom C (Apaf2) von Mensch, Maus, Ratte und Kaninchen erkennt. Er wurde aufgrund besserer Ergebnisse bei Mausgewebeprobeben benutzt.

- **Anti-Caspase-9 von PharMingen**

Bezogen von PharMingen International (San Diego, CA/USA); verwendet in einer Verdünnung von 1:500 für immunhistochemische Anwendungen.

Anti-Caspase-9 ist ein gereinigter monoklonaler Maus-AK, der Caspase-9 (ICE-LAP6, Mch6), ein Mitglied aus der Familie der Cystein-Proteasen, in der Vorläuferform als Pro-Caspase-9 erkennt. Diese Pro-Form wird in Untereinheiten gespalten, die

zur Ausbildung eines aktiven heterodimeren Enzyms führen, das daraufhin weitere Caspasen in einer Kaskade aktivieren kann (s.o.).

Ausgewählte Literaturstellen: Srinivasula et al. (1996), Li et al. (1997), Duan et al. (1996), Cohen (1997).

- **Anti-Caspase-9 (37kD) von Cell Signaling Technology**

Bezogen von Cell Signaling Technology (Beverly, MA/USA); verwendet in einer Verdünnung von 1:50 für immunhistochemische Anwendungen und Western Blot Verfahren.

Anti-Caspase-9 (37kD) ist ein polyklonaler Kaninchen-AK, der die aktivierte Form der Caspase-9 (37kD) detektiert. Pro-Caspase-9 (47kD) bildet mit Cytochrom C und Apaf1 den Apoptosom-Komplex, bei dem durch Spaltung der Pro-Caspase-9 eine große, aktive (37kD) und eine kleinere Untereinheit (10kD) entsteht. Diese aktivierte Caspase-9 aktiviert daraufhin weitere Effektor-Caspasen in der Kaskade. Dieser Antikörper erkennt nur die aktive Form (37kD, wenn gespalten an Position Asp330) und bildet keine Kreuzreaktivität mit der Pro-Form des Enzyms.

In Western Blot Analysen wandert aktivierte Caspase-9 als 37kD-Bande.

Ausgewählte Literaturstellen: Duan et al. (1996), Srinivasula et al. (1996), Liu et al. (1996), Li et al. (1997).

- **Anti-Caspase-3 von PharMingen**

Bezogen von PharMingen International (San Diego, CA/USA); verwendet in einer Verdünnung von 1:500 für immunhistochemische Anwendungen.

Anti-Caspase-3 ist ein polyklonaler Kaninchen-AK, der Caspase-3 (CPP32, Yama, Apopain) sowohl in der Pro-Form (32kD) als auch in der aktiven Form (17kD) bei Mensch und Maus erkennt. Caspase-3 gilt als exekutiver, ausführender Bestandteil der apoptotischen Kaskade, der in seiner aktivierten Form (nach Aktivierung durch andere Caspasen, aber auch durch Autoproteolyse) wichtige Moleküle in der Zelle proteolytisch und somit letztlich den Zelltod einleitet (s.o.).

Ausgewählte Literaturstellen: Fujita und Tsuruo (1998), Krajewska et al. (1997), Susin et al. (1997), Krajewski et al. (1997).

3.1.2.2. Lösungen für die Immunhistochemie

- **2%ige Paraformaldehyd-Lysin-Periodat-Lösung**
1L Aqua dest. auf 60°C erhitzen und darin lösen:
5ml 10M NaOH (Natronlauge)
60g Paraformaldehyd
33g dibasisches Na₂PO₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)
auf Raumtemperatur abkühlen lassen und dann darin lösen:
9g monobasisches Na₂PO₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)
6,45g Na-m-Periodat
41,1g Lysin-Salzsäure-Salz
filtrieren, mit Aqua dest. auf 3L auffüllen und mit 10M Natronlauge auf pH 7,4 einstellen
- **10% (bzw. 20%) Glycerol / 2% DMSO-Lösung** (DMSO = Dimethylsulfoxid-Lsg.)
2,7L (bzw. 2,4L) 0,1M Phosphat-Puffer (pH 7,4)
300ml (bzw. 600ml) Glycerol
60ml DMSO-Lösung
- **PBS-Puffer 0,1M, pH 7,35** (PBS = phosphate buffered saline)
In 1L Aqua dest. lösen:
11g dibasisches Na₂PO₄
3g monobasisches Na₂PO₄
8,5g NaCl (Kochsalz)
mit Salzsäure auf pH 7,35 einstellen
- **Methanol / 0,3% Wasserstoffperoxid-Lösung**
100ml reines Methanol
1ml 33%iges H₂O₂ (Wasserstoffperoxid)
- **Tris-HCl-Puffer 50mM (bzw. 0,1M), pH 7,4**
In 1L Aqua dest. lösen:
6,1g (bzw. 12,2g) Tris(Trishydroxymethylaminomethan)-Base
3ml konzentrierte HCl (Salzsäure) (37%ig)

mit Salzsäure auf pH 7,4 einstellen

- **Block-Lösung (für 100ml)**

90ml PBS-Puffer (0,1M, pH 7,35)

10ml normales Ziegen-Serum (GIBCO, Grand Island, NY/USA)

- **Primär-Antikörper-Lösung (für 100ml)**

98ml PBS-Puffer (0,1M, pH 7,35)

2ml normales Ziegen-Serum (GIBCO, Grand Island, NY/USA)

0,3ml Triton X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA)

1,25ml 8%iges Natriumazid (zur Konservierung)

dazu in entsprechenden Verdünnungen (s.o.) die Primär-Antikörper-Seren

- **Sekundär-Antikörper-Lösung (für 100ml mit 1:300 Verdünnung)**

98ml PBS-Puffer (0,1M, pH 7,35)

2ml normales Ziegen-Serum (GIBCO, Grand Island, NY/USA)

0,33ml Peroxidase-konjugierte Ziegen-anti-Maus- bzw. Ziegen-anti-Kaninchen-IgG
(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN/USA)

- **DAB-Färbelösung**

110ml Tris-HCl-Puffer (50mM, pH 7,6)

70mg Natrium-Imidazol, gelöst in 10ml 0,1M Phosphat-Puffer (Sigma Chemical,
St. Louis, MO/USA)

1mg DAB (3,3'-Diaminobenzidin) (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA)

4 Mikrotropfen H₂O₂ (aus Spritze)

3.1.2.3. Lösungen für Western Blot Verfahren

- **Extraktions-Puffer-Lösung (für 100ml)**

80ml Aqua dest.

0,477g 20mM HEPES KOH (N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethan-sulfonsäure])
(pH 7,5) (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA)

8,558g Sucrose

0,075g 10mM KCl (Kaliumchlorid)
150µl 1M MgCl₂ (Magnesiumdichlorid)
200µl 0,5M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA)
20ml 5mM EGTA (Ethylenglykol-bis[beta -aminoethylether]-N,N,N'N' -tetraessigsäure) (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA)
200µl 0,5M DTT (Dithiothreitol) (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA)

- **Ladungs-Puffer-Lösung (für 1ml)**

2% SDS (Natriumdodecylsulfat) (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA)
100mM DTT
60mM Tris (pH 6,8)
0,01% Bromophenol Blue
10% Glycerol

- **Lauf-Puffer-Lösung (für 1L)**

900ml Aqua dest.
100ml 10x Tris/Glycine/SDS Puffer (BioRad, Hercules, CA/USA)

- **Transfer-Puffer-Lösung (für 1L)**

700ml Aqua dest.
200ml Methanol
100ml 10x Tris/Glycine Puffer (BioRad, Hercules, CA/USA)
1g SDS

- **PBS-Milch-Lösung (für 50ml)**

50ml PBS-Puffer
2,5g non-fat Milchpulver (BioRad, Hercules, CA/USA)

- **PBS-0,05% Tween20-Lösung (für 50ml)**

50ml PBS-Puffer
25µl Tween20

- **DAB-Färbe-Lösung**

110ml Tris-HCl-Puffer (50mM, pH 7,6)

70mg Natrium-Imidazol, gelöst in 10ml 0,1M Phosphat-Puffer (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA)

1mg DAB (3,3'-Diaminobenzidin) (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA)

4 Mikrotropfen H₂O₂ (aus Spritze)

3.2. Methoden

3.2.1. Immunhistochemie

3.2.1.1. Gewebeaufbereitung und Färbetechnik

Für die immunhistochemische Färbung wurde die indirekte Methode mit Peroxidase-konjugiertem zweiten Antikörper (AK) benutzt (Polak und Van Noorden, 1987). Alle immunhistochemischen Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst wurden die 50µm dicken Gehirnschnitte für 30min flach in einer Petrischale mit Methanol/0,3% Wasserstoffperoxid-Lösung ausgebreitet, um gewebeständige endogene Peroxidasen zu unterdrücken. Um überschüssiges Wasserstoffperoxid zu entfernen, wurden die Schnitte dreimal für 10min in PBS-Puffer auf einer Wippe gewaschen.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, erfolgte eine einstündige Vorinkubation auf einer Wippe in einer Block-Lösung, die 10% Ziegen-Serum enthält.

Anschließend fand die Inkubation mit Primär-AK-Lösung (Primär-AK: Anti-Cytochrom C, Anti-Caspase-9, Anti-Caspase-9 (37kDa), Anti-Caspase-3) statt. Dabei wurden die Gewebeschnitte freischwimmend in der Primär-AK-Lösung für 12-18h auf der Wippe inkubiert. Das in der Primär-AK-Lösung enthaltene 0,3% Triton X-100 diente der besseren Gewebepenetration durch Zerstörung von Zellmembranlipiden und der 2%ige Ziegen-Serum-Anteil der Verminderung von unspezifischer Hintergrundfärbung. Hierauf folgten erneut drei Waschvorgänge mit PBS-Puffer für jeweils 10min auf der Wippe.

Die Gewebeschnitte wurden im weiteren mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-AK für 3-5h freischwimmend auf der Wippe inkubiert. Die Sekundär-AK (Ziegen-anti-Maus-AK

gegen Cytochrom C und Caspase-9 sowie Ziegen-anti-Kaninchen-AK gegen aktivierte Caspase-9 (37kD) und Caspase-3) wurden dabei in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Erneut wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10min in PBS-Puffer gewaschen.

Zur optischen Darstellung der gebundenen Peroxidase-konjugierten Sekundär-AK konnten die Gewebeschnitte nun in der DAB-Färbelösung bis zur optimalen Intensität ca. 210min gefärbt werden. Dabei reduziert die Peroxidase Wasserstoffperoxid zu freien Sauerstoffradikalen, die wiederum das farblose DAB oxidieren und als braunes Polymer präzipitieren lassen. Das 0,01M Imidazol intensiviert die Peroxidase-Reaktion (Straus, 1982).

Um die unspezifische Hintergrundfärbung sowie die Spezifität der Antisera zu beurteilen, wurden einige Kontrollschnitte unter fehlender Primär-AK-Inkubation bzw. nach vorheriger Absorption jener mit bekanntem Antigen / Protein dem gleichen Färbeprozess unterzogen. Es ergab sich lediglich eine diffuse, homogene Verdunklung des gesamten Gewebes.

3.2.1.2. Fertigstellung der Präparate

Nach Abschluss des Färbeprozesses wurden die Gewebeschnitte noch einmal gründlich in PBS-Puffer-Lsg. gewaschen, um Reste des DAB zu entfernen und in feuchtem Zustand auf Gelatine-beschichtete Glasobjektträger aufgetragen. Nach mehrtägigem Trocknen wurden die Präparate mit ParaMount® als Medium und Deckgläsern versiegelt.

3.2.2. Western Blot Verfahren

3.2.2.1. Gewebeaufbereitung

Unterschiedliche Gewebeaufbereitungstechniken wurden zur Darstellung von totaler oder mitochondrialer und zytosolischer Proteine verwendet. Jeweils wurden Hirngewebe von Mensch und Maus der verschiedenen Stadien (bzw. verschiedener Zeitpunkte) und gleichaltrige Kontrollgewebe benutzt. Jeweils zu 20ml Extraktions-Puffer-Lösung wurde eine Tablette Complete mini-EDTA-free protease inhibitor cocktail von Roche (Nutley, NJ/USA) zugesetzt. Für die Extraktion der totalen Proteinfraction wurde 0,05-0,1g Gewebe (gefroren bei -20°C) zusammen mit 150µl der Extraktions-Puffer-Lösung in ein Eppendorf-Röhrchen

gegeben und mit einem motorisierten Teflonstößel homogenisiert. Nach einer weiteren Zugabe von 200µl Extraktions-Puffer wurden die Proben bei 4°C für 10min bei 10.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen pipettiert und der Niederschlag verworfen. Der Überstand wurde für die weitere Analyse zur Darstellung der totalen Proteinfraktion der Zelle verwendet.

Für die Trennung von mitochondrialer und zytosolischer Proteinfraktion wurde 0,05-0,1g Gehirngewebe zusammen mit 300µl Extraktions-Puffer-Lösung in einem Eppendorf-Röhrchen bei 4°C für 10min bei 750g zentrifugiert. Darauf folgte eine zweite Zentrifugation, bei 4°C für 20min bei 8000g. Der resultierende Niederschlag wurde mit einem Teflonstößel in 200µl Extraktions-Puffer-Lösung ohne Sucrose homogenisiert und stellte für die weitere Analyse die mitochondriale Fraktion dar.

Der Überstand wurde erneut bei 4°C für 60 min bei 100.000g zentrifugiert. Der aus diesem Schritt gebildete Überstand stellte die zytosolische Fraktion dar (Verfahren s. auch Fujimura et al., 1998).

3.2.2.2. Western Blot Technik und Färbung der Nitrozellulosestreifen

Die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Eppendorf-Röhrchen wurden mit der Konzentrationsuntersuchung mittels des Pierce Coomassie Protein Assay Reagent Kits (Rockford, IL, USA) und des Elx800UV Spektrometers bestimmt. Dies ist wichtig, um später zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen auf jede Spur im Gel geladen werden. Dabei wurde mit Standardproteinmengen und deren Absorbanzmittelwerten eine Kurve in Microsoft Excel erstellt, anhand derer sich die Proteinmengen in µg/ml der Proben mit ihren entsprechenden Absorbanzmittelwerten berechnen ließen. Nun musste entsprechend des jeweiligen Proteingehaltes jede Probe mit Extraktions-Puffer-Lösung verdünnt werden, um in allen Proben die gleiche Proteinkonzentration zu erhalten.

Die Proben wurden daraufhin im Verhältnis 1:2 mit Ladungspuffer weiter verdünnt und die enthaltenen Proteine 5min im siedenden Wasserbad denaturiert. Währenddessen wurden die kommerziell erhältlichen, tiefgekühlten Fertiggels, hier 415% polyacrylamide gradient gels von BioRad (Hercules, CA/USA) gründlich mit Aqua dest. gespült und in die mini-protean III-Apparatur (BioRad, Hercules, CA/USA) eingebracht. Die Lauf-Puffer-Lösung wurde zugegeben und 20µl von der jeweiligen Probe in die einzelnen Spuren geladen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Proteinmengen der zytosolischen Fraktion 3,6µg, der

mitochondrialen 2,2µg und die der totalen Fraktion 5µg betragen. Die erste Spur wurde mit einem vorgegebenen Protein-Größen-Standard geladen. Eine zweite Spur wurde mit einer positiven Kontrolle (HL-60 Cell Lysate, Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ/USA)) geladen. Bei einer Spannung von 220V und einer Stromstärke von 120mA liefen die Proben für 30-40min.

Im Blotting-Schritt wurde das durchgelaufene Gel mit einer Nitrozellulose-Membran in der Transfer-Puffer-Lösung zusammengebracht, so dass die Proteine in die Nitrozellulose-Membran wandern. Dazu musste die Stromquelle für 60min auf 350mA eingestellt werden.

Zur Entfernung von Rückständen wurde die Nitrozellulose-Membran zweimal für 5min auf der Wippe mit Aqua dest. gewaschen und danach für 60min mit PBS-Milch auf der Wippe vorinkubiert, um später unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Daran schloss sich erneut ein zweimaliger Waschvorgang für jeweils 5min mit Aqua dest. auf der Wippe an. In einer Mischung von PBS-Milch und Antikörper (für Anti-Cytochrom C von PharMingen in Verdünnung 1:1000 und für Anti-Caspase-9 (37kD) in Verdünnung 1:1000) wurde die Nitrozellulose-Membran über Nacht bei 4°C auf einer Wippe inkubiert.

