

Die Ubiquitin-Protein-Ligase MID1 und ihre Funktion in Zellproliferation und -migration sowie bei der Entstehung der Huntington- Krankheit

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Michael Willam

geb. am 01.08.1984 in Rüsselsheim

Mainz, 2018

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	9
Abstract	11
1. Einleitung	12
1.1 Gehirnentwicklung.....	12
1.1.1 Die Entwicklung des Neocortex.....	14
1.1.2 Das Striatum	16
1.1.3 Der Hippocampus	19
1.2 Das Opitz BBB/G-Syndrom (OS)	22
1.2.1 Das <i>Midline-1</i> -Gen (<i>MID1</i>)	23
1.2.2 Das Midline-1-Protein (<i>MID1</i>).....	24
1.2.3 OS ist eine Neurokristopathie.....	27
1.3 Die Huntington-Krankheit (HD)	29
1.3.1 Das Huntingtin-Protein (HTT).....	31
1.3.2 Juvenile HD.....	33
1.3.3 Präklinische Symptome.....	34
1.3.4 <i>MID1</i> bei HD.....	36
1.4 Das Hdh150-Mausmodell.....	37
1.5 Metformin	39
1.6 Ziel dieser Arbeit	41
2. Material und Methoden	43
2.1 Material	43
2.1.1 Geräte	43
2.1.2 Chemikalien/Reagenzien	43
2.1.3 Puffer und Lösungen	45
2.1.4 Gele	45
2.1.5 Kits	46
2.1.6 Primer	46
2.1.7 Plasmide	47
2.1.8 Bakterien.....	47
2.1.9 Enzyme	47

2.1.10 Antikörper.....	48
2.1.11 Marker.....	48
2.1.12 Medien.....	49
2.1.13 Zelllinien.....	49
2.1.14 siRNAs.....	49
2.1.15 shRNAs.....	50
2.1.16 EDV-Programme und Tools.....	50
2.2 Methoden.....	50
2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden.....	50
2.2.2 Zellkultur.....	51
2.2.3 Erstellung eines <i>MID1</i> -ÜE-Konstrukt.....	51
2.2.4 Erstellung von <i>MID1</i> -Knockdown-Konstrukten.....	52
2.2.4.1 Der Mechanismus der RNA-Interferenz.....	52
2.2.4.2 Design der shRNAs.....	53
2.2.4.3 Annealing.....	54
2.2.4.4 Restriktionsverdau und Ligation.....	54
2.2.5 Vermehrung von Vektoren.....	55
2.2.5.1 Transformation.....	55
2.2.5.2 Minipräparation.....	55
2.2.5.3 Sequenzierung.....	56
2.2.5.4 Maxipräparation.....	56
2.2.6 Transfektion.....	57
2.2.6.1 Überexpression von <i>MID1</i>	57
2.2.6.2 Knockdown von <i>MID1</i>	57
2.2.6.3 Überprüfung der Transfektion.....	58
2.2.7 Proliferationsassay.....	58
2.2.8 Migrationsassay.....	58
2.2.9 Mäusezucht.....	59
2.2.10 Genotypisierung.....	60
2.2.11 Erstellung von Proteinlysaten aus Zellen.....	61
2.2.12 Erstellung von Proteinlysaten aus Gewebe.....	61
2.2.13 Westernblot.....	61
2.2.13.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid -Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	61
2.2.13.2 Blotting.....	62

2.2.14 <i>In utero</i> Elektroporation	63
2.2.15 Immunhistochemie (IHC)	64
2.2.15.1 Erstellung von Hirnschnitten	64
2.2.15.2 Fluoreszenzmarkierung	65
2.2.16 Erstellung primärer Neuronen aus embryonalem Mausgewebe	65
2.2.16.1 Terminverpaarung	65
2.2.16.2 Präparation	66
2.2.17 Metformin-Applikationen <i>in vivo</i>	67
2.2.17.1 Orale Applikation	67
2.2.17.2 Injektionen	67
2.2.18 Verhaltensexperimente	68
2.2.18.1 Visual Discrimination Task (VD)	69
2.2.18.2 Social Interaction (SI) - Sequentielle Exposition zu leerem Käfig und Käfig mit Interaktionsmaus.....	71
2.2.18.3 Social Interaction (SI) – 3-Teile Kammer	72
2.2.18.4 Elevated Plus Maze (EPM)	73
2.2.18.5 Open Field Test (OF)	74
2.2.18.6 Novel Object Recognition Task (NORT)	75
2.2.19 Statistik	77
3. Ergebnisse	79
3.1 MID1 in Zellproliferation und –migration.....	79
3.1.1 Fibroblasten	79
3.1.2 HeLa-Zellen - Knockdown	82
3.1.3 HeLa-Zellen – Überexpression.....	85
3.2 <i>In utero</i> Elektroporation	88
3.3 Charakterisierung des Hdh150-Mausmodells im präklinischen Verlauf.....	90
3.3.1 Visual Discrimination Task (VD).....	91
3.3.2 Social Interaction (SI)	96
3.3.3 Elevated Plus Maze (EPM)	98
3.3.4 Open Field Test (OF)	99
3.3.5 Novel Object Recognition Task (NORT)	100
3.4 Metformin in der Therapie von HD	101
3.4.1 Die Wirkung von Metformin auf primäre Neurone	101

3.4.2 Cortikale Metformininjektion	102
3.4.3 Orale Applikation im Trinkwasser	105
3.4.4 Verhaltensnormalisierung durch Metforminbehandlung	111
3.4.4.1 Open Field Test (OF) - Metformin.....	112
3.4.4.2 Novel Object Recognition Task (NORT) - Metformin	112
4. Diskussion	114
4.1 Die MID1 Ubiquitin-Protein-Ligase in Zellproliferation und -migration	114
4.1.1 Der Einfluss der MID1 Ubiquitin-Protein-Ligase auf die Zellproliferation	115
4.1.2 Der Einfluss der MID1 Ubiquitin-Protein-Ligase auf die Zellmigration	116
4.1.2.1 Funktionsverlust von MID1	116
4.1.2.2 Gain-of-function von überexprimiertem MID1	118
4.2 Die MID1-Ubiquitin-Protein-Ligase bei der Translation von mutHTT	119
4.2.1 Das präsymptomatische Stadium in der Hdh150-Maus	119
4.2.2 Metformin als frühzeitig zu verabreichende, chronische Therapie bei HD	124
4.2.2.1 Metformin reduziert die mTOR- Aktivität und die Expression von mutHTT	128
4.2.2.2 Metformin normalisiert frühe Verhaltensauffälligkeiten im Hdh150-Mausmodell.....	130
5. Literatur	133
6. Anhang	162
6.1 Abbildungsverzeichnis	162
6.2 Tabellenverzeichnis	165
6.3 Abkürzungsverzeichnis	167
6.4 Publikationen und Kongressteilnahmen	16969
6.5 Selbstständigkeitserklärung	1711