Bevor die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper erfolgte, wurde die Membran wieder zweimaligem Waschen mit Aqua dest. für 5min auf der Wippe unterzogen. Für Anti-Cytochrom C wurde Ziegen-Anti-Maus-AK, für Anti-Caspase-9 (37kD) Ziegen-Anti-Kaninchen-AK, jeweils in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-Milch, verwendet. Die Membran wurde 3-5h auf der Wippe inkubiert. Danach schloss sich ein Waschvorgang in der PBS-0,05%Tween20-Lösung für 5-15min und schließlich fünf Waschvorgänge mit Aqua dest. an.

Um die Banden darzustellen, wurde die Membran in einer DAB-Lösung (s. Zubereitung und Wirkmechanismus oben) gefärbt.

3.3. Auswertung

3.3.1. Immunhistochemische Auswertung

Für die Neuronenanalysen wurden Gehirngewebeschnitte vom rostralen Segment des Neostriatums bis zur anterioren Kommissur verwendet. Zur Erfassung der Durchschnittswerte von Cytochrom C-positiven Nervenzellen erfolgte eine stereologische Auszählung von

Cytochrom C-positiven Neuronen und der totalen Population von hämatoxylin-gegengefärbten Neuronen mit Hilfe von NeuroLucida Stereo Investigator Software (MicroBrightfield, Colchester, VT/USA). Dabei wurden die ausgewerteten mikroskopischen Gesichtsfelder randomisiert. Die mit der Computer-Software erkannten Neuronen wurden manuell optisch verifiziert, ausgezählt und in Microsoft Excel importiert. Die statistischen Vergleiche wurden mittels ANOVA und dem t-Test für unabhängige Stichproben (Student-Test) durchgeführt.

3.3.2. Western Blot Auswertung

Die Membranen mit den angefärbten Banden wurden im feuchten Zustand eingescannt und einer Bildverarbeitungs-Software (Adobe Photoshop von Microsoft) unterzogen. Dabei wurde sowohl die Lage der Banden (15kD für Cytochrom C und 37kD für gesplaltene Caspase-9) verifiziert, als auch die Intensität der einzelnen Proteinbanden verglichen und standardisiert festgehalten.

4. Ergebnisse

4.1. Cytochrom C

Bei Annahme des intrinsischen Wegs der Apoptose wird Cytochrom C im ersten Schritt aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt. Dort agiert es als Bestandteil des Apoptosom-Komplexes, der darauf folgend Caspasen aktiviert.

4.1.1. Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden in Gewebeschnitten Proteine bzw. Enzyme mit einem spezifischen Antikörper detektiert und in einem weiteren Schritt mittels eines konjugierten zweiten Antikörpers zur Darstellung gebracht.

4.1.1.1. Cytochrom C in menschlichem Hirngewebe

Die immunhistochemische Darstellung von Cytochrom C in den Kontrollschnitten zeigt eine punktförmige Verteilung innerhalb der Nervenzellen und kennzeichnet das Vorhandensein von Mitochondrien. Im Zytoplasma dieser Nervenzellen hingegen besteht nur eine minimale Hintergrundfärbung. Man findet dieses Verteilungsmuster in allen Zellen. Demgegenüber nimmt der immunzytochemische Nachweis von Cytochrom C im Neostriatum der an M. Huntington erkrankten Patienten mit dem Grad der neuropathologischen Schwere zu, wie im Vergleich zu den nicht-pathologischen Kontrollen ersichtlich wird (Abb. 4.1 A,B). In beiden gezeigten M. Huntington Stadium 1 Fällen ist die Intensität der Cytochrom C-Anfärbung im Zytoplasma des neuronalen Somas im Neostriatum etwas stärker ausgeprägt als in den Kontrollschnitten (Abb. 4.1 C,D). Sowohl die Anzahl der im Zytoplasma gefärbten striatalen Nervenzellen als auch die Immunintensität von Cytochrom C nimmt in moderaten (Stadium 2) Fällen von M. Huntington zu (Abb. 4.1 E,F). Die Intensität erreicht ihren Höhepunkt in den schweren (Stadium 3) und sehr schweren (Stadium 4) neuropathologischen M. Huntington Fällen. In diesen Fällen ist die Cytochrom C immunzytochemische Färbung im Zytoplasma der Nervenzellen am ausgeprägtesten (Abb. 4.1 G-J).

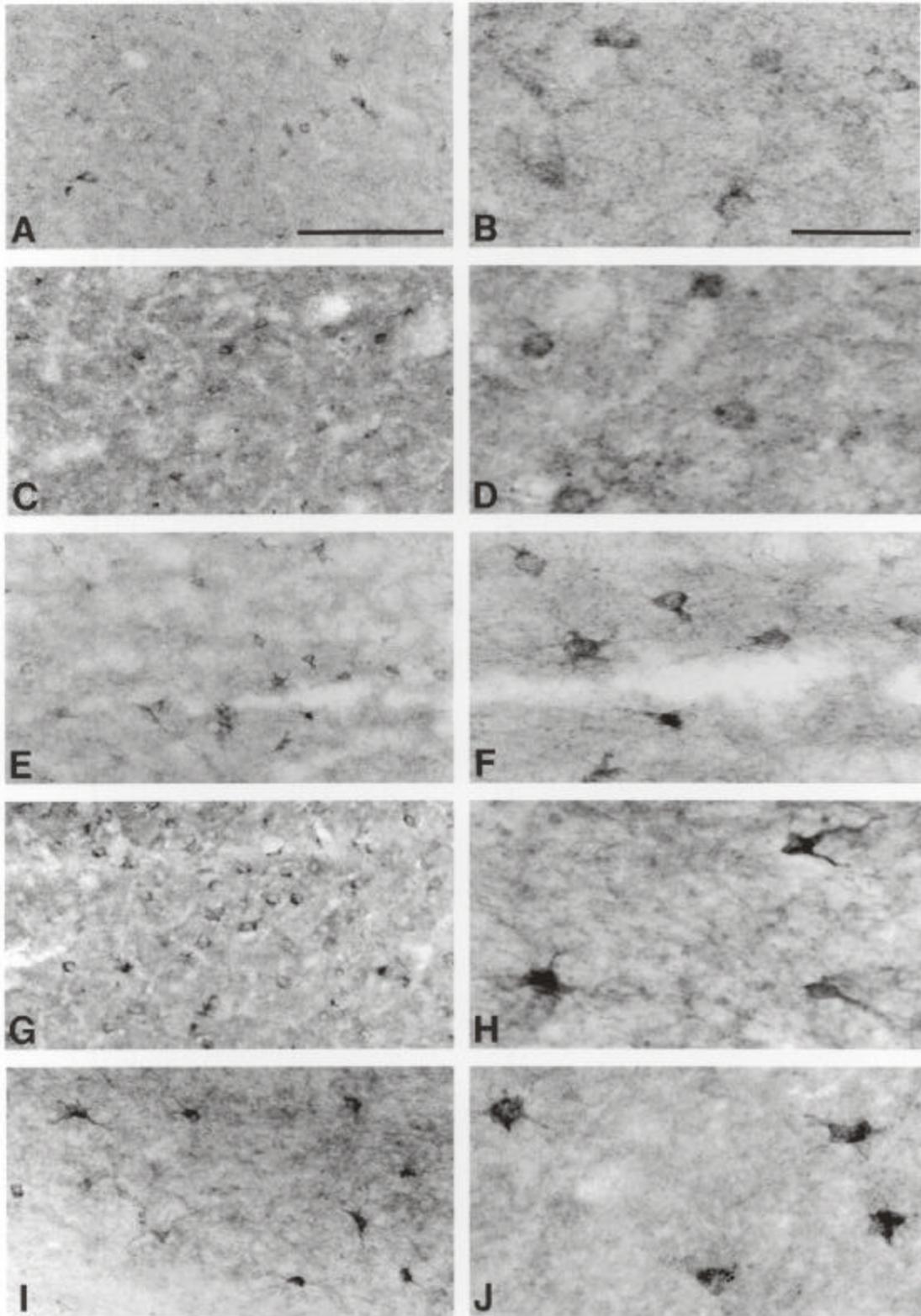


Abb. 4.1. (vorhergehende Seite)

Cytochrom C- Immunreaktivität im medialen Teil des Nucleus caudatus einer nicht-pathologischen Kontrolle (A und B) und M. Huntington Patienten verschiedener Stadien (Stadium 1, C und D; Stadium 2, E und F; Stadium 3, G und H; Stadium 4; I und J). Cytochrom C- Immunfärbung ist in allen Zellen, Nervenzellen wie Gliazellen, der Kontrollschnitte vorhanden und zeichnet sich durch eine punktförmige Verteilung im somalen Zytoplasma und in den Ästen aus (A und B). Die neuronale Cytochrom C-Immunreaktivität nimmt mit dem neuropathologischen Schweregrad zu. Im Vergleich zu den Kontrollen sind in den fortgeschrittenen Stadien (Stadium 3 und 4) das Zytoplasma des Nervenzellkörpers und die primären dendritischen Äste intensiv immunzytochemisch markiert. Vergrößerungsbalken in A, C, E, G und I: 200µm; Vergrößerungsbalken in B, D, F, H, und J: 50µm.

Jedoch ist die immunhistochemische Intensität der Cytochrom C-Darstellung nicht in allen striatalen Nervenzellen der an M. Huntington erkrankten Patienten möglich. In allen hier untersuchten Gewebeschnitten sind nie mehr als 30% der Nervenzellpopulation in den leichten und 60% in den schweren M. Huntington Fällen stark immunpositiv für Cytochrom C. Auch innerhalb der fortgeschrittenen neuropathologischen Stadien zeigt sich ein breites Spektrum von moderater bis sehr starker neuronaler und zytosolischer Cytochrom C-Immunanfärbung. Topographische Unterschiede in der Anzahl der für Cytochrom C-positiven Nervenzellen und der Cytochrom C-Immunintensität sind im gesamten Neostriatum ausgeprägt. Übereinstimmend mit der beschriebenen dorso-ventralen Progression des Nervenzellverlusts finden sich deutlich weniger Cytochrom C immunzytochemisch gefärbte Nervenzellen im stärker betroffenen dorsalen Teil als im weniger vulnerablen ventralen Striatum (Abb. 4.2 A,B). Dagegen ist die Cytochrom C-Immunreaktivität im Zytoplasma der dorsalen striatalen Nervenzellen deutlich ausgeprägter als die der im ventralen Striatum.

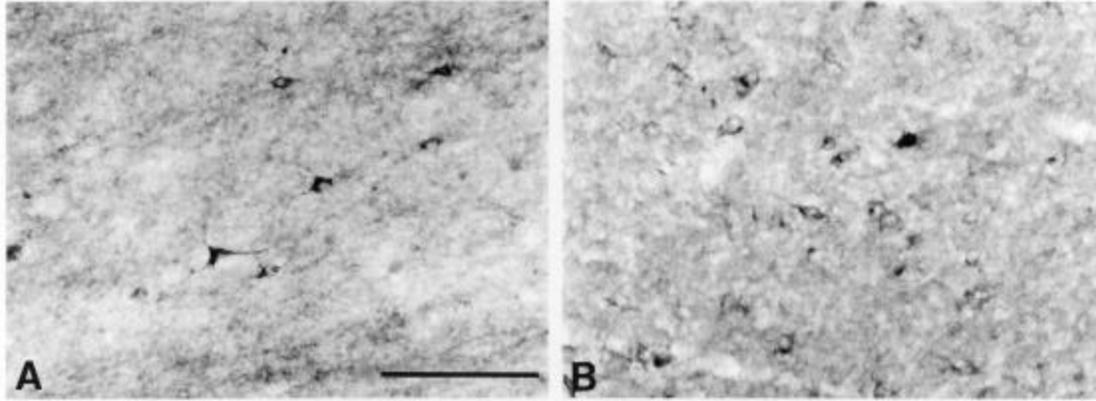


Abb. 4.2.

Cytochrom C-Immunreaktivität im dorsalen (A) und ventralen (B) Teil des Nucleus caudatus eines M. Huntington Stadium 3 Patienten. Übereinstimmend mit der dorso-ventralen Progression des Nervenzellverlustes finden sich im dorsalen Teil weniger Nervenzellen mit intensiverer Immunreaktivität als im ventralen Teil des Striatums. Vergrößerungsbalken in A und B: 200µm.

4.1.1.2. Cytochrom C in transgenem Maushirngewebe

Auch die Immunanfärbung von Cytochrom C in 4, 9, und 13 Wochen alten transgenen Mäusen der Linie R6/2 und negativen Kontrollen aus demselben Wurf ist untersucht worden (Abb. 4.3). In den Hirngewebeschnitten der 4 Wochen alten transgenen R6/2 Mäuse beobachtet man keinen Unterschied in der immunzytochemischen Darstellung von Cytochrom C zu den gleichaltrigen negativen Kontrollen (Abb. 4.3 A). Die Expression von Cytochrom C zeigt sich in beiden Fällen durch den Mitochondrien entsprechenden Foci im Zytoplasma der Nervenzelle. Wie in humanen M. Huntington Striata zeigt sich auch hier ein deutlicher Anstieg der Cytochrom C-Immunintensität in neuronalen Perikarya und innerhalb des Neuropils, desto fortgeschrittener der Grad der Erkrankung ist. In den 9 Wochen alten transgenen R6/2 Mäusen ist die zytosolische Expression von Cytochrom C deutlich intensiver (Abb. 4.3 B) als in den gleichaltrigen negativen Kontrollen desselben Wurfs. Das trifft auf die Expression von Cytochrom C sowohl im Striatum als auch im Kortex zu. Ähnlich dem Erscheinungsbild im Striatum der schweren humanen M. Huntington Fälle findet sich die stärkste Intensität der Cytochrom C-Immunfärbung in den 13 Wochen alten transgenen R6/2 Mäusen, die sich zu diesem Zeitpunkt bereits im Endstadium der Erkrankung befinden (Abb. 4.3 C).

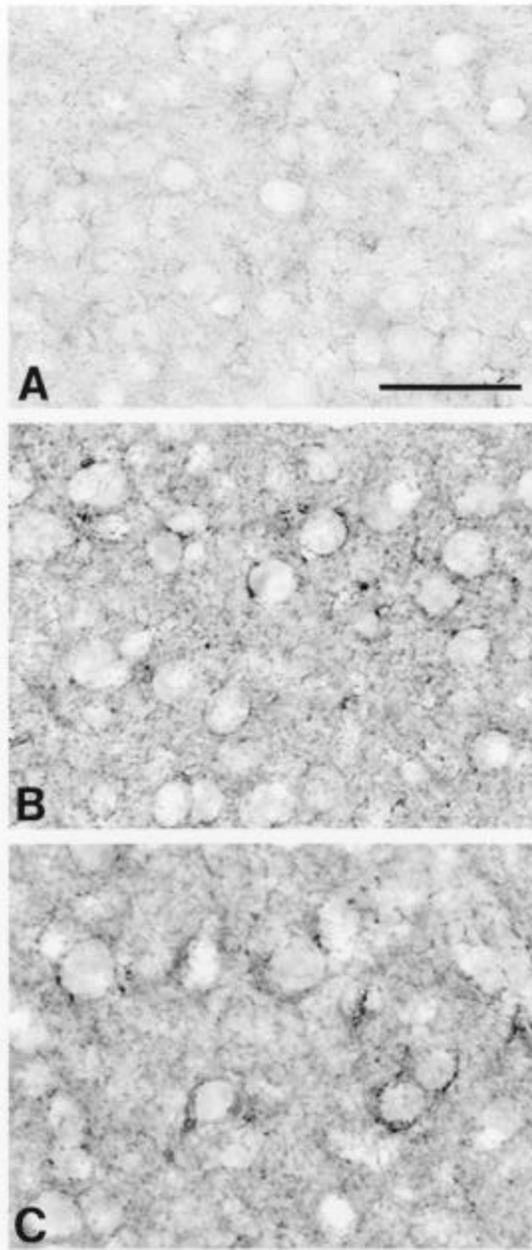


Abb. 4.3.

Cytochrom C-Immunreaktivität im Neostriatum von 4, 9, und 13 Wochen alten R6/2 Mäusen (respektive A, B, und C). Es wird eine zeitliche Zunahme der Cytochrom C-Immunreaktivität nicht nur in der Gewebeprobe an sich, sondern besonders im Zytoplasma der Nervenzellkörper beobachtet. Zu beachten ist zusätzlich eine Zunahme der Nervenzellgröße im Verlauf von 4 bis 13 Wochen. Vergrößerungsbalken in A, B, und C: 30µm.

4.1.2. Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse dient der Bestätigung der Ergebnisse der *In-situ*-Hybridisierung durch den direkten Proteinnachweis der einzelnen Komponenten.

4.1.2.1. Cytochrom C in menschlichem Hirngewebe

Entsprechend den Ergebnissen der *In-situ*-Hybridisierung zeigt sich auch in der Western Blot Analyse eine Verschiebung im Muster der normalen Verteilung von Cytochrom C (Abb. 4.4). In den Homogenisaten des Kontrollgewebes stellt sich Cytochrom C als deutliche 15kD Bande sowohl in der mitochondrialen als auch der zytosolischen Fraktion dar. Dabei ist aber die Darstellung in der zytosolischen Fraktion weniger stark ausgeprägt. Im Vergleich zu diesen normalen Kontrollen zeigt sich eine Verschiebung der Cytochrom C-Expression von der mitochondrialen zur zytosolischen Fraktion in den M. Huntington Gewebeproben. Dieses Phänomen ist in den neuropathologischen Stadien 3 und 4 der M. Huntington Fälle am markantesten. Diese Befunde bestätigen die erhöhte zytoplasmatische Cytochrom C-Intensität in der Immunhistochemie striataler Nervenzellen.

4.1.2.2. Cytochrom C in transgenem Maushirngewebe

Western Blot Analysen der Hirngewebe-Homogenisate der transgenen R6/2 Mäuse mit mitochondrialer und zytosolischer Fraktionierung zeigen, dass es – ähnlich wie bei den M. Huntington Patienten – zu einer Verschiebung der Cytochrom C-Intensität von der mitochondrialen zur zytosolischen Fraktion in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung kommt (Abb. 4.5). Dieses Phänomen lässt sich jedoch noch nicht im Alter von 4 Wochen alten Mäusen beobachten. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich sowohl bei transgenen Mäusen der Linie R6/2 (Abb. 4.5) als auch der gleichaltrigen Kontrollen aus demselben Wurf (keine Abbildung) der größte Anteil des Cytochrom C in der mitochondrialen Fraktion. In den 9 und 13 Wochen alten transgenen Mäusen stellt sich die 15kD Bande des Cytochrom C nun deutlich intensiver in der zytosolischen Fraktion dar, während die Bande der mitochondrialen Fraktion nur noch schwach auftritt (Abb. 4.5).

Diese Verteilung lässt sich nicht bei gleichaltrigen negativen Kontrollen zeigen (keine Abbildung). Diese Resultate spiegeln die in humanem M. Huntington Gewebe aufgezeigten Ergebnisse wider.

Zur Bestätigung, dass keine Kontamination der mitochondrialen Fraktion mit zytoplasmatischen Bestandteilen vorliegt, wurde ein unabhängiger zytoplasmatischer Marker, Laktatdehydrogenase (LDH), verwendet. Die Western Blot Analysen der mitochondrialen und zytosolischen Fraktionen sowohl von M. Huntington Patienten als auch von transgenen Mäusen der Linie R6/2 zeigen keine LDH-Expression in den mitochondrialen Fraktionen (keine Abbildung). Somit lässt sich eine Kontamination der mitochondrialen Fraktion mit zytoplasmatischen Bestandteilen ausschließen.

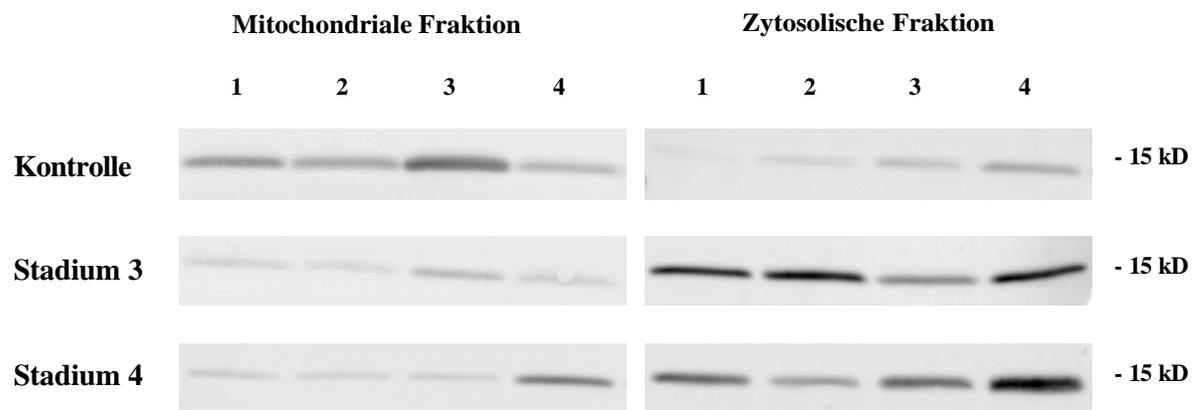


Abb. 4.4.

Cytochrom C Western Blot Analyse (15 kD Banden) der mitochondrialen und der zytosolischen Fraktion aus Nucleus caudatus Gewebekomogenisaten von vier nicht-pathologischen Kontrollen, vier Stadium 3 M. Huntington und vier Stadium 4 M. Huntington Patienten. In den M. Huntington Gewebekomogenisaten zeigt sich eine Verschiebung der normalen mitochondrialen/zytosolischen Verteilung der Cytochrom C-Expression. Sowohl im Stadium 3 als auch im Stadium 4 beobachtet man eine stärkere Cytochrom C-Expression in der zytosolischen Fraktion, während die Cytochrom C-Expression in der mitochondrialen Fraktion abnimmt.

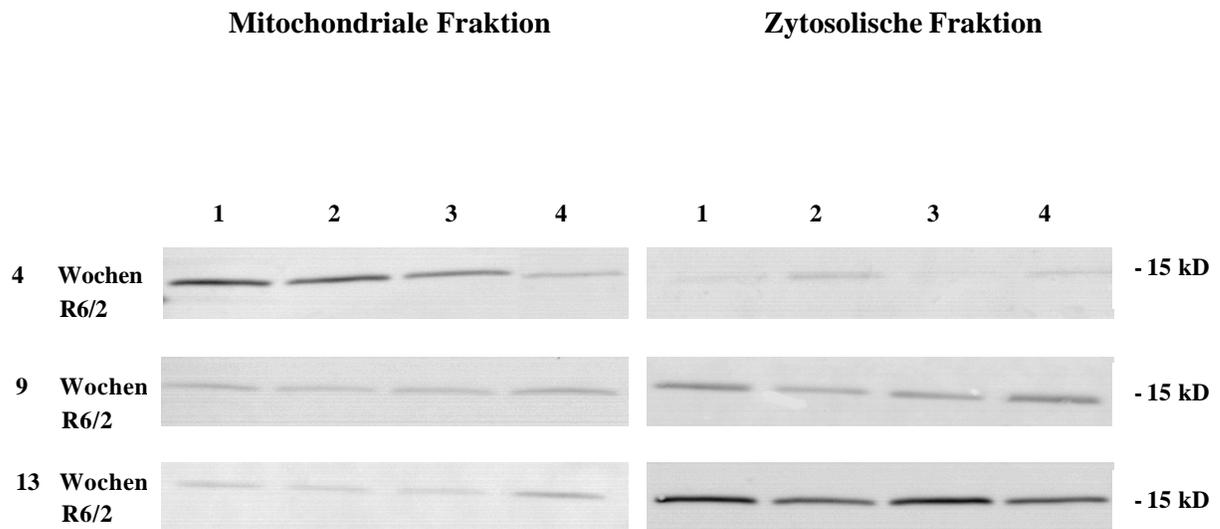


Abb. 4.5.

Cytochrom C Western Blot Analyse der mitochondrialen und zytosolischen Fraktion aus Gewebehomogenisaten des Neostriatum von 4, 9, und 13 Wochen alten transgenen Mäusen der Linie R6/2 (15kD Banden). Bemerkenswert ist mit Fortschreiten der Erkrankung eine Verschiebung der stärkeren mitochondrialen Cytochrom C-Expression zu einer stärkeren zytosolischen Cytochrom C-Expression. Dies lässt sich noch nicht in den 4 Wochen alten R6/2 Mäusen demonstrieren. Mit 9 Wochen beobachtet man bereits eine Verschiebung zugunsten stärkerer zytosolischer Expression. Mit 13 Wochen ist diese Verschiebung von der mitochondrialen zur zytosolischen Fraktion am ausgeprägtesten.

4.2. Caspase-9

Nach Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien kommt es im weiteren Verlauf zur Aktivierung von Caspase-9 im Apoptosom-Komplex. Durch aktivierte Caspase-9 kann es zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3 kommen.

4.2.1. Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden in Gewebeschnitten Proteine bzw. Enzyme mit einem spezifischen Antikörper detektiert und in einem weiteren Schritt mittels eines konjugierten zweiten Antikörpers zur Darstellung gebracht.

4.2.1.1. Caspase-9 in menschlichem Hirngewebe

Während nicht-pathologische neurologische Kontrollschnitte keine Immunreaktivität für Caspase-9 zeigen, findet man eine erhöhte Expression sowohl der Pro-Caspase-9 als auch der aktivierten Caspase-9 im Neuropil des Striatums der Stadium 2 M. Huntington Patienten (keine Abbildung). Eine selektive neuronale immunzytochemische Darstellung von Pro-Caspase-9 und aktivierter Caspase-9 ist allerdings nur in den schweren und sehr schweren neuropathologischen M. Huntington Fällen (Stadium 3 und 4) möglich (Abb. 4.6). Die stärkste Immunintensität aktivierter Caspase-9 findet sich in den sehr schweren Fällen (Stadium 4), dann aber in den meisten überlebenden Nervenzellen im Striatum. Weiterhin ist eine erhöhte Immunreaktivität von Caspase-9 im Neuropil des gesamten Neostriatums vorhanden, was eine erhöhte Aktivität in axonalen Ästen und anderen Elementen des Neuropil nahe legt.

Zusätzliche immunzytochemische Anfärbungen mit Caspase-3 zeigen in nicht-pathologischen neurologischen Kontrollschnitten keine Immunintensität. Während die Immunreaktivität von Caspase-3 in den leichten Fällen (Stadium 2) nicht eindeutig nachzuweisen ist (keine Abbildung), ist in den schweren M. Huntington Fällen (Stadium 4) eine erhöhte Immunreaktivität von Caspase-3 darstellbar (Abb. 4.7).

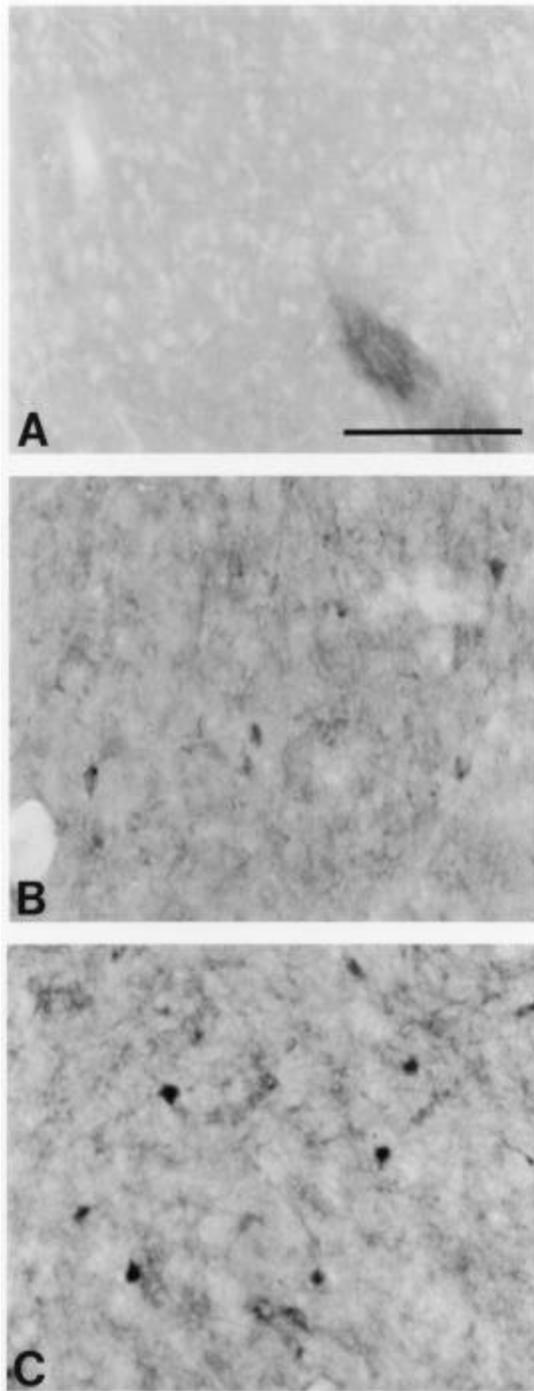


Abb. 4.6.

Aktiviert Caspase-9-Immunreaktivität im Nucleus caudatus einer nicht-pathologischen Kontrolle (A), eines Stadium 3 (B) und eines Stadium 4 (C) M. Huntington Patienten. Die stärkste Intensität der Caspase-9-Immunreaktivität findet man in den schweren, fortgeschrittenen Stadien (Stadium 3 und 4). Eine vorhandene erhöhte Caspase-9-Immunreaktivität im Neuropil legt die Vermutung nahe, dass axonale und andere Elemente des Neuropils eine erhöhte Caspase-9-Immunreaktivität besitzen. Vergrößerungsbalken in A, B und C: 200 μ m.

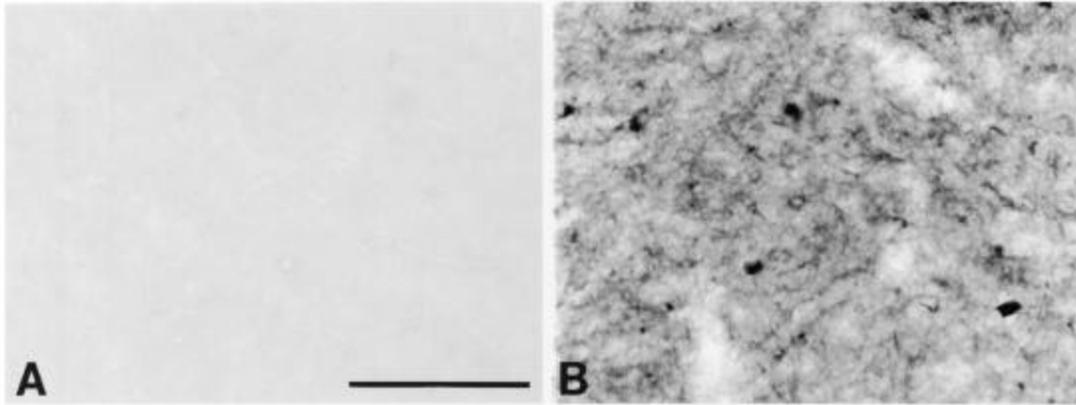


Abb. 4.7.
Caspase-3 Immunreaktivität im Nucleus caudatus einer nicht-pathologischen Kontrolle (A) und eines Stadium 4 M. Huntington Patienten (B). Im Vergleich zur Kontrolle zeigen die Nervenzellkörper des Stadium 4 Gewebeschnitts eine intensive Immunreaktivität für Caspase-3, aber auch andere Gewebeelemente zeigen eine erhöhte Caspase-3 Immunreaktivität. Vergrößerungsbalken in A und B: 200µm.

4.2.1.2. Caspase-9 in transgenem Maushirngewebe

Ähnlich den Ergebnissen in den humanen Gewebeproben ist aktivierte Caspase-9 nur in den Gewebeschnitten der sich im Endstadium befindenden 13 Wochen alten transgenen Mäuse der Linie R6/2 vorhanden (Abb. 4.8). Viele dieser Neuronen sind nur schwach immunpositiv, unterscheiden sich jedoch deutlich von gleichaltrigen negativen Kontrollen des selben Wurfes (Abb. 4.8). In den Gewebeschnitten der 4 und 9 Wochen alten transgenen Mäuse der Linie R6/2 lässt sich im Vergleich zu negativen Kontrollen keine wesentlich veränderte Immunreaktivität von aktivierter Caspase-9 nachweisen (keine Abbildung).