Zusammenfassung

Mutationen im *Midline-1*-Gen, das für die Ubiquitin-Protein-Ligase Midline-1 kodiert, verursachen das Opitz BBB/G-Syndrom, eine embryonale Entwicklungsstörung, bei der Strukturen der ventralen Mittellinie betroffen sind. Studien legen nahe, dass Midline-1 bei Proliferation und Migration von Neuralleistenzellen während der Embryonalentwicklung eine tragende Rolle spielt. In dieser Arbeit wurde das Proliferations- und Migrationsverhalten untersucht in Fibroblasten, die eine 4bp-Deletion im Exon 9 des *Midline-1*-Gens tragen sowie in HeLa-Zellen, die *Midline-1* über- oder unterexprimieren. Während bei der Proliferation keine Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen sichtbar waren, konnte beim Migrationsverhalten der *Midline-1* überexprimierenden HeLa-Zellen eine signifikant schnellere Migration beobachtet werden. Bei den Fibroblasten und den HeLa-Zellen mit *MID1*-Knockdown konnte lediglich ein Trend zur langsameren Migration festgestellt werden, was eine Kompensation durch das Schwesterprotein Midline-2 nahe legen könnte.

Midline-1 ist zudem in den Translationsprozess von mRNAs involviert, die verlängerte CAG-Wiederholungen beinhalten. So ist es maßgeblich beteiligt an der erhöhten Translation von mutiertem Huntingtin-Protein. Mit einer CAG-Anzahl von über 40 Wiederholungen im Exon 1 des Huntingtin-Gens, verursacht es die Huntington-Krankheit, eine neurodegenerative Erkrankung mit später Manifestation, die durch motorische und kognitive Symptome charakterisiert ist. Bisher ist keine Therapie für diese schwere Erkrankung gefunden worden. Es gibt Hinweise darauf, dass das Typ-2-Diabetes-Medikament Metformin in den durch Midline-1 regulierten Translationsprozess von mRNAs mit verlängerten CAG-Wiederholungen eingreift. Da es klinisch bereits bestens erprobt ist, würde es sich als chronische Therapie in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung bestens eignen. Diese Arbeit befasst sich mit dem präklinischen Stadium der Erkrankung in einem Mausmodell mit 150 CAG-Wiederholungen und stellt die Frage, ob Metformin bereits in diesem Krankheitsstadium Wirkung zeigt. *In vitro* und *in vivo* konnte tatsächlich gezeigt werden, dass Metformin die Expression von mutiertem, krankheitsverursachendem

Huntingtin Protein signifikant reduziert. Zusätzlich konnten frühe Krankheitszeichen durch Metforminbehandlung normalisiert werden. Damit ist Metformin ein sehr vielversprechender Kandidat für eine ursächliche, früh beginnende Therapie der Huntington-Krankheit.

Abstract

Mutations in the *Midline-1* gene, coding for the ubiquitin protein ligase Midline-1, causes the Opitz BBB/G syndrome, an embryonic developmental malformation disorder affecting ventral midline structures. Since there is evidence that Midline-1 is involved in neural crest cells proliferation and migration during embryogenesis, this study uses a fetal fibroblast cell line with a 4bp deletion in exon 9 of the *Midline-1* gene and HeLa cells over- or underexpressing *Midline-1* to investigate its role in proliferation and migration. Proliferation showed no difference compared to controls. Migration however was significantly increased in *Midline-1* overexpressing HeLa cells. Fibroblasts and *Midline-1* knockdown only showed tendencies of decreased migration, suggesting a compensatory role for the sister protein Midline-2.

Additionally, Midline-1 is involved in the translational process of mRNAs carrying elongated CAG repeats. Thus, it applicably contributes to the translation of mutant huntingtin protein. With a repeat length over 40 CAGs, the *huntingtin* gene causes Huntington's Disease, a neurodegenerative disease with late onset, affecting motoric and cognitive skills. So far, no curative treatment has been developed for this severe disease. There is evidence that the anti-diabetic drug metformin interferes in the translational process of mRNAs with elongated CAG repeats, controlled by Midline-1. Since it is clinically well approved, it would be suitable for a chronic therapy in a very early stage of the disease. This study deals with the preclinical stage of the disease in a mouse model with 150 CAG-repeats and raises the question, if metformin makes an impact in this early stage. Indeed, *in vitro* and *in vivo* data show that metformin significantly reduces mutated, disease making huntingtin protein. Furthermore, early clinical signs could be normalized after metformin treatment. Therefore, metformin is a promising candidate for a causally, early starting therapy for Huntington's disease.

1. Einleitung

Im Folgenden wird Bezug genommen auf die embryonale Entwicklung des Wirbeltiergehirns. Mutationen im *MID1*-Gen, das für die Ubiquitin-Protein-Ligase Midline-1 (MID1) kodiert, verursachen das Opitz BBB/G-Syndrom (OS, siehe Kapitel 1.2), wobei es sich um eine embryonale Entwicklungsstörung handelt, bei der insbesondere die Entwicklung des Gehirns und hierbei vor allem die Migration von Neuralleistenzellen beteiligt ist. Überdies spielt MID1 eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung der Huntington-Krankheit (engl. Huntington's Disease, HD, siehe Kapitel 1.3), um genauer zu sein bei der Translation des mutierten Proteins. Da es sich bei HD um eine neurodegenerative Erkrankung handelt, wird im Folgenden auch Bezug genommen auf die Funktionen und Interaktionen einiger Gehirnregionen, die bei HD betroffen sind.

1.1 Gehirnentwicklung

Das Wirbeltiergehirn und damit auch das des Menschen beginnt mit drei primären bilateralsymmetrischen Bläschen im anterioren Teil des Neuralrohrs, die sich im vierwöchigen Embryo entwickeln. Diese Bläschen bilden das Vorderhirn (Prosencephalon), das Mittelhirn (Mesencephalon) und das Rautenhirn (Rhombencephalon). In der fünften Woche der menschlichen Embryonalentwicklung bilden sich aus dem Vorderhirn das Endhirn (Telencephalon) und das Zwischenhirn (Diencephalon), das Mittelhirn bleibt per Definition zu diesem Zeitpunkt das Mittelhirn und aus dem Rautenhirn entwickeln sich Hinterhirn (Metencephalon) und Nachhirn (Myelencephalon). Aus Letzterem bilden sich in der weiteren Entwicklung des menschlichen Gehirns das Kleinhirn, die Brücke (Pons) und die Medulla oblongata (zusammengefasst in (Campbell, 2006)).