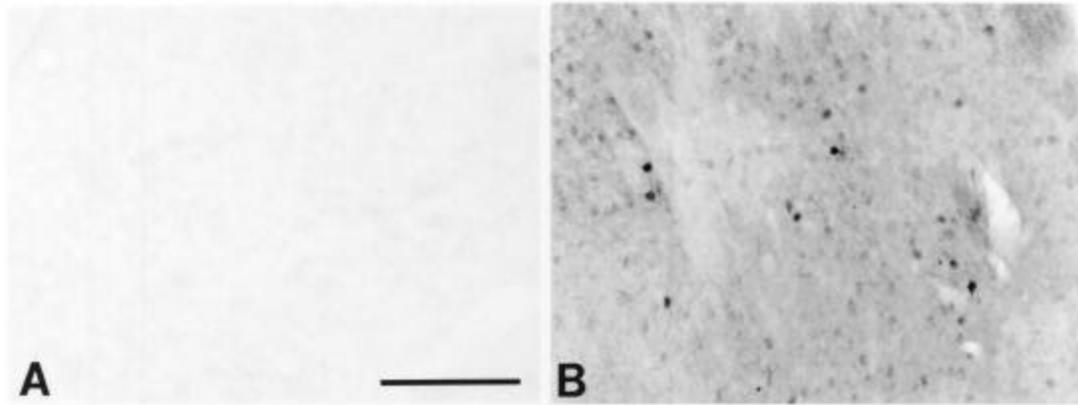


Abb. 4.8.
Aktivierte Caspase-9-Immunreaktivität im Neostriatum einer negativen Kontrolle aus demselben Wurf (A) und einer 13 Wochen alten R6/2 Maus (B). Im fortgeschrittenen Stadium zeigt sich eine erhöhte, wenn auch mitunter nur schwache, Immunreaktivität für aktivierte Caspase-9. Vergrößerungsbalken in A und B: 200 μ m.

4.2.2. Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse dient der Bestätigung der Ergebnisse der *In-situ*-Hybridisierung durch den direkten Proteinnachweis der einzelnen Komponenten.

4.2.2.1. Caspase-9 in menschlichem Hirngewebe

Western Blot Analysen aktivierter Caspase-9 in Gesamtfractionen humanen M. Huntington Gewebes zeigen in den schwereren Fällen (Stadium 3 und 4) die charakteristische 37kD Bande, übereinstimmend mit dem Vorhandensein von aktivierter bzw. gespaltener Caspase-9 (Abb. 4.9 A). Obwohl es eine gewisse Heterogenität in der Intensität und Aktivität dieser Banden gibt, findet sich keine oder nur eine minimale Aktivität in den nicht-pathologischen neurologischen Kontrollen. Diese Beobachtungen reflektieren die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen von Caspase-9 in menschlichem M. Huntington Striatum. Deutliche bzw. starke Expression von aktivierter Caspase-9 tritt erst in den späten Stadien der Erkrankung auf.

4.2.2.2. Caspase-9 in transgenem Maushirngewebe

Auch die Western Blot Analysen aktivierter Caspase-9 in den murinen Gewebehomogenisaten spiegeln ähnliche Verhältnisse wie in den humanen Gewebeproben wider. In den Gesamtfractionen der Homogenisate der 13 Wochen alten transgenen Mäuse der Linie R6/2 finden sich die charakteristischen 37 kD Banden aktivierter Caspase-9, während in den Gesamtfractionen der gleichaltrigen Kontrollen aus demselben Wurf keine Banden auftreten (Abb. 4.9 B). Allerdings lassen sich deutliche Banden aktivierter Caspase-9 nur in der Gruppe der 13 Wochen alten transgenen Mäusen, die sich bereits im Endstadium befinden, aufzeigen. In den Homogenisaten der transgenen Mäuse im Alter von 4 und 9 Wochen lassen sich keine signifikanten Banden darstellen. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus der immunzytochemischen Untersuchung von aktivierter Caspase-9, die ebenfalls nur zu dem späten Zeitpunkt von 13 Wochen deutliche Aktivität von aktivierter Caspase-9 zeigt, nicht jedoch zu den früheren Zeitpunkten von 4 und 9 Wochen.

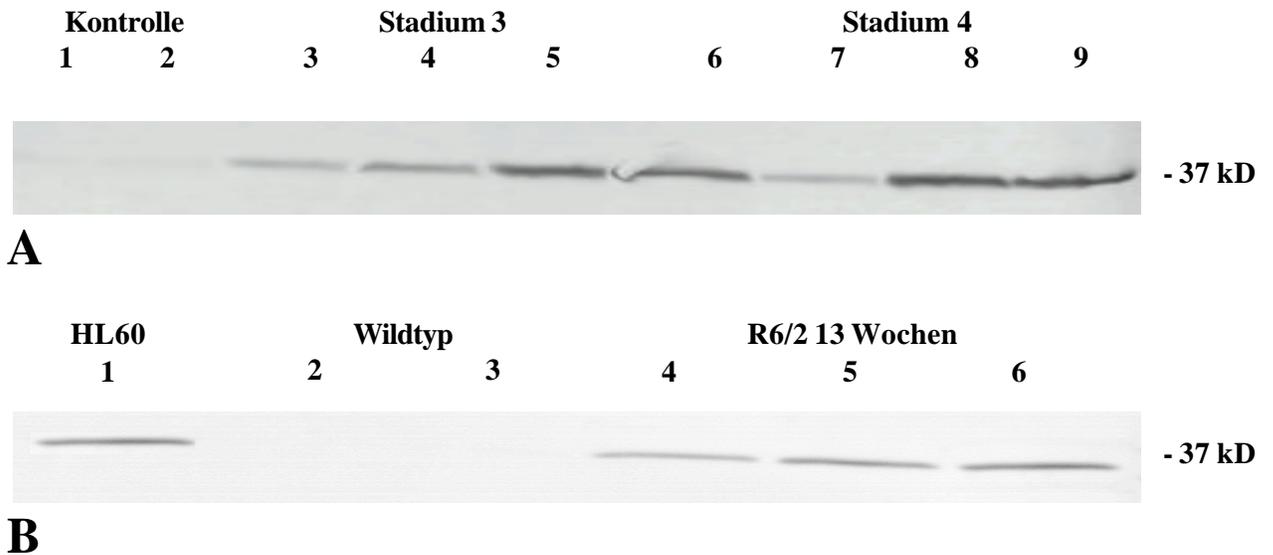


Abb. 4.9.
Aktivierte Caspase-9 Western Blot Analyse (37kD Banden) von humanen Nucleus caudatus Gewebekomogenisaten (A) und neostriatalen Gewebekomogenisaten von R6/2 Mäusen (B).
In der Abb. 4.9 A stellen die Spalten 1 und 2 nicht-pathologische Kontrollen, die Spalten 3-5 Stadium 3 M. Huntington und die Spalten 6-9 Stadium 4 M. Huntington Patienten dar.
Obwohl eine gewisse Heterogenität in der Caspase-9-Aktivität besteht, ist diese jedoch deutlich stärker als in den Kontrollhomogenisaten. In der Abb. 4.9 B stellt die Spalte 1 eine positive Hela-Zell Kontrolle, die Spalten 2 und 3 Neostriatum von Wildtyp Kontrollen aus demselben Wurf und die Spalten 4-6 Neostriatum von 13 Wochen alten R6/2 Mäusen dar.
Man beobachtet keine Caspase-9-Aktivität in den Kontrollhomogenisaten, während in den 13 Wochen alten R6/2 Mäusen die Caspase-9-Aktivität deutlich erhöht ist.

5. Diskussion

5.1. Kritische Beurteilung von Material und Methodik

5.1.1. Gewebeproben

Für die hier durchgeführten Untersuchungen mittels Immunhistochemie und Western Blot Verfahren sind Gewebeproben von sehr guter Qualität unabdingbar. Für die humanen Proben wurde *post-mortem*-Gehirngewebe aus drei verschiedenen neuropathologischen Zentren verwendet. Dabei spielt eine ausreichende Anzahl an Gewebeproben sowie deren Erhaltungsgrad eine große Rolle. Der Erhaltungsgrad der Gewebeprobe ist wesentlich bestimmt von dem Zeitverlust zwischen Tod und Obduktion, der Entnahmemethode und der unverzüglichen sachgerechten Fixierung. Dabei entstehen unvermeidbar Qualitätsverluste unterschiedlichen Ausmaßes durch die Fixierung bzw. Schockfrostung. Gerade beim Protein-Nachweis mittels Western Blot Verfahren kann dies zu späteren Interpretationsschwierigkeiten führen.

Häufig verstreicht zudem ein zu langer Zeitraum bis zur Entnahme des Gehirns, da die Einwilligung durch Angehörige notwendig ist. Diese Entscheidung fällt den Angehörigen mitunter schwer und wird häufig bei Patienten, die ambulant versterben oder nicht direkt an den Folgen des M. Huntington, sondern beispielsweise an Suizid, Unfällen oder Begleiterkrankungen versterben, gänzlich abgelehnt. Dieses Kollektiv beinhaltet aber andererseits häufig Patienten in den frühen pathologischen Stadien, welche für die Aufklärung der Pathomechanismen beim M. Huntington besonders wertvoll wären. Diese Überlegungen zeigen, dass eine umfangreiche Aufklärung der Patienten und Angehörigen mit Erklärung der Notwendigkeit weiterer wissenschaftlicher Forschung bereits früh nötig ist, um in Zukunft gerade auch die Forschung in den frühen pathologischen Stadien ausweiten zu können.

Transgene Mäuse mit erhöhter Anzahl von CAG-repeats sind seit deren Entwicklung zur Basis vieler Studien geworden und stellen ein zuverlässiges Tiermodell dar. Jedoch ergeben sich einige Probleme bei der Interpretation der Ergebnisse. Mäuse sind nun mal nicht Menschen und auch das R6/2 Modell spiegelt nicht die exakt selben Symptome des humanen M. Huntington wider.

Ein weiteres Problem bei der R6/2 Mauslinie ergibt sich aus der Tatsache, dass diese Linie nur das N-terminale Fragment statt des kompletten Huntingtin-Gens exprimiert. Während bei

Menschen die Anzahl der CAG-Wiederholungen häufig zwischen 40 und 50 liegt, liegt diese bei Mäusen der Linie R6/2 mit 145 Wiederholungen deutlich höher. Dies ist wiederum nötig, damit die Tiere in ihrer begrenzten Lebensspanne überhaupt Symptome ausbilden und an den Folgen der Erkrankung versterben. Bei den murinen Gewebeproben entfällt das Problem des Zeitverlustes zwischen Tod und Entnahme, der mögliche Qualitätsverlust durch Fixierung oder Schockfrostung bleibt jedoch bestehen.

5.1.2. Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten Antikörper wurden kommerziell erworben und sind somit vielen Forschungsgruppen zugänglich. Trotzdem bestehen bei Antikörpern verschiedener Hersteller Unterschiede bezüglich Sensitivität und Spezifität. Bemerkenswert war beispielsweise ein deutlicher Unterschied des Cytochrom C-Antikörpers in Abhängigkeit des verwendeten Gewebes. Während die humanen Gewebeproben in der Immunhistochemie sehr gute Ergebnisse mit dem Antikörper der Firma PharMingen erbrachten, wurde bei den transgenen murinen Gewebeproben der Antikörper der Firma Zymed aufgrund besserer erzielter Ergebnisse vorgezogen. Dabei wurden jedoch beide Antikörper in gleichen Verdünnungen eingesetzt.

Auch bei dem Nachweis von Caspase-9 fanden Antikörper zweier Firmen Verwendung, da der Caspase-9-Antikörper von PharMingen sowohl Caspase-9 in der Pro-Form als auch in der aktivierten Form erkennt. Um auszuschließen, dass eventuell nur Caspase-9 in der Pro-Form nachgewiesen wird, kam der Antikörper gegen aktivierte Caspase-9 von Cell Signaling Technology zum Einsatz. Dieser Antikörper erkennt nur Caspase-9-Moleküle, wenn sie an dem Rest Asp330 gespalten sind, und schließt eine Kreuzreaktivität mit der Pro-Form der Caspase-9 aus. Dabei musste dieser Antikörper allerdings in einer höheren Konzentration verwendet werden.

5.1.3. Labortechniken

Sowohl bei den immunhistochemischen Untersuchungen als auch den Western Blot Verfahren wurde nach gängigen Laborprotokollen vorgegangen. Trotzdem gibt es hinsichtlich Fixierungstechniken, Puffersystemen, physikalischen Parametern und Zeitangaben erhebliche Unterschiede. Eine weitgehendste Standardisierung aller Protokolle würde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Forschergruppen erhöhen. Gerade auch bei Western Blot Verfahren wurde hier versucht, einen möglichst hohen Standard durch Verwendung industriell hergestellter Laflösungen und Gelplatten zu erreichen. Trotzdem könnte die Extraktions-Puffer-Lösung die Stabilität der Proteine negativ beeinflussen und somit Auswirkungen auf die Migration der Proteine im Gel haben.

Da für die Auftrennung zytosolischer und mitochondrialer Fraktionen keine weit verbreiteten Protokolle existieren, fand LDH (Laktatdehydrogenase) als unabhängiger zytosolischer Marker Verwendung, um etwaige Kontaminationen der mitochondrialen Fraktion durch zytosolische Bestandteile ausschließen zu können.

5.2. Interpretation der Ergebnisse

5.2.1. Aktivierung des Apoptosom-Komplexes bei M. Huntington Patienten und transgenen Mäusen

Apoptotischer Zelltod wird als ein wichtiger Mechanismus des Nervenzelltodes bei M. Huntington und anderen neurodegenerativen Erkrankungen vermutet. Diese Möglichkeit erhärtet sich durch das Fehlen einer inflammatorischen Begleitreaktion in der Umgebung von absterbenden Neuronen. Der intrinsische Weg der Apoptose wird über eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol eingeleitet, wo dann die Bildung eines Apoptosom-Komplexes durch Cytochrom C, dATP, APAF1 und Pro-Caspase-9 zustande kommt. Dies führt wiederum zur Aktivierung von Caspase-9 und weiteren, darunter agierenden Effektor-Caspasen, wie Caspase-3. Nach der Aktivierung von Caspase-3 wird die Zelle unter Kondensation des im Nucleus liegenden Chromatins, Schrumpfung der im Zytoplasma liegenden Zellorganelle und schließlich Fragmentation der Zellbestandteile aufgelöst.

Die hier vorliegende Untersuchung zeigt, dass Komponenten des intrinsischen mitochondrialen Wegs, die zur Bildung des Apoptosom-Komplexes notwendig sind, aktiviert werden. Dies geschieht unter Umverteilung des Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol, folgender Aktivierung der Initiator-Caspase-9 und nachfolgender Aktivierung der Effektor-Caspase-3. Dieser Vorgang findet sich immunzytochemisch sowohl in humanem M. Huntington-Striatum als auch bei transgenen Mäusen der Linie R6/2, die Exon 1 des Huntingtin-Gen mit der verlängerten (CAG)_n-Sequenz im Genom tragen. Die immunzytochemischen Ergebnisse lassen sich durch entsprechende Protein-Nachweise mittels Western Blot Verfahren bestätigen. Während jedoch bereits in frühen Stadien der Nachweis der Cytochrom C-Umverteilung gelingt, können aktivierte Caspase-9 und Caspase-3 erst in den späten neuropathologischen Stadien nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der intrinsische Weg der Apoptose unter Umständen erst in späten Stadien der Erkrankung eine tragende Rolle spielt, während für die frühen Stadien zusätzliche Mechanismen angenommen werden müssen.

5.2.1.1. Umverteilung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol

Sowohl die immunzytochemischen Ergebnisse als auch der Proteinnachweis mittels Western Blot Verfahren zeigen beim M. Huntington Patienten einen progressiven Verlauf. Dabei kommt es zu einer Zunahme von Cytochrom C in der zytosolischen Fraktion in Abhängigkeit vom neuropathologischen Stadium nach Vonsattel (Vonsattel et al., 1985). Bereits in den frühen Stadien (Stadium 1), in denen bereits 50% der Nervenzellen des Striatums abgestorben sind, ist eine signifikante Immunintensität im Zytosol vorhanden. Diese nimmt in den folgenden Stadien zu und findet ihren Höhepunkt im Stadium 4, in dem der Neuronenverlust bis zu 95% beträgt. Diese graduelle Zunahme der Umverteilung von Cytochrom C aus der mitochondrialen in die zytosolische Fraktion wird durch die Western Blot Ergebnisse bestätigt.

Dabei lässt sich feststellen, dass in den frühen Stadien höchstens 30%, und in den späten Stadien höchstens 60% aller Nervenzellen immunreaktiv auf Cytochrom C im Zytosol sind. Dies lässt sich dadurch erklären, dass immunzytochemische Färbetechniken nur eine Momentaufnahme des Zustandes im Striatum darstellen und demnach nicht alle Nervenzellen synchron im Absterben begriffen sind. Diese Heterogenität zeigt sich auch in der Streubreite des Anfärbeverhaltens von moderater bis sehr starker Anfärbung selbst in den Stadien 3 und 4. Diese

Tatsachen könnten den unterschiedlichen zeitlichen Verlauf der im Absterben begriffenen Nervenzellpopulation im Striatum widerspiegeln.

Auch die beschriebene topographische Verteilung mit der bekannten dorso-ventralen Progression des Nervenzellverlustes im Verlauf der Erkrankung wird hier bestätigt. Im neuropathologisch späten Stadium 3 finden sich im dorsalen Anteil des Nucleus caudatus im Vergleich zum ventralen Anteil weniger immunzytochemisch gefärbte Neuronen. Dies könnte die Tatsache belegen, dass ventral noch mehr lebende Neuronen vorhanden sind, die den Weg in den apoptotischen Zelltod einschlagen können. Auf der anderen Seite demonstrieren die Nervenzellen im dorsalen Anteil des Nucleus caudatus ihre erhöhte Vulnerabilität durch ein verstärktes Anfärbeverhalten (s. Abb. 4.2.).

Neben dem Zytoplasma des Zellkörpers sind auch die dendritischen Äste besonders stark angefärbt. Im Neuropil der Nervenzellen ist nicht nur eine große Anzahl von Mitochondrien lokalisiert, sondern es wurde auch über eine höhere Anzahl von Huntingtin-Aggregaten im Neuropil als im Nucleus berichtet (Gutekunst et al., 1999). So ist Huntingtin nicht nur als Substrat der Caspase-3 bekannt (Goldberg et al., 1996), sondern kann auch apoptotische Kaskaden auslösen (Miyashita et al., 1999). Dies könnte die vermehrte Lokalisation von Cytochrom C im Neuropil der Nervenzellen erklären.

Im Striatum der transgenen Mäuse der Linie R6/2 zeigen sowohl immunzytochemische Färbungen als auch der Proteinnachweis für Cytochrom C im Western Blot Verfahren erst eine Umverteilung des Cytochrom C von der mitochondrialen in die zytosolische Fraktion in den 9 und 13 Wochen alten Mäusen. Weder in der *In-situ* Hybridisierung noch im Western Blot Verfahren zeigen sich Unterschiede zwischen den 4 Wochen alten transgenen Mäusen und den gleichaltrigen Kontrollen. In beiden Fällen ist Cytochrom C noch überwiegend in den Mitochondrien lokalisiert. Allerdings zeigen die transgenen Mäuse zu dem Zeitpunkt von 4 Wochen auch noch keine klinischen Symptome. Diese treten erst ab ungefähr 8 Wochen auf und nehmen dann bis zur 12. Woche kontinuierlich zu. Obwohl also mit 4 Wochen noch klinische Symptome fehlen, lässt sich doch bereits eine Abnahme der Gehirngröße der transgenen Mäuse feststellen (Bates und Davies, 1997).

Im Alter von 9 Wochen, also nach Beginn der Erkrankung, stellen sich sowohl somales Zytoplasma als auch Neuropil deutlich immunpositiv für Cytochrom C dar und erreicht den Höhepunkt im Alter von 13 Wochen. Die Western Blot Ergebnisse bestätigen die progressions-abhängige Umverteilung des Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol.

5.2.1.2. Aktivierte Caspase-9 verstärkt nachweisbar in schweren pathologischen Stadien

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass sowohl im humanen als auch im murinen transgenen Gewebe der Nachweis der aktivierten Caspase-9 erst in späten Stadien (Stadium 3 und 4 bei M. Huntington Patienten bzw. 13 Wochen bei den transgenen Mäusen der Linie R6/2) möglich ist. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass der intrinsische Weg der Apoptose mit Caspase-Aktivierung erst in späten Erkrankungsstadien, lange nach Manifestation klinischer Symptome, an Bedeutung gewinnt.

In humanem Striatumgewebe lässt sich bereits eine Anfärbung des Neuropils von Pro-Caspase-9 und aktivierter Caspase-9 im Stadium 2 erreichen. Dies legt die Vermutung nahe, dass in den Nervenzellfortsätzen bereits früher apoptotische Vorgänge stattfinden als im Zytoplasma des Nervenzellkörpers. In den Nervenzellfortsätzen könnten für die Zelle lebenswichtige Entscheidungen über Zelluntergang oder Überleben getroffen werden. Apoptotische Kaskaden können dort lokal aktiviert werden. Es wird angenommen, dass diese Kaskade mit niedriger Aktivität als adaptive Anpassung auf Stressoren fungiert, während hohe Aktivitätsniveaus mit synaptischer Degeneration und Zelltod einher gehen (Mattson und Duan, 1999). Zur Untermauerung dieser Annahme ließ sich *in vitro* zeigen, dass eine Hemmung von Caspasen die Degeneration der Nervenzellfortsätze verhindert (Gylys et al., 2002). Eine selektive immunzytochemische Darstellung von Pro-Caspase-9 und vor allem aktivierter Caspase-9 gelingt allerdings erst in den späten neuropathologischen Stadien (Stadium 3 und 4). Dann findet sich aber im Stadium 4 in den meisten noch überlebenden Nervenzellen Immunreaktivität, was ein Zeichen dafür sein kann, dass die verbleibenden Zellen bereits den Weg in den apoptotischen Zelltod eingeschlagen haben. Diese erst spät einsetzende Anfärbbarkeit von aktivierter Caspase-9 bestätigt sich in den 37kD Banden des aktivierten Enzyms im Western Blot. Es zeigen sich deutliche Banden, die etwas heterogen erscheinen, sich aber eindeutig von den Kontrollen unterscheiden.

Auch in den Maus-Striata ist die aktivierte Caspase-9 erst im finalen Stadium mit 13 Wochen nachweisbar. Weder 4 Wochen alte transgene Mäuse, noch die 9 Wochen alten transgenen Mäuse mit Manifestation des charakteristischen Phänotyps zeigen eine Immunreaktivität für aktivierte Caspase-9. Diese in den 13 Wochen alten transgenen Mäusen bestehende Immunreaktivität äußert sich zum Teil auch nur durch schwache Anfärbung, während sich in den Western Blot Nachweisen dieses Alters deutliche Banden zeigen.

5.2.1.3. Caspase-3 Aktivierung nur in sehr schweren pathologischen Stadien nachweisbar

Noch drastischer verhält es sich mit der Immunreaktivität der Caspase-3. Diese ist im menschlichen Striatum bis zu Beginn des Endstadium nicht nachweisbar. Erst im Stadium 4, wenn bereits bis zu 95% aller Nervenzellen zugrunde gegangen sind, lassen sich immunpositive Neuronen darstellen.

5.2.1.4. Diskrepanz des zeitlichen Auftretens der Cytochrom C-, Caspase-9- und Caspase-3-Immunreaktivität

Wie oben bereits ersichtlich wird, zeigt sich eine deutliche zeitliche Diskrepanz im Auftreten der einzelnen Bestandteile des Apoptosom-Komplexes.

Die relativ frühe markante Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien mit fehlendem Nachweis der Initiator- und Effektor-Caspasen könnte eine Reihe von Gründen haben.

Martinou et al. zeigten, dass in Neuronen, denen NGF („nerve growth factor“) entzogen wird, eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien erfolgt. Allerdings sterben diese Nervenzellen nicht ab, wenn NGF wieder zugefügt wird. Das Cytochrom C wird dabei in den Mitochondrien durch *de-novo*-Synthese ersetzt (Martinou et al, 1999). Das bedeutet, dass eine Zelle nach Freisetzung von Cytochrom C nicht zwingend dem Zelltod geweiht ist, wenn der apoptotische Stimulus nur vorübergehend auf sie einwirkt.

Die starke Cytochrom C-Darstellung könnte auch durch den „Cytochrome C amplification loop“ zustande kommen. Dabei kommt es nach früher Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien zur Aktivierung nachfolgender Caspasen, die wiederum imstande sind, die „permeability transition pore“ (PTP) zu öffnen, was zu einer erneuten Cytochrom C-Freisetzung führt (Chen et al., 2000b). Diese positive Verstärkung könnte die deutlichere Anfärbung der Nervenzellen für Cytochrom C erklären.

Sind in der Nervenzelle ausreichend hohe Mengen an endogenen Caspase-Inhibitoren vorrätig, kommt es nicht notwendigerweise zum apoptotischen Zelltod, sondern über eine Dysfunktion der Elektronentransportkette zu einem langsameren nekrotischen Zelltod (Green und Reed, 1998).

Auch die Expression der Cytochrom C-Niveaus kann durch von außen einwirkende Faktoren beeinflusst werden. Ein Mangel an Stickstoff beispielsweise führt zu einer deutlich erhöhten Expression von Cytochrom C (Rey und Maier, 1997).

Auf der anderen Seite könnten die Mengen an Caspase-3 in der Zelle unter dem Schwellenwert liegen, der für die Detektion mittels Antikörpern nötig ist. Diese Mengen könnten aber ausreichen, um die apoptotische Kaskade zu vollenden. Außerdem wird Caspase-3 nach Ablauf der Kaskade sehr schnell aus der Umgebung entfernt (Krajewska et al., 1997). Caspase-3 stellt zudem einen der letzten Schritte vor dem Zusammenbruch einer Zelle dar, und die Halbwertszeit einer solchen Zelle ist extrem kurz (Wyllie et al., 1980). Auch können zu Beginn in den frühen Stadien noch eine ausreichende Anzahl von Caspase-Inhibitoren in den Zellen vorrätig sein (Cohen 1997), die die Apoptose und Auflösung der Zelle verhindern. In der transgenen Mauslinie R6/2 kommt es im Vergleich zu Kontrollen erst im Alter von 9 Wochen zu einer nennenswerten Anhebung der Caspase-3 mRNA, und diese erreicht erst mit 12 Wochen, also im Finalstadium, mit einer ca. 5fach erhöhten Menge an mRNA-Kopien ihren Höhepunkt (Chen et al., 2000a). Dies zeigt deutlich die erst spät einsetzende Hochregulierung dieser Effektor-Caspase. Es könnte durchaus möglich sein, dass ähnliche Bedingungen für Caspase-9 gelten.

5.3. Zusammenfassung und Einordnung in die vorhandene Literatur

5.3.1. Intrinsischer Weg der Apoptose womöglich erst in späten pathologischen Stadien bedeutend

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die Schlüsselkomponenten des intrinsischen Wegs der Apoptose aktiviert werden. Doch zeigt sich eine deutliche Diskrepanz zwischen dem Auftreten der einzelnen Komponenten und des schon stattgehabten Nervenzellverlustes. Eine sehr deutliche Umverteilung des Cytochrom C ins Zytosol sowie die Darstellung von aktivierter Caspase-9 und Caspase-3 kann erst in den späten neuropathologischen Stadien (Stadium 3 und 4) beobachtet werden. Doch bereits im Stadium 1 sind 50% der Nervenzellen abgestorben, und im Stadium 4 können nur noch 5% der ursprünglichen Nervenzellpopulation übrig bleiben (Vonsattel et al., 1985). So drängt sich der Verdacht auf, dass der intrinsische Weg der Apoptose womöglich erst in späten pathologischen Stadien eine größere Rolle spielt,

während andere Pathomechanismen den selektiven Nervenzelltod in frühen pathologischen Stadien verursachen müssen.

Es wird zudem diskutiert, ob Apoptose überhaupt ein primäres Ereignis im selektiven Nervenzelltod beim M. Huntington darstellt. So können eine Anzahl von TUNEL-positiven Nervenzellen mit DNS-Fragmentierung im Striatum demonstriert werden (Dragunow et al., 1995; Portera-Cailliau et al., 1995). Andererseits wird argumentiert, dass dies allein nicht den apoptotischen Zelltod beweist, da nicht alle morphologischen Kriterien erfüllt werden. Neben der Kondensation des Kerns und Zytoplasmas wirft die Plasmamembran Blasen, doch zeigt sich nicht die Bildung der charakteristischen apoptotischen Körperchen (Turmaine et al., 2000). Turmaine vermutet daher weder den Programmierten Zelltod noch Nekrose hinter dem selektiven Absterben der Neuronen.

5.3.2. Rolle des expandierten Polyglutamintrakts des mutierten Huntingtin

Mutierte Huntingtin, das Genprodukt bei M. Huntington, wird sowohl in apoptotischen Extrakten als auch spezifisch durch die Effektor-Caspase-3 gespalten. Das Ausmaß der Spaltung nimmt dabei mit der Länge des Polyglutamintrakts zu (Goldberg et al., 1996). Auch in Lymphoblasten von M. Huntington Patienten kann durch Staurosporin eine Stress-induzierte Apoptose mit Aktivierung von Caspase-3 provoziert werden. Hier zeigt sich eine von der Länge des Polyglutamintrakts abhängige Depolarisation der Mitochondrien (Sawa et al., 1999). Somit moduliert die Länge des Polyglutamintrakts nicht nur die Spaltungsrate durch Caspase-3, sondern auch den Grad der mitochondrialen Depolarisation. Diese Ereignisse könnten im Weiteren eine Nervenzelle anfälliger für die Auslösung apoptotischer Kaskaden machen.

Proteine mit expandiertem Polyglutamintrakt können aber auch selbst Caspasen aktivieren. Sowohl Initiator-Caspasen, wie Caspase-8 und Caspase-9, als auch die Effektor-Caspase-3 können durch die Proteine mit verlängertem Polyglutamintrakt aktiviert werden (Miyashita et al., 1999).

Dabei werden zunächst Huntingtin-Moleküle durch Caspase-3 in kleinere toxische Fragmente gespalten, die dann in den Zellkern transportiert werden. Später aktivieren dann diese akkumulierten toxischen Polyglutamin-Fragmente Caspasen und induzieren somit den apoptotischen Zelltod. Dieser als „Toxic -Fragment-Hypothese“ bezeichnete, für die Nervenzelle letal endende Teufelskreis, demonstriert die fatalen Auswirkungen des expandierten

Polyglutamintrakts bei M. Huntington Patienten (Miyashita et al., 1999; Wellington und Hayden, 2000a). Der frühe Schritt mit der Spaltung des mutierten Huntingtin durch Caspasen findet jedoch zu einem Zeitpunkt vor deutlicher Neurodegeneration in den frühen neuropathologischen Stadien statt. Diese Erkenntnis führt zu der Überlegung, dass die Spaltung von Huntingtin durch Caspasen bis zu einem gewissen Grad auch bei Gesunden stattfindet. Erst durch die Freisetzung der Fragmente mit dem verlängerten Polyglutamintrakt könnte es zu direkt toxischen Auswirkungen auf die Zelle kommen (Wellington et al., 2002).

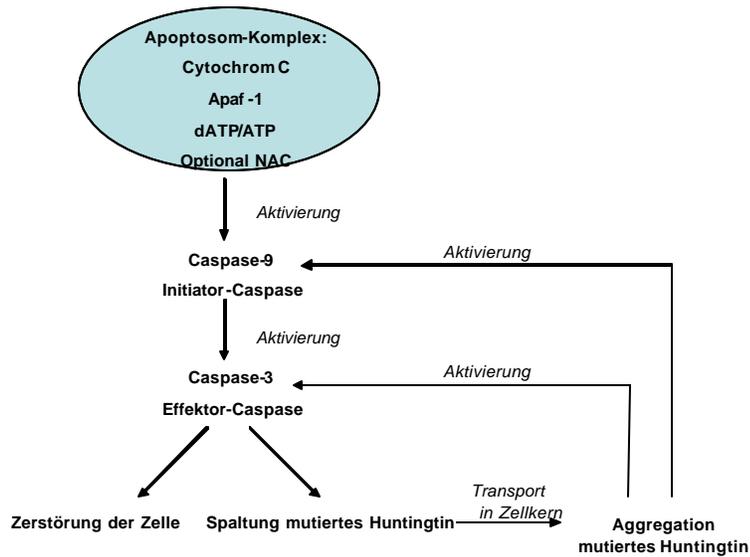
Außerdem konnte in Zellkulturen gezeigt werden, dass durch die intranukleäre Aggregation von Huntingtin die Expression der Caspase-1 gesteigert wird, die daraufhin auch Caspase-3 aktivieren und die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bedingen könnte (Li et al., 2000). Durch eine Hemmung der Caspase-1 im transgenen Mausmodell ist es möglich, den Beginn der charakteristischen Symptome hinauszuzögern und auch eine Verlängerung des Überlebens zu erreichen (Ona et al., 1999). Durch Hemmung von Caspasen kann die Toxizität des mutierten Huntingtin mit expandiertem Polyglutamintrakt unter Apoptose-induzierten Bedingungen deutlich herabgesetzt werden. Dies führt zu einer wesentlich geringeren Frequenz der Huntingtin-Aggregatbildung (Wellington et al., 2000b).