Das Rautenhirn wird während der embryonalen Entwicklung unterteilt in acht Segmente, die Rhombomere, die von anterior nach posterior als r0 (Isthmus) – r7 bezeichnet werden, und die gefolgt sind von den vier Pseudorhombomeren r8-r11

(Cambroner and Puelles, 2000; Marin and Puelles, 1995). Die topografische Grenze zwischen Mittelhirn und Rautenhirn ist der Isthmus, welcher gleichzeitig ein Signalzentrum bildet, das Signalmoleküle wie z.B. Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8) exprimiert, die wiederum die Struktur und Differenzierung umgebender Gewebe steuern und neuronale Untergruppen spezifizieren (Crossley et al., 1996). FGF8 trennt so z.B. das Orthodenticle Homeobox 2 (OTX2) -exprimierende Mittelhirnepithel vom Gastrulation Brain Homeobox 2 (GBX2) -exprimierenden Hinterhirnepithel (zusammengefasst in (Martinez et al., 2013)). Weitere Gene spielen bei der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze ebenso eine Rolle. *WNT1*, das für das Proto-Oncogene Protein WNT-1 kodiert und in der kaudalen Region des anterioren Hinterhirns exprimiert wird (Adams et al., 2000; Nusse and Varmus, 1992), kontrolliert die *Fgf8*-Expression und reguliert damit Mittel- und Kleinhirnentwicklung (Lee et al., 1997). Weitere Beispiele sind das Gen *EN2*, das für das Homeobox-Protein Engrailed-2 kodiert, sowie die beiden Gene *PAX2* und *PAX5*, die für die beiden Proteine Paired Box Gene 2 und 5 kodieren. Neben weiteren werden diese drei Transkriptionsfaktoren an der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze exprimiert und bilden Gradienten nach rostral und kaudal (Gruss and Walther, 1992; Joyner and Martin, 1987; Pfeffer et al., 2000). Bei der Festlegung der dorso-ventralen Achse spielen vor allem sogenannte Bone Morphogenic Proteins (BMPs) eine Rolle sowie das Gen *Sonic Hedgehog (SHH)*, das für das gleichnamige Protein kodiert (Wurst and Bally-Cuif, 2001).

Das adulte Kleinhirn besteht aus zwei Hemisphären und dem sogenannten Kleinhirnwurm (Vermis cerebelli), der die beiden Hemisphären verbindet. Jede Hemisphäre wird in fünf Hauptlappen unterteilt, den Anterobasal-, Anterodorsal, Zentral-, Posterior- und Inferiorlappen, wobei der Anterobasallappen nochmal in drei Unterlappen unterteilt wird (I-III). Bei der Entwicklung der verschiedenen Lappen spielt wieder *SHH* eine große Rolle, das ab dem Stadium E17 in den Purkinje-Zellen exprimiert wird. Dies fördert die Proliferation der Granular- oder Körnerzellen am zerebralen Cortex, was für die Entwicklung der Haupt- und Unterlappen des

Kleinhirns entscheidend ist (Corrales et al., 2006; Doughty et al., 1998).

1.1.1 Die Entwicklung des Neocortex

Aus dem Telencephalon geht in der späteren Embryogenese der Cortex hervor, der sich phylogenetisch in Neocortex und Allocortex unterteilen lässt. Der Neocortex entwickelt sich vom dritten bis zum siebten Schwangerschaftsmonat und ist durch sechs neuronale Schichten charakterisiert: ventrikuläre Zone (VZ), subventrikuläre Zone (SVZ), intermediäre Zone (IZ), Subplate-Zone (SZ), Cortikalplatte (CP) und Marginalzone (MZ), die später als Layer I-VI bezeichnet werden (Florio and Huttner, 2014; Meyer, 2007). Die VZ ist eine embryonale Gewebeschicht um das Neuralrohr, in der sich embryonale Stammzellen, vor allem radiale Gliazellen (engl. radial glia cells, RGC) (Rakic, 1971) befinden. Sie gilt als Ort der Proliferation; alle hier gebildeten Neurone wandern zu ihrem Bestimmungsort und bauen so konzentrisch das neuronale Gewebe auf (Rakic, 1971, 1972). Hierfür können RGCs durch mehrfache asymmetrische Teilung Neurone bzw. deren Vorläuferzellen bilden, die dann die Fortsätze der RGCs nutzen, um zu migrieren (Noctor et al., 2001; Noctor et al., 2004; Noctor et al., 2008). Zu Beginn der Embryonalentwicklung lässt sich neben der VZ zunächst nur die subpiaie Marginalzone erkennen. Durch die Proliferation neuronaler Stammzellen in der VZ, entstehen postmitotische Neuroblasten, die die VZ verlassen und die IZ bilden (Meyer, 2007). Am Ende der Embryonalentwicklung wandern weitere junge Neurone über die IZ hinaus und generieren unterhalb der MZ die sogenannte Präplatte, welche hauptsächlich Cajal-Retzius-Zellen enthält. Diese produzieren das Glykoprotein Reelin, welches das Ablösen nachfolgender Neurone von den RGCs induziert und damit die neuronale Migration hemmt (Ishii et al., 2016). Anschließend wird die CP gebildet, wobei sich die Präplatte in zwei Komponenten aufteilt: Die Cajal-Retzius-Zellen wandern in die MZ, während der Rest der Präplatte sich unterhalb der CP zur SZ formiert (Meyer, 2007). Somit haben fast alle Neurone ihren Ursprung in der VZ. Während der weiteren Neurogenese wird die VZ als Pool von Neuroblasten zurückgebildet (Dehay and Kennedy, 2007), doch es bildet sich ein neuer Proliferationsort, die SVZ (Campbell, 2003; Sanai et al., 2004). Aus dieser

Zone werden bis zur Geburt neue Neurone gebildet, die in die Peripherie wandern und den Cortex bilden (Abbildung 1). Darüber hinaus ist die SVZ auch postnatal ein Ort der adulten Neogenese (Luskin, 1993).