Andererseits konnten andere Autoren zeigen, dass Zellen mit Expression des expandierten Polyglutamintrakts zwar eine erhöhte Aktivität von Caspase-3 aufwiesen, dies aber nicht mit dem Vorhandensein von Aggregaten in der Zelle korrelierte (Chun et al., 2002).

Interessanterweise wirkt Huntingtin mit einem normal langen Polyglutamintrakt („Wildtyp“-Huntingtin) protektiv auf die Zelle. Es schützt diese vor verschiedenen Apoptose-Stimuli wie Wachstumsfaktorenentzug, „death-receptors“ und dem pro-apoptotischen Bcl2. Dies geschieht vor der Aktivierung von Caspase-3, vermutlich zum Zeitpunkt der Caspase-9-Aktivierung in der Kaskade (Rigamonti et al., 2000). „Wildtyp“-Huntingtin kann somit als anti-apoptotisches Protein bezeichnet werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine enge Interaktion zwischen verlängertem Polyglutamintrakt im Huntingtin und Caspasen zu verschiedenen Zeitpunkten stattfindet, auch wenn der endgültige Pathomechanismus noch nicht aufgeklärt wurde.

Die intrinsische Apoptose-Kaskade bei M. Huntington



5.3.3. Mögliche Apoptose -modulierende Faktoren

Die Cytochrom C-Freisetzung ins Zytosol kennzeichnet eine schwere metabolische Störung der Zelle und kann den Beginn der apoptotischen Kaskade darstellen. Eine Reihe von Faktoren bzw. Mechanismen können diese Kaskade sowohl pro-apoptotisch, als auch anti-apoptotisch modulieren.

Neben Cytochrom C wurde ein zweites mitochondriales Protein identifiziert, Smac, das während der Apoptose ins Zytosol freigesetzt wird. Smac wirkt pro-apoptotisch durch Bindung an IAP's („inhibitor of apoptosis proteins“). Dabei wird die den Programmierten Zelltod hemmende Aktivität dieser Proteine entfernt und folgend Caspasen aktiviert. Eine Überexpression von Smac sensibilisiert Zellen gegenüber verschiedenen apoptotischen Triggern (Du et al., 2000).

Daneben spielt ein Protein namens NAC („NB-domain and CARD“) eine Rolle in der Feinregulierung der Apaf1-Funktion. Die Apoptose-verstärkende Wirkung von NAC wird durch eine Bindung an Apaf1 mit Bildung eines Megakomplexes hervorgerufen. Dieser Komplex, der Teil des Apoptosom-Komplexes sein kann, zieht eine gesteigerte proteolytische Spaltung von Pro-Caspase-9 nach sich (Chu et al., 2001).

Ein weiteres identifiziertes pro-apoptisches Protein ist HIP-1 („huntingtin interacting protein 1“), das eine wichtige Rolle im Rahmen des intrinsischen Wegs der Apoptose spielen könnte. Überexpression von HIP-1 führt zu einem schnellen, Caspase-8 unabhängigen, apoptotischen Zelltod über die Aktivierung von Caspase-3 (Hackam et al., 2000). Dabei nimmt die Interaktion zwischen Huntingtin und HIP-1 mit Zunahme der Länge des Polyglutamintraktes ab (Hickey und Chesselet, 2003). Dies legt die Vermutung nahe, dass das Vorhandensein von Huntingtin mit verlängerten Polyglutaminsequenzen zu einer Erhöhung des freien intrazellulären HIP-1 führen könnte. HIP-1 könnte so seine pro-apoptische Wirkung verstärkt entfalten.

Dagegen stellt BAR ein anti-apoptisches Protein dar. Es ist in der intrazellulären Membran verankert und besitzt zwei Domänen, über die es seine Wirkung ausüben kann. Eine der Domänen agiert mit Proteinen der Bcl-2-Familie. Die Bcl-2-Familie moduliert Vorgänge, die zum Tod einer Zelle führen und untergliedert sich in zwei Gruppen. Die eine Gruppe wirkt hemmend auf zum Zelltod führende Vorgänge und besteht aus Proteinen wie Bcl2, Bcl-XL und einigen weiteren. Die andere Gruppe agiert entgegengesetzt und fördert apoptotische Vorgänge und beinhaltet unter anderem Bax, Bad, Bik. BAR ist in der Lage, Bax-induzierten Zelltod zu unterdrücken. Auf diese Weise kann der intrinsische Weg des programmierten Zelltods gehemmt werden. Zudem kann über die andere Domäne aber auch der extrinsische Weg über eine Hemmung der Fas-induzierten Signale unterdrückt werden. BAR kontrolliert somit beide Wege des apoptotischen Zelltods an der Kreuzungsstelle zwischen den Proteinen der Bcl-2-Familie und Caspasen (Zhang et al., 2000).

Aber auch die Pro-Form der Caspase-3 besitzt einen eigenen Schutzmechanismus, eine Sicherheitsschleife. Diese bewahrt die Pro-Caspase-3-Moleküle vor Autoproteolyse sowie vor einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber Caspase-9. Erst durch Erniedrigung des pH-Werts in der Zelle, wie es zu Beginn der Apoptose geschieht, wird diese Sicherheitsschleife entfernt und ebnet den Weg zu den finalen Schritten des Zelltods (Roy et al., 2001).

5.3.4. Weitere pathologische Mechanismen, die zum Zelltod führen können

5.3.4.1. Mechanismen, denen eine späte Rolle in der Neurodegeneration zugeordnet wird

Zwei Wege der Apoptose führen zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3. Neben dem hier untersuchten intrinsischen Weg mit Ausbildung eines Apoptosom-Komplexes kann Caspase-3 auch über den extrinsischen Weg aktiviert werden. Der extrinsische Weg wird über „death receptors“ vermittelt. Er zieht die Bildung eines zytosolischen Zelltod-induzierenden Signal-komplexes, der Pro-Caspase-8 enthält, nach sich. Dabei wird Caspase-8, ebenfalls eine Initiator-Caspase, aktiviert und kann darauf folgend Caspase-3 aktivieren. Pro-Caspase-8 ist in Mitochondrien lokalisiert und kann durch mutiertes Huntingtin mit dem expandierten Polyglutamintrakt aktiviert werden (Qin et al., 2001). In Rattennervenzellkulturen verhindert eine Hemmung von Caspase-8 den durch expandierte Polyglutamintrakte verursachten Zelltod (Sanchez et al., 1999). Diese Erkenntnisse schließen eine Rolle des extrinsischen Wegs des Programmierten Zelltod über Caspase-8 in neurodegenerativen Erkrankungen mit verlängertem Polyglutamintrakt nicht aus.

Neben den apoptotischen Mechanismen werden als weitere pathogenetische Mechanismen ein gestörter mitochondrialer Energiemetabolismus, Exzitotoxizität und oxidativer Stress diskutiert:

In den Nervenzellen des Ncl. caudatus von M. Huntington Patienten wurde eine verminderte Aktivität der Komplexe II, III und in geringerem Maße auch des Komplexes IV der Elektronentransportkette der Mitochondrien festgestellt (Gu et al., 1996). Energieverlust führt zu einer Depolarisation der Mitochondrien und zu einem Einstrom von Kalziumionen. Das führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Glutamatexzitotoxizität und oxidativem Stress. (Petersen et al., 1999).

Exzitotoxizität wird als ein Modell des Nervenzellverlustes beim M. Huntington diskutiert. Man erkannte bereits vor über 30 Jahren, dass exzitatorische Aminosäuren einen neurotoxischen Effekt haben können. Im Speziellen spielt beim M. Huntington Glutamat über eine Aktivierung des NMDA-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung (Petersen et al., 1999). Wird dabei der NMDA-Rezeptor über einen milden Insult aktiviert, reagiert die Zelle mit apoptotischem Zelltod. Fällt der Grad der Exzitotoxizität dagegen

schwer aus, geht die Zelle nekrotisch zugrunde (Tenneti und Lipton, 2000). Bei einem milden Insult kann es über zwei Mechanismen zum apoptotischen Zelltod kommen. Entweder kommt es zum Durchlaufen des intrinsischen Wegs mit Aktivierung von Caspase-3 oder aber verzögert zum Durchlaufen eines Caspase-unabhängigen Wegs über AIF („Apoptosis-inducing factor“). AIF wird dabei von Mitochondrien freigesetzt, jedoch durch eine unterschiedliche Art und Weise wie Cytochrom C (Cregan et al., 2002). Der neurotoxische Effekt von Glutamat und anderen exzitatorischen Aminosäuren kann je nach Schweregrad durch unterschiedliche Mechanismen zum Zelltod führen. Der programmierte Zelltod könnte bei lang einwirkender, niedriger Glutamatexzitotoxizität für die Entstehung von M. Huntington ausschlaggebend sein.

Oxidativer Stress einer Zelle wird durch eine hohe Anzahl von freien Sauerstoffradikalen hervorgerufen. Als Folge von Exzitotoxizität und mitochondrialer Dysfunktion werden Sauerstoffradikal-Bildner, wie Wasserstoffperoxide, Superoxide und Stickstoffoxide, generiert. Die daraus resultierenden freien Radikale können ebenfalls den apoptotischen Zelltod auslösen (Thompson, 1995; Petersen et al., 1999).

Es wird klar, dass diese zum Teil als eigenständig diskutierten Mechanismen nicht voneinander getrennt betrachtet werden sollten. Gestörter Energiemetabolismus der Mitochondrien, Glutamatexzitotoxizität und oxidativer Stress beeinflussen sich gegenseitig und können unter bestimmten Umständen alle zur Apoptose einer Zelle führen. Dennoch vermutet man bei allen diesen Mechanismen eher eine entscheidende Rolle in den späten neuropathologischen Stadien.

5.3.4.2. Transkriptionelle Fehlregulation

Eine Fehlregulation der Transkription wird als eines der früheren Ereignisse in der Pathogenese beim M. Huntington vermutet. So finden sich in Transkriptionsfaktoren ebenfalls Polyglutamin-reiche Regionen. Diese Strukturähnlichkeit könnte es dem mutierten Huntingtin möglich machen, an mehreren Stellen auf die Transkription einzuwirken. So könnte mutiertes Huntingtin über direkte Bindung an die DNS das normale Muster der Transkription unterbrechen oder aber zur Aktivierung normalerweise stummer Gene führen. Auch eine direkte Interaktion zwischen Huntingtin und Transkriptionsfaktoren könnte diese entweder

inaktivieren oder auch sequestrieren. In transgenen M. Huntington Mauslinien wird bereits in den frühen Stadien vor Beginn der Symptomatik eine selektive Herunterregulierung der Neurotransmitter-Rezeptoren beobachtet. Da diese Reprimierung mit einer Verringerung der mRNA-Kopien dieser Rezeptoren einhergeht, wird eine Veränderung auf dem Niveau der Transkription vermutet (Übersicht in Cha, 2000). Dies könnte im weiteren Verlauf der Erkrankung sowohl Einfluss auf die exzitatorische Toxizität als auch auf die anderen oben erwähnten Mechanismen haben.

5.3.5. Caspasen-Aktivierung und Apoptosemechanismen bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen

Neben dem M. Huntington werden hinter vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Alzheimer, M. Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose und den Polyglutaminerkrankungen, Mechanismen des Programmierten Zelltods vermutet (Offen et al., 2000).

Bei der DRPLA und der SBMA werden die Proteine mit dem verlängerten Polyglutamintrakt ebenfalls von Caspase-3 gespalten, aggregieren dann und können schließlich die Apoptose induzieren (Ellerby et al., 1999; Miyashita et al., 1998).

Bei der familiären Amyotrophen Lateralsklerose liegt eine Mutation in der Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase vor. Bei dieser Erkrankung kommt es ebenfalls zur Aktivierung von Caspasen. Caspase-1 wirkt dabei chronisch als langsamer Initiator der Apoptose-Kaskade, während Caspase-3 als finaler Effektor den Zelltod bedingt (Pasinelli et al., 2000). Eine Überexpression des anti-apoptotischen Bcl2 führt im transgenen Mausmodell zu einer Verzögerung der Neurodegeneration und der Caspasen-Aktivierung (Vukosavic et al., 2000).

Auch bei der häufigsten neurodegenerativen Erkrankung, dem M. Alzheimer, werden zumindest für einen Teil des Nervenzellverlustes Apoptosemechanismen verantwortlich gemacht. Von den vier für die Ätiologie relevanten Proteinen werden das Amyloid Precursor Protein (APP), Presenilin 1 und Presenilin 2 durch Caspase-3 gespalten (Kim et al., 1997; Shimohama, 2000). Durch Spaltung des Amyloid Precursor Proteins entsteht als neurotoxisches Produkt das Amyloid beta Peptid (Abeta). Abeta kann bei Zugabe zu isolierten Mitochondrien direkt eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien sowie eine Schwellung der Mitochondrien bewirken (Kim et al., 2002). Diese Ergebnisse deuten auch beim M. Alzheimer auf die Relevanz des intrinsischen Wegs der Apoptose hin. Da sich aber

der Nervenzelltod über einen langen Zeitraum hinzieht und Apoptose im Gegensatz dazu ein recht schneller Vorgang ist, sind weitere Untersuchungen zur Klärung der Zusammenhänge nötig.

5.4. Ausblick und therapeutische Ansätze

Die Forschung auf dem Gebiet der neurodegenerativen Erkrankungen und des M. Huntington im Speziellen hat in der letzten Dekade erhebliche Fortschritte gemacht. Mit der Identifizierung des verantwortlichen Huntingtin-Gens 1993 ist ein wichtiger Schritt gelungen. Dadurch konnte zum einen ein Gentest entwickelt werden, der die Ungewissheit von Patienten und Angehörigen beendet, der aber auch ethische Fragen aufwirft. Es sollte weiterhin im Einzelfall entschieden werden, ob der Gentest sinnvoll ist, nachdem weder Heilung noch eine kausale Therapie bislang zur Verfügung stehen. Daneben wurden nach Identifizierung des Gens Tiermodelle (durch Einschleusung des menschlichen Gens in deren Genom) und *in-vitro* Zellkulturen entwickelt. Diese sind heute aus der M. Huntington Forschung nicht mehr wegzudenken, da sie wesentlich zu Erkenntnissen über Pathomechanismen beigetragen haben. Auch leisten sie in der Erprobung von Therapieansätzen einen wichtigen Beitrag zum weiteren Verständnis. Da Erkenntnisse von Tier- und *in-vitro*- Modellen nur begrenzt auf den Menschen übertragbar sind, nimmt die Forschung an humanen Gewebeproben weiterhin einen wichtigen Platz in der Aufklärung der Zusammenhänge ein.

Einzelne Pathomechanismen, wie transkriptionelle Dysregulation, Exzitotoxizität, oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und Apoptose, sind intensiv in verschiedenen Modellen untersucht worden. Dies führte zu neuen, zum Teil auch erstaunlichen Erkenntnissen über die Pathogenese dieser Erkrankung. Dennoch ist ihr Zusammenspiel im langsamen Nervenzelltod noch nicht hinreichend aufgeklärt. Dabei ist auch die Rolle des mutierten Huntingtin nur teilweise geklärt. Dieses fehlende Verständnis macht weitere intensive Forschungsbemühungen nötig. Erst bei umfassenderem Verständnis der Pathomechanismen können längerfristige Therapieoptionen entwickelt werden, um den progredienten Nervenzellabbau hinauszuzögern oder sogar nachhaltig zu hemmen. Es existieren heute bereits Therapieansätze, die an den o.g. Pathomechanismen ansetzen und im Folgenden auch angesprochen werden sollen.

5.4.1. Angriffspunkte zur Therapie

5.4.1.1. Genereller Ansatzpunkt

Da der M. Huntington eine Erkrankung darstellt, die durch die Mutation eines einzelnen Gens verursacht wird, eröffnet sich prinzipiell die Möglichkeit einer kausalen Gentherapie. Das Huntingtin-Gen könnte durch Austausch, Reparatur oder „Anti-Sense“-Gentherapie unschädlich gemacht werden. Erste Versuche der „Anti-Sense“-Gentherapie im Tierversuch verliefen aber ernüchternd, da es zu keinen signifikanten Veränderungen der Expression des Huntingtins kam (Haque und Isacson, 1997). Ein weiterer, sehr neuer Ansatz für Polyglutaminerkrankungen ist der Einsatz von interferierender RNS. Es könnte dabei das mutierte Gen ausgeschaltet werden, ohne die Transkription des normalen Allels zu beeinflussen. Somit könnte die Expression des expandierten Huntingtin unterdrückt werden (Miller et al., 2003). Es bleibt jedoch abzuwarten, ob jemals eine kausale Gentherapie für den Menschen entstehen wird. Bis dahin bleibt nur der Ansatz an einzelnen Pathomechanismen und die supportive Therapie.

5.4.1.2. Ansatz an der energetischen Dysfunktion

In der Pathogenese des M. Huntington spielt die mitochondriale Dysfunktion mit herabgesetzter energetischer Funktion eine wichtige Rolle. Daraus folgt eine verminderte ATP-Synthese für die Zelle. Besondere Beachtung wird in diesem Zusammenhang dem Coenzym Q₁₀ und Kreatinin geschenkt. Physiologisch fungiert das Coenzym Q₁₀ (Ubiquinon) als Elektronenakzeptor der Komplexe I und II in der Elektronentransportkette der Mitochondrien. Für das Coenzym Q₁₀ wurde *in vitro* eine Verbesserung der ATP-Generierung gezeigt. Außerdem entfaltet es eine zusätzliche Wirkung als wichtiges Antioxidationsmittel in mitochondrialen Membranen und Lipidmembranen (Beal, 2000). Im transgenen Mausmodell konnte es signifikant die Überlebenszeit verlängern und motorische Defizite sowie den Gewichtsverlust hinauszögern (Beal, 2002). In einer klinischen Studie mit M. Huntington Patienten enttäuschte Coenzym Q₁₀, da sich bei den Patienten keine signifikanten Verbesserungen zeigten (Huntington Study Group, 2001).

Kreatinin und Phosphokreatinin sind physiologische Energiespeicher der Zelle und generieren ATP zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Mit therapeutischer Kreatiningabe könnten die Energiespeicher im Gehirn erhöht werden und somit dem energetischen Defizit entgegenwirken (Beal, 2000). Auch hier zeigten sich ermutigende Ergebnisse im transgenen Mausmodell. Die Überlebenszeit dieser Mäuse wurde signifikant verlängert, und auch die motorischen Defizite konnten verbessert werden (Dedeoglu et al., 2003). In klinischen Studien mit M. Huntington Patienten konnten jedoch keine funktionalen, neuromuskulären oder kognitiven Verbesserungen festgestellt werden (Verbessem et al., 2003).

Hier wird klar, dass die Hoffnung auf ein Therapieansprechen sich von der transgenen Maus leider nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen lässt und weitere Therapieansätze oder –applikationen entwickelt werden müssen.

5.4.1.3. Hemmung von Caspasen

Eine weitere Therapiemöglichkeit könnte in der direkten Hemmung von Caspasen bestehen. Cystamin wurde zunächst als Inhibitor der Transglutaminase untersucht, bevor sich herausstellte, dass es unabhängig davon auch Caspase-3 hemmen kann (Lesort et al., 2003). Für das transgene Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Cystamin zu einer Überlebenszeitverlängerung, Reduzierung des Gewichtsverlustes und motorischer Defizite sowie zu einer Verzögerung der pathologischen Charakteristika führt (Dedeoglu et al., 2002). Das Antibiotikum Minocyclin könnte eine mögliche Therapie beim M. Huntington darstellen. Es hemmt sowohl die Caspase-1 als auch die Caspase-3 im transgenen Mausmodell (Chen et al., 2000a). Daneben wirkt es inhibitorisch im Caspase-unabhängigen Weg der Apoptose, der über AIF („Apoptosis inducing factor“) vermittelt wird (Wang et al., 2003). Die positive Wirkung von Minocyclin konnte in einer Fallbeschreibung eines M. Huntington Patienten bestätigt werden (Denovan-Wright et al., 2002).

All diese Pharmaka stellen den Versuch dar, bei noch nicht aufgeklärten Pathomechanismen an einzelnen Punkten anzusetzen. Leider erweisen sich die zum Teil hoffnungsvollen Ergebnisse mit transgenen Mäusen als ernüchternd in klinischen Studien. Das könnte daran liegen, dass diese Pharmaka an Punkten ansetzen, die erst spät für den Nervenzellverlust verantwortlich sind. Daher muss neben der Durchführung weiterer Studien mit verschiedenen poten-

tiellen Pharmaka und unterschiedlichen Therapieschemata vor allem der Versuch auf der Etablierung einer kausalen Therapie liegen.

6. Zusammenfassung

Der Pathomechanismus, der zur selektiven Neurodegeneration und Atrophie beim M. Huntington führt, ist bislang nicht ausreichend aufgeklärt. Es häufen sich aber Anhaltspunkte, nach denen der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle beim Nervenzelluntergang spielt. Es findet dabei keine wesentliche inflammatorische Begleitreaktion im umliegenden Gewebe statt. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Caspasen in Zellkulturen und Mausmodellen differentiell exprimiert und aktiviert werden. Zusätzlich stellt das Genprodukt Huntingtin selbst ein Substrat von Caspasen dar.

Die hier vorliegende Arbeit sollte untersuchen, inwieweit der intrinsische Weg der Apoptose eine Rolle beim M. Huntington spielt. Dazu wurde die Freisetzung bzw. Aktivierung der einzelnen Komponenten des Apoptosom-Komplexes mittels *In-situ*- und Western-hybridisierung nachgewiesen. Besonders wichtig erschien dabei der Nachweis vor allem in menschlichem *post-mortem* Striatumgewebe, aber auch in transgenem murinen Striatumgewebe der Mauslinie R6/2.

Die Studie wurde mit 47 Gewebeproben von M. Huntington Patienten und 28 Kontrollen durchgeführt. Dabei sollte stadienabhängig die Umverteilung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol sowie die Aktivierung der Caspase-9 gezeigt werden.

Die als Gefrierschnitte vorliegenden Gewebeproben von Mensch und Maus wurden immunhistochemisch aufgearbeitet, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Für die Darstellung des Cytochrom C wurde ein kommerzieller monoklonaler Antikörper verwendet. Für den Nachweis von Caspase-9 wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die gespaltene, aktivierte Form der Caspase-9 verwendet. Für die Bestätigung mittels Western Blot Verfahren wurden schockgefrorene Gewebeproben zum Proteinnachweis aufgearbeitet und geblottet. Nach der Inkubation der Nitrozellulosestreifen mit entsprechenden Antikörpern wurden die Banden gefärbt.

Es zeigte sich, dass sowohl in menschlichem *post-mortem* Hirngewebe als auch in transgenem Mausgewebe eine progressive Umverteilung des Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol stattfand. Es konnte ebenfalls eine Aktivierung von Caspase-9 gezeigt werden, die allerdings nur in späten pathologischen Stadien ausgeprägt war. Die immunhistochemischen Ergebnisse wurden von den Proteinnachweisen im Western Blot Verfahren bestätigt.

Schlussfolgernd muss vermutlich der Apoptose eine späte Rolle beim Nervenzelltod beim M. Huntington zugeschrieben werden. Dies ist durch die Tatsache zu begründen, dass sowohl in humanem *post-mortem* als auch transgenem Mausgewebe erst in späten Stadien neben der Cytochrom C-Freisetzung die Aktivierung der Caspase-9 stattfand. Für die früheren Stadien sind wahrscheinlich weitere Pathomechanismen verantwortlich.

Die Diskussion beschäftigt sich mit der Einordnung der Ergebnisse in bereits bestehende Erkenntnisse über die Rolle des expandierten Polyglutamintrakts des Huntingtin, den verschiedenen Formen des programmierten Zelltods, anderen möglichen Pathomechanismen sowie entsprechenden Therapieansätzen. Ein umfassenderes Bild über die Vorgänge, die schließlich zum Tod der Nervenzelle führen, wird erst möglich sein, wenn die Pathomechanismen mit ihren Interaktionen und zeitlichen Abläufen weiter aufgeklärt sein werden. Erst dann können zielgerichtete Therapien für die M. Huntington Patienten entwickelt werden.

7. Literaturverzeichnis

Albin RL, Reiner A, Anderson KD, Penney JB, Young AB. Striatal and nigral neuron subpopulations in rigid Huntington's disease: implication for the functional anatomy of chorea and rigidity-akinesia. *Ann Neurol.* **1990**; 27:357-65.

Ambrose CM, Duyao MP, Barnes G, Bates GP, Lin CS, Srinidhi J, Baxendale S, Hummerich H, Lehrach H, Altherr M, Wasmuth J, Buckler A, Church D, Housman D, Berks M, Micklem G, Durbin R, Dodge A, Read A, Gusella JF, MacDonald ME. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet.* **1994**; 20(1):27-38.

Arends MJ, and Wyllie AH. Apoptosis: Mechanisms and Roles in Pathology. *Int Rev Exp Pathol.* **1991**; 32:223-54.

Ballard KJ, and Holt SJ. Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the foetal rat foot: the role of macrophages and hydrolytic enzymes. *J Cell Sci.* **1968**; 3(2):245-62.

Bates GP, Davies SW. Transgenic mouse models of neurodegenerative disease caused by CAG/polyglutamine expansions. *Mol Med Today.* **1997**; 3(11):508-15.

Beal MF, Martin JB. Neuropeptides in neurological diseases. *Ann Neurol.* **1986**; 20:547-65.

Beal MF, Mazurek MF, Ellison DW, Swartz KJ, McGarvey U, Bird ED, Martin JB. Somatostatin and neuropeptide Y concentrations in pathologically graded cases of Huntington's disease. *Ann Neurol.* **1988**; 23(6):562-69.

Beal MF. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *TINS.* **2000**; 23(7):298-304.

Beal MF. Coenzyme Q10 as a possible treatment for neurodegenerative diseases. *Free Radic Res.* **2002**; 36(4):455-60.

Boyer PD, Chance B, Ernster L, Mitchell P, Racker E, Slater EC. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Ann Rev Biochem.* **1977**; 46:955-1026.

Cha JH. Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci.* **2000**; 23(9):387-92.

Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med.* **2000a**; 6(7):797-801.

Chen Q, Gong B, Almasan A. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **2000b**; 7(2):227-33.

Chu ZL, Pio F, Xie Z, Welsh K, Krajewska M, Krajewski S, Godzik A, Reed JC. A novel enhancer of the Apaf1 Apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem.* **2001**; 276:9239-9245.

Chun W, Lesort M, Lee M, Johnson GV. Mutant huntingtin aggregates do not sensitize cells to apoptotic stressors. *FEBS Lett.* **2002**; 515(1-3):61-5.

Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J.* **1997**; 326(Pt1):1-16.

- Conneally** PM. Huntington disease: genetics and epidemiology. *Am J Hum Genet.* **1984**; 36(3):506-26.
- Cregan** SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol.* **2002**; 158(3):507-17.
- Crompton** M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* **1999**; 341:233-49.
- Cryns** V, and Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev.* **1998**; 12(11):1551-70.
- Cudkowicz** M, Kowall NW. Degeneration of pyramidal projection neurons in Huntington's disease cortex. *Ann Neurol.* **1990**; 27(2):200-4.
- Dawbarn** D, De Quidt ME, Emson PC. Survival of basal ganglia neuropeptide Y-somatostatin neurones in Huntington's disease. *Brain Res.* **1985**; 340(2):251-60.
- de la Monte** SM, Vonsattel JP, Richardson EP Jr. Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* **1988**; 47(5):516-25.
- De Rooij** KE, De Koning Gans PA, Skraastad MI, Belfroid RD, Vegter-Van Der Vlis M, Roos RA, Bakker E, Van Ommen GJ, Den Hunnen JT, Losekoot M. Dynamic mutations in Dutch Huntington's disease patients: increased paternal repeat instability extending to within the normal size range. *J Med Genet.* **1993**; 30(12):996-1002.
- Dedeoglu** A, Kubilus JK, Jeitner TM, Matson SA, Bogdanov M, Kowall NW, Matson WR, Cooper AJ, Ratan RR, Beal MF, Hersch SM, Ferrante RJ. Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *J Neurosci.* **2002**; 22(20):8942-50.
- Dedeoglu** A, Kubilus JK, Yang L, Ferrante KL, Hersch SM, Beal MF, Ferrante RJ. Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurochem.* **2003**; 85(6):1359-67.
- Denovan-Wright** EM, Devarajan S, Dursun SM, Robertson HA. Maintained improvement with minocycline of a patient with advanced Huntington's disease. *J Psychopharmacol.* **2002**; 16(4):393-4.
- Desagher** S, and Martinou JC. Mitochondria as the central point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **2000**; 10:369-377.
- DiFiglia** M, Christakos S, Aronin N. Ultrastructural localization of immunoreactive calbindin-D28k in the rat and monkey basal ganglia, including subcellular distribution with colloidal gold labeling. *J Comp Neurol.* **1989**; 279(4):653-65.
- Dragunow** M, Faull RL, Lawlor P, Beilharz EJ, Singleton K, Walker EB, Mee E. In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport.* **1995**; 6(7):1053-7.
- Du** C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* **2000**; 102(1):33-42.
- Duan** H, Orth K, Chinnaiyan AM, Poirier GG, Froelich CJ, He WW, Dixit VM. ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J Biol Chem.* **1996**; 271(28):16720-4.

- Duyao MP**, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*. **1995**; 269(5222):407-10.
- Ellerby LM**, Hackam AS, Propp SS, Ellerby HM, Rabizadeh S, Cashman NR, Trifiro MA, Pinsky L, Wellington CL, Salvesen GS, Hayden MR, Bredesen DE. Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. *J Neurochem*. **1999**; 72(1):185-95.
- Ferrante RJ**, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP Jr, Bird ED, Martin JB. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science*. **1985**; 230(4725):561-63.
- Ferrante RJ**, Kowall NW, Beal MF, Martin JB, Bird ED, Richardson EP Jr. Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. **1987**; 46:12-27.
- Ferrante RJ**, Kowall NW, Richardson EP Jr. Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *J Neurosci*. **1991**; 11(12):3877-87.
- Fujimura M**, Morita-Fujimura Y, Muratami K, Kawase M, Chan PH. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. **1998**; 18(11):1239-47.
- Fujita N** und Tsuruo T. Involvement of Bcl2 cleavage in the acceleration of VP-16-induced U937 cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. **1998**; 246:484-8.
- Goldberg YP**, Kremer B, Andrew SE, Theilmann J, Graham RK, Squitieri F, Telenius H, Adam S, Sajoo A, Starr E, Heilberg A, Wolff G, Hayden MR. Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nat Genet*. **1993**; 5(2):174-79.
- 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(4):442-9.
- Graveland GA**, Williams RS, DiFiglia M. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science*. **1985**; 227(4688):770-73.
- Green DR**, and Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. **1998**; 281:1309-1312.
- Gu M**, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol*. **1996**; 39(3):385-9.
- Gusella JF**, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's Disease. *Nature*. **1983**; 306(5940):234-38.
- Gusella JF**, MacDonald ME. Genetics and Molecular Biology of Huntington's Disease. In: "Movement Disorders: Neurologic Principles and Practice", Watts RL, Koller WC (Hrsg.), McGraw-Hill, New York, **1997**: 477-90.
- 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(7):2522-34.

- Gyls KH, Fein JA, Cole GM.** Caspase inhibition protects nerve terminals from in vitro degradation. *Neurochem Res.* **2002**; 27(6):465-72.
- Hackam AS, Yassa AS, Singaraja R, Metzler M, Gutekunst CA, Gan L, Warby S, Wellington CL, Vaillancourt J, Chen N, Gervais FG, Raymond L, Nicholson DW, Hayden MR.** Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *J Biol Chem.* **2000**; 275(52):41299-308.
- Haque N, Isacson O.** Antisense gene therapy for neurodegenerative disease? *Exp Neurol.* **1997**; 144(1):139-46.
- Harper PS.** The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet.* **1992**; 89(4):365-76.
- Hedreen JC, Peyser CE, Folstein SE, Ross CA.** Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci Lett.* **1991**; 133(2):257-61.
- Hersch SM, Ferrante RJ.** Neuropathology and Pathophysiology of Huntington's Disease. In: "Movement Disorders: Neurologic Principles and Practice", Watts RL, Koller WC (Hrsg.), McGraw - Hill, New York, **1997**: 503-26.
- Hickey MA, Chesselet MF.** Apoptosis in Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **2003**; 27(2):255-65.
- Huntington Study Group.** A randomized, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 and remacemide in Huntington's disease. *Neurology.* **2001**; 57(3):397-404.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group** A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell.* **1993**; 72(6):971-83.
- Igarashi S, Koide R, Shimohata T, Yamada M, Hayashi Y, Takano H, Date H, Oyake M, Sato T, Sato A, Egawa S, Ikeuchi T, Tanaka H, Nakano R, Tanaka K, Hozumi I, Inuzuka T, Takahashi H, Tsuji S.** Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nat Genet.* **1998**; 18(2):111-17.
- Jemmerson R, Johnson JG, Burrell E, Taylor PS, Jenkins MK.** A monoclonal antibody specific for cytochrome c T cell stimulatory peptide inhibits T cell response and affects the way the peptide associates with antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* **1991**; 21(1):143-51.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **1972**; 26(4):239-57.
- Kim TW, Pettingell WH, Jung YK, Kovacs DM, Tanzi RE.** Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science.* **1997**; 277(5324):373-6.
- Kim HS, Lee JH, Lee JP, Kim EM, Chang KA, Park CH, Jeong SJ, Wittendorp MC, Seo JH, Choi SH, Suh YH.** Amyloid beta peptide induces cytochrome C release from isolated mitochondria. *Neuroreport.* **2002**; 13(15):1989-93.
- Kowall NW, Ferrante RJ, Martin JB.** Patterns of cell loss in Huntington's disease. *Trends Neurosci.* **1987**; 10:24-29.
- Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC.** Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of CPP32 (Caspase-3) expression, a member of the ICE/Ced-3 protease family. *Cancer Res.* **1997**; 57(8):1605-13.