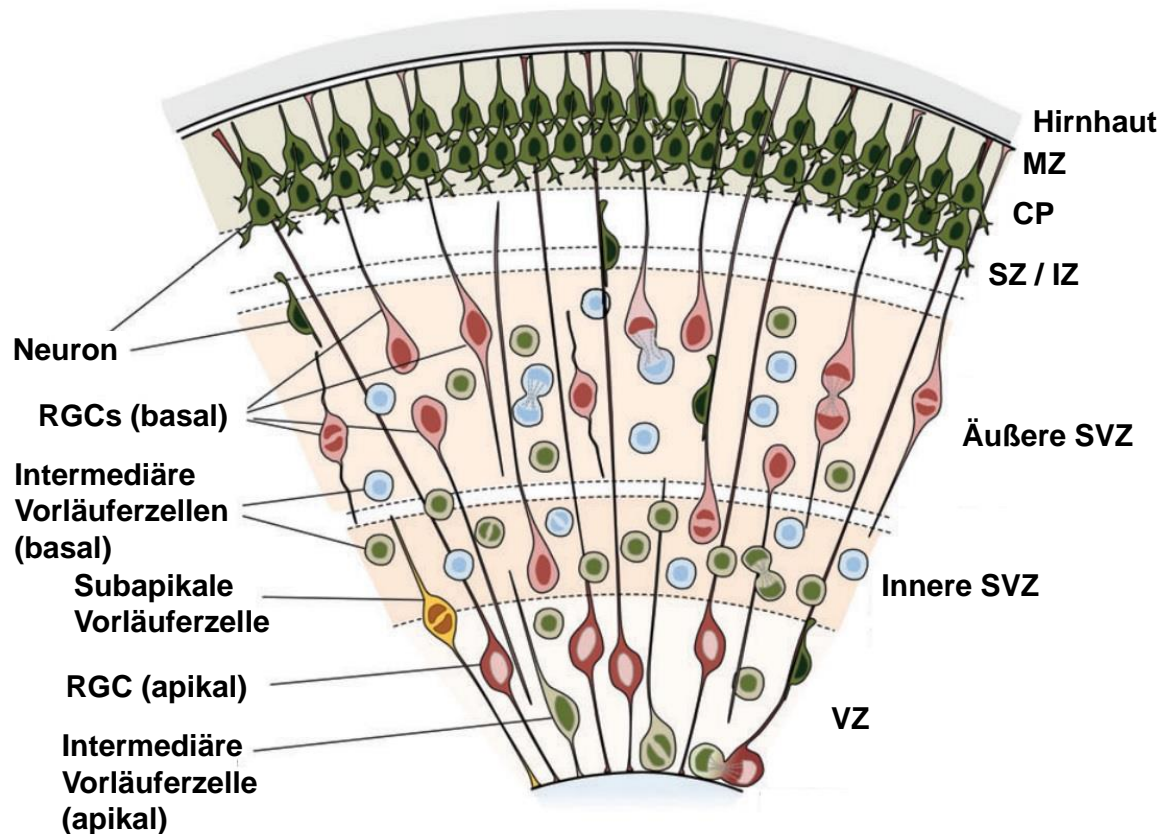


Abbildung 1: Der Neocortex während der Embryonalentwicklung. Dargestellt sind die Organisation der verschiedenen Schichten und die Wanderung der Neurone entlang der RGCs von der VZ bis zur MZ. RGC: Radiale Gliazelle, VZ: Ventrikuläre Zone, SVZ: Subventrikuläre Zone, SZ: Subplate-Zone, IZ: Intermediäre Zone, CP: Corticalplatte, MZ: Marginalzone [bearbeitet nach (Florio and Huttner, 2014)].

1.1.2 Das Striatum

Das Striatum ist Teil der Basalganglien und involviert in Prozesse wie motorische Koordination, Emotionen und Wahrnehmung (Jain et al., 2001). Im Menschen ist es aufgeteilt in den Nucleus caudatus und das Putamen, während es in Mäusen nur als eine einheitliche Struktur vorkommt (zusammengefasst in (Evans et al., 2012)). Das embryonale Telencephalon (siehe Kapitel 1.1.1), welches am rostralen Ende des Neuralrohrs lokalisiert ist, teilt sich in das dorsale Telencephalon (Pallium), aus welchem der Neocortex hervorgeht, und das ventrale Telencephalon (Subpallium), welches unter anderem das Striatum formiert (Jain et al., 2001). Das adulte Striatum unterscheidet sich zwar innerhalb der Säugerspezies, jedoch ist die ursprüngliche Aufteilung des Telencephalons vergleichbar (Fernandez et al., 1998; Puelles et al., 2000). Das Subpallium teilt sich aufgrund von Migration der postmitotischen Neurone weiter in das Septum sowie die medialen und lateralen ganglionären Eminenzen (engl. lateral/medial ganglionic eminences, LGE/MGE). Aus dem MGE geht die Amygdala und das Pallidum hervor und aus dem LGE der Nucleus caudatus und das Putamen (Deacon et al., 1994; Sturrock, 1980). In den Proliferationszonen (VZ/SVZ) des ventralen Telencephalons werden Projektionsneurone, wie die Medium spiny neurons (MSNs) und γ -Aminobuttersäure (engl. γ -aminobutyric acid, GABA) produzierende (GABAerge) Interneurone generiert, die dann zu ihrem Bestimmungsort migrieren (siehe Kapitel 1.1.1). Etwa 90% der Neurone, die in den Proliferationszonen der LGE entstehen sind Projektionsneurone und formen das Striatum. Interneurone der LGE bilden den Cortex, den Bulbus olfactorius (Riechkolben) und einen weiteren Teil des Striatums, während jene Neurone der MGE den Cortex, das Pallidum und ebenfalls das Striatum bilden (Anderson et al., 1997; Campbell et al., 1995; Olsson et al., 1998).

Das Striatum gilt als Eingangsstation der Basalganglien und erhält quantitativ den größten Input vom Cortex (Kunzle, 1975; Parent and Cicchetti, 1998; Van Hoesen et al., 1981). Es wird angenommen, dass quasi alle Teile des Neocortex das dorsale Striatum innervieren, wobei es hierbei natürlich unterschiedlich starke Ausprägungen

gibt (Gimenez-Amaya, 1991). Das ventrale Striatum erhält Projektionen vornehmlich aus Amygdala, Hippocampus und präfrontalem Cortex (Britt et al., 2012; French and Totterdell, 2002).

Das adulte Striatum setzt sich aus diversen Zelltypen zusammen. Wie bereits erwähnt, sind die meisten striatalen Zellen sogenannte MSNs. Diese sind GABAerge Neurone und sind somit inhibitorischer Natur. Sie haben zwei mögliche charakteristische Typen: Typ-D1-MSNs, die monosynaptisch direkt zu den Basalganglien projizieren und den Dopaminrezeptor 1 exprimieren sowie Typ-D2-MSNs, die indirekt über das Pallidum und den Nucleus subthalamicus zu den Basalganglien projizieren und den Dopaminrezeptor 2 exprimieren (Gerfen and Surmeier, 2011; Wall et al., 2013). Es wird angenommen, dass die Erregungsweiterleitung dieser beiden MSN-Typen gegensätzliche Effekte haben. Während die Aktivierung der Typ-D1-MSNs in einer exzitatorischen Weiterleitung auf den Thalamus und einem positiven cortikalen feedback loop resultieren, führt die Aktivierung der Typ-D2-MSNs zu einer inhibitorischen Weiterleitung auf den Thalamus und zu einem negativen cortikalen feedback loop (Albin et al., 1989; Calabresi et al., 2014; Deniau and Chevalier, 1992; Gerfen et al., 1982; Gerfen and Surmeier, 2011).