- Krajewski S**, Gascoyne RD, Zapata JM, Krajewska M, Kitada S, Chanabhai M, Horsman D, Berean K, Piro LD, Fugier-Vivier I, Lui YJ, Wang HG, Reed JC. Immunolocalization of the ICE/Ced-3-family protease, CPP32/Yama, in non-Hodgkin's lymphomas, chronic lymphocytic leukemias (CLL) and reactive lymph nodes. *Blood*. **1997**; 89(10):3817-25.
- Lange H**, Thorner G, Hopf A, Schroder KF. Morphometric studies of the neuropathological changes in choreatic diseases. *J Neurol Sci*. **1976**; 28(4):401-25.
- Lesort M**, Lee M, Tucholski J, Johnson GV. Cystamine inhibits caspase activity. Implications for the treatment of polyglutamine disorders. *J Biol Chem*. **2003**; 278(6):3825-30.
- Li SH**, Schilling G, Young WS 3rd, Li XJ, Margolis RL, Stine OC, Wagster MV, Abbott MH, Franz ML, Ranen NG, Folstein S, Hedreen J, Ross C. Huntington's disease gene (IT 15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron*. **1993**; 11(5):985-93.
- Li P**, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. **1997**; 91(4):479-89.
- Li SH**, Lam S, Cheng AL, Li XJ. Intranuclear huntingtin increases the expression of caspase-1 and induces apoptosis. *Hum Mol Genet*. **2000**; 9(19):2859-67.
- Liu X**, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. **1996**; 86(1):147-57.
- Marshall FJ**, Shoulson I. Clinical Features and Treatment of Huntington's Disease. In: "Movement Disorders: Neurologic Principles and Practice", Watts RL, Koller WC (Hrsg.), McGraw-Hill, New York, **1997**: 493-98.
- Martinou I**, Desagher S, Eskes R, Antonsson B, Andre E, Fakan S, Martinou JC. The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J Cell Biol*. **1999**; 144(5):883-9.
- Mattson MP**, Duan W. "Apoptotic" biochemical cascades in synaptic compartments: roles in adaptive plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res*. **1999**; 58(1):152-66.
- McNeil SM**, Novelletto A, Srinidhi J, Barnes G, Kornbluth I, Altherr MR, Wasmuth JJ, Gusella JF, MacDonald ME, Myers RH. Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Hum Mol Genet*. **1997**; 6(5):775-79.
- Miller VM**, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003**; 100(12):7195-200.
- Miyashita T**, Okamura-Oho Y, Mito Y, Nagafuchi S, Yamada M. Dentatorubral Pallidoluysian Atrophy (DRPLA) Protein is cleaved by Caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem*. **1997**; 272(46):29238-42.
- Miyashita T**, Nagao K, Ohmi K, Yanagisawa H, Okamura-Oho Y, Yamada M. Intracellular aggregate formation of dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein with the extended polyglutamine. *Biochem Biophys Res Commun*. **1998**; 249(1):96-102.
- Miyashita T**, Matsui J, Ohtsuka Y, Mami U, Fujishima S, Okamura-Oho Y, Inoue T, Yamada M. Expression of extended polyglutamine sequentially activates initiator and effector caspases. *Biochem Biophys Res Commun*. **1999**; 257(3):724-30.

Myers RH, Leavitt J, Farrer LA, Jagadeesh J, McFarlane H, Mastromauro CA, Mark RJ, Gusella JF. Homozygote for Huntington disease. *Am J Hum Genet.* **1989**; 45(4):615-18.

Narabayashi H. Huntington's chorea in Japan: Review of the literature. *Adv Neurol.* **1973**; 1:253-59.

Offen D, Elkon H, Melamed E. Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm Suppl.* **2000**; (58):153-66.

Ona VO, Li M, Vonsattel JP, Andrews LJ, Khan SQ, Chung WM, Frey AS, Menon AS, Li XJ, Stieg PE, Yuan J, Penney JB, Young AB, Cha JH, Friedlander RM. Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature.* **1999**; 399(6733):263-7.

Palo J, Somer H, Ikonen N, Karila L, Peltonen L. Low prevalence of Huntington's disease in Finland. *Lancet.* **1987**; 2(8562):805-6.

Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH Jr, Cleveland DW. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**; 97(25):13901-6.

Penney JB Jr, Young AB, Shoulson I, Starosta-Rubenstein S, Snodgrass SR, Sanchez-Ramos J, Ramos-Arroyo M, Gomez F, Penchaszadeh G, Alvir J, Esteves J, DeQuiroz I, Marsol N, Moreno H, Conneally PM, Bonilla E, Wexler NS. Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. *Mov Disord.* **1990**; 5(2):93-99.

Petersen A, Mani K, Brundin P. Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease. *Exp Neurol.* **1999**; 157(1):1-18.

Polak JM, Van Noorden S. An introduction to Immunocytochemistry: Current Techniques and Problems. In: "Microscopy Handbooks #11", Royal Microscopy Society Publications, Oxford University Press, Oxford (Ed.), **1987**, revised edition, 5.1.

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(5 Pt 2):3775-87.

Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch*, de Gruyter Verlag Berlin, 257. Auflage **1994**: 1045.

Qin ZH, Wang Y, Kikly KK, Sapp E, Kegel KB, Aronin N, DiFiglia M. Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem.* **2001**; 276(11):8079-86.

Rey L, Maier RJ. Cytochrome c terminal oxidase pathways of *Azotobacter vinelandii*: analysis of cytochrome c4 and c5 mutants and up-regulation of cytochrome c-dependent pathways with N₂ fixation. *J Bacteriol.* **1997**; 179(22):7191-6.

Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, Clementi E, Hackam A, Hayden MR, Li Y, Cooper JK, Ross CA, Govoni S, Vincenz C, Cattaneo E. Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci.* **2000**; 20(10):3705-13.

Roy S, and Nicholson DW. Programmed cell-death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Mol Med Today.* **2000**; 6:264-266.

Roy S, Bayly CI, Gareau Y, Houtzager VM, Kargman S, Keen SL, Rowland K, Seiden IM, Thornberry NA, Nicholson DW. Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001**; 98(11):6132-7.

- 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's disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet.* **1996**; 59(1):16-22.
- Saleh** A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* **1999**; 274(25):17941-5.
- 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(3):623-33.
- Sanderson** CJ. The mechanism of T cell mediated cytotoxicity. II. Morphological studies of cell death by time-lapse microcinematography. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **1976**; 192(1107):241-55.
- Sato** A, Shimohata T, Koide R, Takano H, Sato T, Oyake M, Igarashi S, Tanaka T, Inuzuka T, Nawa H, Tsuji S. Adenovirus-mediated expression of mutant DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches in neuronally differentiated PC12 cell. Preferential intranuclear aggregate formation and apoptosis. *Hum Mol Genet.* **1999**; 8(6):997-1006.
- Sawa** A, Wiegand GW, Cooper J, Margolis RL, Sharp AH, Lawler JF Jr, Greenamyre JT, Snyder SH, Ross CA. Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat Med.* **1999**; 5(10):1194-8.
- Seto-Ohshima** A, Emson PC, Lawson E, Mountjoy CQ, Carrasco LH. Loss of matrix calcium-binding protein-containing neurons in Huntington's disease. *Lancet.* **1988**; 1(8597):1252-55.
- Shimohama** S. Apoptosis in Alzheimer's disease: an update. *Apoptosis.* **2000**; 5(1):9-16.
- Sotrel** A, Paskevich PA, Kiely DK, Bird ED, Williams RS, Myers RH. Morphometric analysis of the prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurology.* **1991**; 41(7):1117-23.
- Srinivasula** SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, Robertson N, Armstrong RC, Wang L, Trapani JA, Tomaselli KJ. The Ced-3/interleukin 1 β converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2 alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem.* **1996**; 271(43):27099-106.
- Straus** W. Imidazole increases the sensitivity of the cytochemical reaction for peroxidase with diaminobenzidine at a neutral pH. *J Histochem Cytochem.* **1982**; 30(5):491-3.
- Susin** SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer G. The central executioner of apoptosis. Multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD-95-induced apoptosis. *J Exp Med.* **1997**; 186(1):25-37.
- Tenneti** L, Lipton SA. Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem.* **2000**; 74(1):134-42.
- Thompson** CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* **1995**; 267(5203):1456-62.
- Thornberry** NA, and Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science.* **1998**; 281:1312-16.
- Trump** BF, Berezsky IK, Osornio-Vargas AR. In: "Cell Death in Biology and Pathology" Bowen ID, Lockshin RA (Eds.), Chapman and Hall, London, **1981**; 209-242.

- 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(14):8093-7.
- Verbessem P**, Lemièrre J, Eijnde BO, Swinnen S, Vanhees L, Van Leemputte M, Hespel P, Dom R. Creatine supplementation in Huntington's disease: a placebo-controlled pilot trial. *Neurology*. **2003**; 61(7):925-30.
- Vito P**, Ghayur T, D'Adamio L. Generation of anti-apoptotic presenilin-2 polypeptides by alternative transcription, proteolysis, and caspase-3 cleavage. *J Biol Chem*. **1997**; 272(45):28315-20.
- Vonsattel JP**, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. **1985**; 44(6):559-77.
- Vonsattel JP**, DiFiglia M. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. **1998**; 57:369-84.
- Vukosavic S**, Stefanis L, Jackson-Lewis V, Guegan C, Romero N, Chen C, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. Delaying caspase activation by Bcl-2: A clue to disease retardation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*. **2000**; 20(24):9119-25.
- Wang X**, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E, Ferrante RJ, Kristal BS, Friedlander RM. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003**; 100(18):10483-7.
- Weindl A**, Conrad B. Chorea und choreatische Bewegungsstörungen. In: „Bewegungsstörungen in der Neurologie – Richtig erkennen und behandeln“, Conrad B, Ceballos-Baumann AO (Hrsg.), Thieme Verlag Stuttgart, **1996**: 155-72.
- Wellington CL**, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, McCutcheon K, Salvesen GS, Propp SS, Bromm M, Rowland KJ, Zhang T, Rasper D, Roy S, Thornberry N, Pinsky L, Kakizuka A, Ross CA, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR. Caspase cleavage of gene products associated with triplet disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem*. **1998**; 273(15):9158-67.
- Wellington CL**, Hayden MR. Caspases and neurodegeneration: on the cutting edge of new therapeutic approaches. *Clin Genet*. **2000a**; 57(1):1-10.
- 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*. **2000b**; 275(26):19831-8.
- Wellington CL**, Ellerby LM, Gutekunst CA, Rogers D, Warby S, Graham RK, Loubser O, van Raamsdonk J, Singaraja R, Yang YZ, Gafni J, Bredesen D, Hersch SM, Leavitt BR, Roy S, Nicholson DW, Hayden MR. Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci*. **2002**; 22(18):7862-72.
- Wexler NS**, Young AB, Tanzi RE, Travers H, Starosta-Rubinstein S, Penney JB, Snodgrass SR, Shoulson I, Gomez F, Ramos Arroyo MA, Penchaszadeh GK, Moreno H, Gibbons K, Faryniarz A, Hobbs W, Anderson MA, Bonilla E, Conneally PM, Gusella JF. Homozygotes for Huntington's disease. *Nature*. **1987**; 326(6109):194-97.
- Wyllie AH**, Kerr JF, and Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. **1980**; 68:251-306.
- Wyllie AH**. In "Cell Death in Biology and Pathology" Bowen ID, Lockshin RA (Eds.), Chapman and Hall, London, **1981**; 9-34.

Young AB. Huntington's Disease and Other Trinucleotide Repeat Disorders. In: "Molecular Neurology", Martin JB (Hrsg.), Scientific American Medicine, New York, **1998**: 35-54.

Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's Disease gene homologue. *Nat Genet.* **1995**; 11(2):155-63.

Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Pawlowski K, Godzik A, Reed JC. BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**; 97(6):2597-602.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An Apaf-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* **1999**; 274:11549-11556.

Zühlke C, Riess O, Bockel B, Lange H, Thies U. Mitotic stability and meiotic variability of the (CAG)_n repeat in Huntington's disease gene. *Hum Mol Genet.* **1993**; 2(12):2063-67.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Adolf Weindl, der meine Doktorarbeit an der Technischen Universität München vertritt. Er gab mir die Möglichkeit, neben der reinen Forschung im Labor auch M. Huntington Patienten in seiner Sprechstunde in der Neurologischen Klinik kennen zu lernen. Bei der Fertigstellung der Arbeit zeigte er sich stets interessiert und stand mir mit wertvollen Ratschlägen zur Seite.

In den USA möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Robert J. Ferrante, PhD, bedanken, der die Themenstellung dieser Doktorarbeit übernahm. Zudem machte er mir die Nutzung seines neuropathologischen Labors in Bedford, MA, möglich, arbeitete mich ein und stand mir als Betreuer vor Ort mit Fachwissen, Ratschlägen und Unterstützung zur Seite.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn James Kubilus für die exzellente Einarbeitung und Hilfe bei den verschiedenen Labortechniken bedanken. Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern im Labor, die mir den Aufenthalt unvergesslich machten.

Herrn Dr. Stefan Kümmerle danke ich für die Herstellung des Kontaktes zu Herrn Ferrante und die vielfältigen Ratschläge zur Planung meines dortigen Aufenthaltes.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir letztlich den Aufenthalt in Boston ermöglicht haben und mich stets uneingeschränkt unterstützt und meine Begeisterung geteilt haben. Auch meinem Freund, meinem Bruder und meinen Freunden möchte ich für die Anteilnahme und Unterstützung in dieser Zeit danken.

9. Lebenslauf

Name:	Tamara Kiechle
Geburtsdatum/ort:	22. Juli 1977 in München
Schule: Sept. 1987 – Mai 1996	Werner-Heisenberg Gymnasium Garching, Abitur 1996 (Note: „sehr gut“)
Studium: Nov. 1996 – Aug. 1998	Medizinstudium an der LMU München (Vorklinik)
Aug. 1996	Physikum / Ärztliche Vorprüfung (Gesamtnote: „befriedigend“)
Nov. 1996 – Okt. 2003	Medizinstudium an der TU München (Klinik)
Okt. 2003	Universitätsklinikum Rechts der Isar 3. Staatsexamen / Ärztliche Prüfung (Gesamtnote: „gut“)
Praktisches Jahr: Okt. 2002 – Feb. 2003	Innere Medizin am New York Presbyterian Hospital, Weill Medical College, Cornell University, New York / USA
Feb. 2003 – Juni 2003	Dermatologie am Klinikum Biederstein der TU München
Juni 2003 – Sept. 2003	Chirurgie am Texas Heart Institute, University of Texas, Houston / USA
Ärztin in Praktikum: ab April 2004	Als Associate Intern bei McKinsey & Co., München im Bereich Pharmaceuticals / Health Care
Research Fellowship/ Experimenteller Teil der Dissertation: Aug. 2000 – April 2001	9 Monate Arbeit als Research Fellow in der Abteilung für Experimentelle Neurologie und Neuropathologie, Boston University Medical School, Boston / USA
Internship: Mai 2001 – Aug. 2003	3 Monate als Summer Fellow bei McKinsey & Co., München im Bereich Pharmaceuticals / Health Care
Fremdsprachenkenntnisse:	Englisch (fließend in Wort und Schrift) Französisch (in Wort und Schrift) Spanisch (Grundkenntnisse)