Ein wesentlicher Bestandteil der Funktion des Striatum sind die striatofrontalen (oder frontostriatalen) Regelkreise oder Schleifen. Hierbei ist der wichtigste Output des Striatums der Thalamus (Allen and Tsukahara, 1974; Evarts and Thach, 1969), der über die Ausgangsstationen der Basalganglien, der Substantia nigra und des Pallidums, innerviert wird und dann die Informationen zum Cortex, primär zum präfrontalen Cortex zurückleitet (Tekin and Cummings, 2002). Das Pallidum liegt anatomisch in zwei Teilen vor: der innere Globus pallidus medialis (GPM) und der äußere Globus pallidus lateralis (GPL). Wie bereits erwähnt gibt es eine direkte, exzitatorische oder erregende Verbindung zwischen Striatum und den Ausgangsstationen der Basalganglien über die Substantia nigra und den GPM und eine indirekte, inhibitorische oder hemmende Verbindung über den GPL. Striatum,

substantia nigra und GPM sind GABAerg, somit hemmt das Striatum die hemmenden Projektionen der Substantia nigra und des GPMs, was zu einer Erregung des Thalamus führt und somit zur Erregung des Cortex. Bei der indirekten Projektion hemmt das Striatum den GPL, das eigentlich den Subthalamus hemmt. Dieser ist dadurch jedoch erregt und wirkt nun exzitatorisch auf den GPM und somit indirekt inhibitorisch auf den Thalamus, was zu einer inhibierenden Wirkung auf den Cortex führt (Abbildung 2) (Alexander et al., 1990).

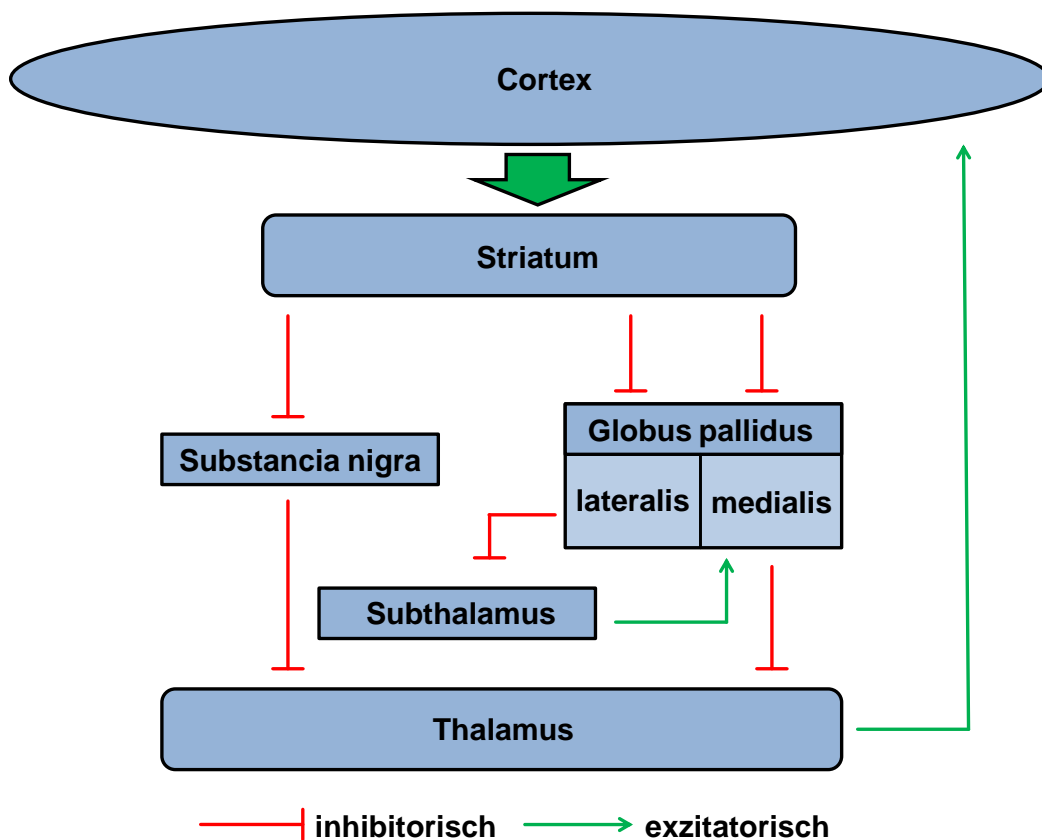


Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung der striatofrontalen Schleifen. Direkte und indirekte Verschaltungen ermöglichen exzitatorische oder inhibitorische Signale zum Cortex.

Die Rolle der striatofrontalen Schleifen ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird diskutiert, dass sie für die Aktionsauswahl (actions selection; what to do next) und

das bestärkende Lernen (reinforcement learning) wichtig sind. Bei der Aktionsauswahl generiert der frontale Cortex mögliche Aktionen und leitet diese an das Striatum weiter, welches eine dieser Aktionen selektiert, indem es andere inhibiert und dadurch die Durchführung der ausgewählten Aktion erlaubt (Seo et al., 2012). Beim bestärkenden Lernen werden gemachte Fehler dafür verwendet, ein vorhandenes Belohnungssignal zu optimieren (Schonberg et al., 2007). Weiterhin spielen diese Schleifen eine Rolle bei emotionaler Verarbeitung und zielgerichtetem Verhalten, Anpassung an Veränderungen, Selbstachtung oder Entscheidungsfindung (Chavez and Heatherton, 2015; Chudasama and Robbins, 2006; Guimaraes et al., 2008) und ebenso bei Aufmerksamkeit und der damit zusammenhängenden Augenbewegungskontrolle. Eine Störung der Schleifen kann mit Defiziten in der Sakkadenkontrolle bei autistischen Patienten in Kontext stehen (Takarae et al., 2007). Weitere Krankheiten, die aus Störungen der striatofrontalen Schleifen resultieren sind Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, HD, Schizophrenie, Depression, Zwangsstörungen und Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (Alexopoulos, 2005; Chudasama and Robbins, 2006; Riley et al., 2011).

1.1.3 Der Hippocampus

Der Hippocampus bildet den größten Teil des Allocortex, der aus phylogenetischer Sicht die älteste Struktur des Telencephalons darstellt und im Gegensatz zum Neocortex nur aus drei Schichten besteht. Er ist Teil des limbischen Systems (Mac, 1949) und besteht je nach Definition nur aus Cornu Ammonis (Ammonshorn) (Bähr, 2009), als hippocampale Formation zusätzlich aus Gyrus dentatus und Subiculum (Knowles, 1992) oder als hippocampaler Komplex zusätzlich aus Gyrus parahippocampalis (Anderson, 2007; Moscovitch et al., 2005). Er lässt sich unterteilen in drei bis vier Ammonshornregionen (wieder je nach Nomenklatur), die als CA1-CA3 (CA4) bezeichnet werden (Bähr, 2009; El-Falougy and Benuska, 2006).

Seine primären Afferenzen erhält der Hippocampus durch den entorhinalen Cortex, der wiederum von sehr vielen, vor allem aber neocortikalen Hirnregionen innerviert

wird. Durch den sogenannten Tractus perforans projiziert der entorhinale Cortex zu den Körner- oder Granularzellen des Gyrus dentatus (Witter et al., 2000), aber auch zu anderen Regionen der hippocampalen Formation (Vago and Kesner, 2008). Im Gyrus dentatus findet, neben dem Bulbus olfactorius und dem Neocortex, auch im adulten Gehirn Neurogenese statt, deren Entdeckung das frühere Bild vom statischen Gehirn obsolet machte (Altman, 1962; Eriksson et al., 1998; Gould, 2007). Die hippocampale adulte Neurogenese wurde unlängst kontrovers diskutiert (Boldrini et al., 2018; Sorrells et al., 2018).

Vom Gyrus dentatus leiten Körnerzellen meist unidirektional die Erregung über ihre unmyelinisierten Axone, die hier als Moosfasern bezeichnet werden, zu den Dendriten der Pyramidenzellen des CA3. Von hier wird der CA1 innerviert über die sogenannten Schaffer-Kollateralen. Axone des CA1 projizieren nun über das Subiculum wieder zurück zum entorhinalen Cortex und schließen den sogenannten trisynaptischen Schaltkreis (Amaral and Witter, 1989; Andersen et al., 1971). Als temporoammonische Bahn ist zusätzlich noch eine direkte Verbindung vom entorhinalen Cortex zum CA1 bekannt (Dvorak-Carbone and Schuman, 1999). Die Hippocampi beider Hemisphären stehen über die Commissura hippocampi miteinander in Verbindung. Obwohl der quantitativ größte Anteil glutamaterge Pyramidenzellen darstellt, enthält der Hippocampus auch ein Netzwerk aus GABAergen Interneuronen (Anderson, 2007; Kasugai et al., 2010).

Der Hippocampus spielt eine wesentliche Rolle bei Gedächtnisprozessen. Er ist notwendig für das räumliche Gedächtnis und die Orientierung (Burgess, 2008; Ekstrom et al., 2003) sowie für Sprach- und Lernfähigkeit (Helmstaedter et al., 1997; Milner, 1972) oder die Detektion neuartiger Stimuli (Grunwald et al., 1998; Nyberg, 2005). Bei der Gedächtnisbildung spielt die synaptische Plastizität eine tragende Rolle. Der Begriff wurde in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts geprägt, als gezeigt wurde, dass das Gehirn nicht statisch, sondern plastisch, also veränderbar ist, auch im Erwachsenenalter (Rakic, 2002). Synaptische Plastizität beschreibt die Fähigkeit von Synapsen, ihre Transmissionseffektivität zu modifizieren, was in einer

Erhöhung oder Erniedrigung ihrer Aktivität resultiert (Bennett et al., 1964; Hughes, 1958). Oft geht dieser Vorgang mit einer Veränderung der Anzahl von postsynaptischen Neurotransmitterrezeptoren einher (Gerrow and Triller, 2010). Es gibt die Kurzzeitform der synaptischen Plastizität, welche die Paired-Pulse Facilitation beinhaltet, die nur einige Millisekunden anhält und die post-tetanic Potentiation, die mehrere Minuten andauern kann. Die Langzeitform der synaptischen Plastizität beinhaltet die Langzeitpotenzierung (engl. long-term potentiation, LTP) und die Langzeitdepression (engl. long-term depression, LTD), durch die sich eine andauernde Erhöhung oder Erniedrigung der synaptischen Aktivität etabliert, die Stunden oder sogar länger anhalten kann (Anderson, 2007). Zuerst wurde LTP in den Synapsen zwischen Tractus perforans und Körnerzellen im Hippocampus des Kaninchens entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass eine hoch frequentierte Stimulation auf die präsynaptischen Nervenfasern des entorhinalen Cortex, eine länger anhaltende postsynaptische Erregung hervorrief, als eine einzelne Stimulation (Bliss and Lomo, 1973). Weitere Studien im Tractus perforans und den Schaffer-Kollateralen konnten zeigen, dass LTP die Aktivierung des ionotropen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) -Rezeptors voraussetzt. Unter dem Ruhemembranpotential sind die NMDA-Rezeptoren für extrazelluläre Kationen geschlossen. Ein gering frequentierter Reiz resultiert daher in einer α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) -Rezeptor vermittelten Erregung (Collingridge et al., 1983; Davies and Collingridge, 1989). Bei hoch frequentierter Stimulation und der damit einhergehenden erhöhten Glutamat-Ausschüttung, kommt es durch den Na^+ -Einstrom durch die postsynaptischen AMPA-Rezeptoren zu einer anhaltenden Depolarisation der postsynaptischen Membran, was die NMDA-Rezeptoren nun ebenfalls öffnet, sodass der resultierende Ca^{2+} -Einstrom zur postsynaptischen Leitfähigkeit beiträgt (Cooke and Bliss, 2006). Die gleichzeitige Erregung prä- und postsynaptischer Neurone deutet auf eine besonders häufig genutzte Verschaltung hin. LTP und NMDA-Rezeptoren spielen dementsprechend eine tragende Rolle bei der Induktion von synaptischer Plastizität und den Mechanismen für Lernen und Gedächtnis (Rebola et al., 2010).

Vor diesem Hintergrund ist der Hippocampus Gegenstand aktueller Forschung in Zusammenhang mit hippocampalen Schäden und damit assoziierten kognitiven Defiziten bei Krankheiten wie zum Beispiel HD (Rosas et al., 2003). Die progressiven Folgen der Krankheit und der möglichen Konsequenzen auf die synaptische Plastizität und des Gedächtnisses bzw. die Reduzierung von LTP wurden bereits vielfach untersucht und stehen in Zusammenhang mit kognitiven Phänotypen im HD-Mausmodell (Lynch et al., 2007; Murphy et al., 2000; Simmons et al., 2009; Usdin et al., 1999).

1.2 Das Opitz BBB/G-Syndrom (OS)

Das Opitz BBB/G-Syndrom (OS) ist ein Mittelliniendefekt, der 1969 von John Opitz erstmals beschrieben wurde als zwei unterschiedliche Krankheitsbilder, das BBB Syndrom mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte und mentaler Retardierung (Opitz J., 1969b) und das G Syndrom mit gastrointestinalen Fehlbildungen (Opitz J., 1969a). Aufgrund der überlappenden Phänotypen, wurde später festgestellt, dass es sich um dieselbe Krankheit handelt und eine Reklassifizierung fasste das Krankheitsbild zum Opitz BBB/G-Syndrom zusammen (Cordero and Holmes, 1978). Beim OS handelt es sich um eine heterogene Krankheit, die durch Defekte bei der embryonalen Entwicklung der ventralen Mittellinie entsteht. Die klinische Variabilität der Phänotypen ist groß, sogar bei Geschwistern, die die gleiche Mutation tragen. Beschriebene Symptome sind u.a. Hypertelorismus, Hypospadie, Laryngo-Tracheo-Ösophagus-Defekte, Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, Herzfehler, Agenesie oder Hypoplasie des Kleinhirnwurms oder des Corpus callosums (Hirnbalken) oder motorische sowie kognitive Entwicklungsstörungen (Fontanella et al., 2008).

Aus genetischer Sicht gibt es zwei Ursachen für das OS mit einem X-chromosomal-rezessiven (Xp22) und einem autosomal-dominanten Erbgang auf Chromosom 22q11.2 (Robin et al., 1995). Aus klinischer Sicht können die beiden Ursachen nicht unterschieden werden. Während die Ursache der X-chromosomalen Form der Krankheit schon länger bekannt war, konnten unlängst auch Mutationen im Gen

SPECC1L auf 22q11.2 identifiziert werden, die mit Patienten mit der autosomal-dominanten Form von OS assoziiert sind (Kruszka et al., 2015). Es bleibt jedoch unklar, ob Mutationen in diesem Gen die einzige Ursache für die autosomal-dominante Form von OS ist.

Die X-chromosomale Form von OS ist gut untersucht. Es konnten bereits eine Reihe von Mutationen auf dem *Midline-1*-Gen (*MID1*) identifiziert werden, die mit der Krankheit assoziiert sind, darunter Missense- und Nonsense-Mutationen sowie Frameshift- und Spleiß-Mutationen, aber auch Exon-Deletionen, -Duplikationen und sogar ganze Gen-Deletionen. Neben der Annahme, dass Mutationen zu einem Funktionsverlust (loss-of-function) des Proteins führen, ist es auch möglich, dass sie zu einem Funktionsgewinn (gain-of-function) führen. So könnten Patienten mit Gehirnfehlbildungen, die eine carboxy(C)-terminale Mutation im *MID1*-Gen tragen, ein verkürztes MID1-Protein generieren (Fontanella et al., 2008), das möglicherweise toxische Eigenschaften besitzt. Es konnten bereits neuronale Migrationsdefekte durch Überexpression (ÜE) von C-terminal verkürztem Mid1 in Mäusen mit *Mid1*-Knockout (KO) festgestellt werden (Lu et al., 2013). Dennoch scheint ein Funktionsverlust durch *Mid1*-Mutationen wahrscheinlicher, da sich Gehirnfehlbildungen bei KO-Mäusen, bei denen das gesamte Gen deletiert ist, nur dadurch erklären lassen.

1.2.1 Das *Midline-1*-Gen (*MID1*)

Das *MID1*-Gen liegt auf Chromosom Xp22.2, umfasst ca. 400kb genomischer Sequenz, besteht aus neun kodierenden Exons und mehrerer alternativ gespleißter Exons (Winter et al., 2004), durch die eine regulatorische Expression des *MID1*-Gens stattfinden kann. Des Weiteren wird die Expression von *MID1* durch mindestens fünf Promotorregionen gesteuert, welche verteilt sind auf einen Bereich von 250kb. Diese generieren Transkripte mit alternativen 5'untranslatierten Regionen (5'UTRs). Eine gewebespezifische Expression wird zusätzlich durch alternative Polyadenylierung

ermöglicht (Winter et al., 2007).

1.2.2 Das Midline-1-Protein (MID1)

Das *MID1*-Gen kodiert für das 72 kDa große MID1-Protein, das der sogenannten RING (Really Interesting New Gene) –Finger-Familie angehört (Quaderi et al., 1997). Das MID1-Protein besteht zunächst aus dem RBCC-Motiv, dem RING-Finger, zwei B-Boxen und einer Coiled-Coil-Domäne. Die amino(N)-terminale RING-Finger-Domäne ist durch das Cys-His-Motiv Cys-X₂-Cys-X₁₁-Cys-X-His-X₂-Cys-X₂-Cys-X₂₂-Cys-X₂-Cys gekennzeichnet. X kann hierbei jede beliebige Aminosäure sein. RING-Finger-Domänen spielen bei der Proteininteraktion eine große Rolle, wie zum Beispiel DNA- (Lovering et al., 1993), RNA- (Elenbaas et al., 1996) oder Proteinbindung (Wu et al., 1996) und finden sich besonders häufig auf Ubiquitin-Ligasen (Joazeiro and Weissman, 2000).

Die B-Box-Domänen weisen ebenfalls Cys-His-Motive auf (Cys-X₂-His-X₇-Cys-X₇-Cys-X₂-Cys-X₅-His-X₂-His) und sind auch an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. So interagiert beispielsweise die B-Box1 des MID1-Proteins mit dem α 4-Protein (Trockenbacher et al., 2001), das als regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (PP2A) fungiert.

Die Coiled-Coil-Domäne von MID1 spielt eine Rolle bei der Homodimerisation von MID1 (Cainarca et al., 1999) und der Heterodimerisation von MID1 mit dem Schwesterprotein Midline-2 (MID2) (Short et al., 2002).

C-terminal besteht MID1 aus einer Fibronectin type III-Domäne (FNIII) sowie einer B30.2-Domäne. FNIII-Domänen sind ebenfalls in Protein-Protein-Interaktionen involviert (Bork et al., 1994). Mutationen in C-terminalen Domänen führen zur Dissoziation des MID1 Proteins von den Mikrotubuli. Gelöstes MID1 kann dann im Cytosol aggregieren (Schweiger et al., 1999).

Mit seinem C-terminalen Ende bindet MID1 an Mikrotubuli und kann entlang dieser transportiert werden (Aranda-Orgilles et al., 2008a; Schweiger et al., 1999). Die sich am C-terminalen Ende befindliche B30.2-Domäne spielt hierbei eine Rolle.

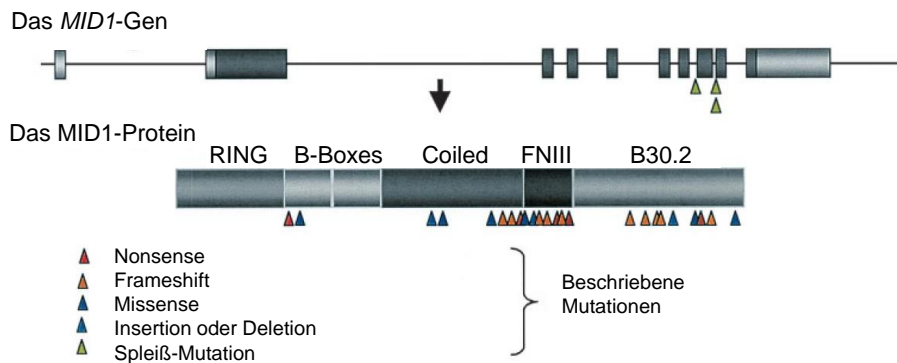


Abbildung 3: Schematische Darstellung des *MID1*-Gens und MID1-Proteins und der bisher bekannten Mutationen [nach (Schweiger and Schneider, 2003)].

Wie schon erwähnt, wurden bereits zahlreiche Mutationen im *MID1*-Gen beschrieben, die über das gesamte Gen verteilt sind, mit Ausnahme der RING-Finger-Domäne. Die meisten gefundenen Mutationen jedoch (68%) befinden sich im C-terminalen Bereich (Schweiger and Schneider, 2003) (Abbildung 3).

Mithilfe von green fluorescent protein (GFP) –gekoppelten ÜE-Experimenten konnte gezeigt werden, dass MID1 in der Zelle an Mikrotubuli assoziiert ist. Durch *in-vitro*-Mutagenese wurden die Auswirkungen diverser Mutationen untersucht. Liegt eine Mutation im C-terminalen Bereich des MID1-Proteins vor, assoziiert es nicht mit Mikrotubuli, sondern aggregiert im Cytoplasma, was den Schluss nahe legt, dass es über den C-Terminus an die Mikrotubuli bindet.

PP2A ist eine wichtige Serin/Threonin-Phosphatase, die ubiquitär exprimiert und evolutionär stark konserviert ist. Deletionen in der katalytischen Untereinheit PP2Ac führen zu einem letalen Phänotyp in Hefen und Mäusen (Gotz et al., 1998; Kinoshita

et al., 1996). PP2Ac assoziiert an die Untereinheiten A und B. Das so gebildete Heterotrimer dephosphoryliert nun eine große Anzahl an Substraten in der Zelle. Substrat-Spezifität wird durch die unterschiedlichen regulatorischen B-Untereinheiten reguliert. Bindet die regulatorische Untereinheit $\alpha 4$ an PP2Ac, wird deren Aktivität reduziert (Nanahoshi et al., 1999).

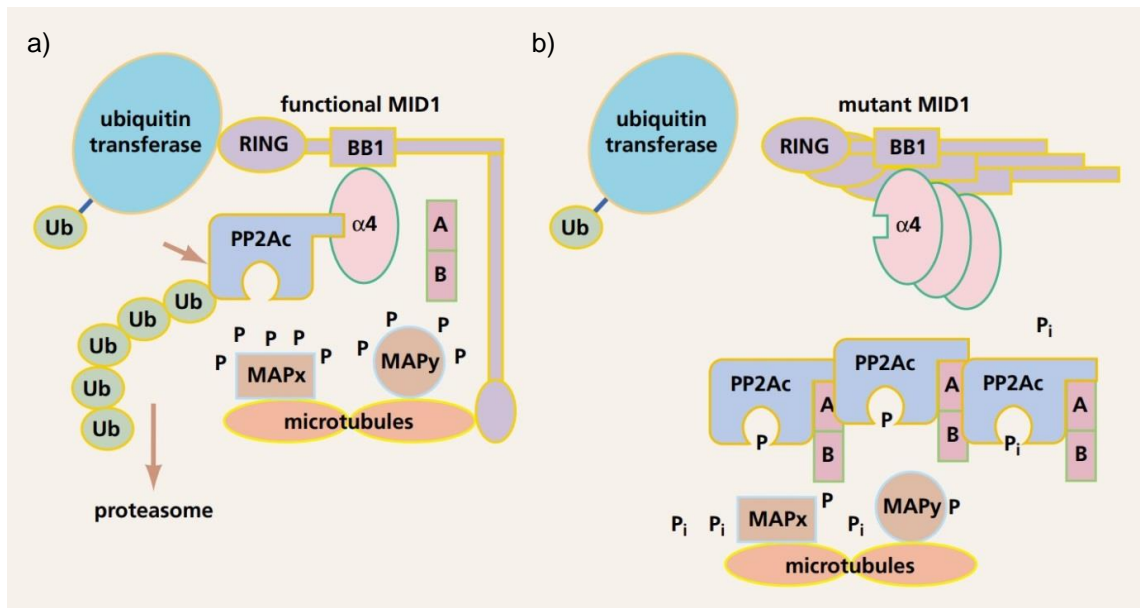


Abbildung 4: Modell der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von MID1 und deren Wirkung auf PP2A bei a) funktionellem Protein und b) mutiertem Protein [nach (Trockenbacher et al., 2001)].

MID1 ist eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase (Liu et al., 2001; Trockenbacher et al., 2001). Mit seiner B-Box 1 bindet es an $\alpha 4$ und katalysiert damit die Polyubiquitinierung und somit die proteasomale Degradierung der katalytischen Untereinheit PP2Ac (Abbildung 4). Hierfür wird zunächst Ubiquitin durch das aktivierende E1-Enzym mit Hilfe von ATP adenyliert. Dadurch kommt es zu einer kovalenten Bindung durch eine Thioesterbindung zwischen Ubiquitin und E1. Dann wird das aktivierte Ubiquitin auf das E2-konjugierende Enzym übertragen. Schließlich überträgt eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase das Ubiquitin durch eine Isopeptidbindung auf den Lysinrest des Zielproteins oder auf ein bereits vorhandenes Ubiquitin. Eine so angehängte Mono- oder Polyubiquitinierung markiert das Zielprotein zum

proteasomalen Abbau.

Weiterhin initialisiert MID1 die proteasomale Degradierung von Fused (Fu) (Schweiger et al., 2014) und PAX6 (Pfaffmann et al., 2016) und spielt damit u.a. auch eine Rolle bei der Regulierung der shh-Signalkaskade und in der Entwicklung des visuellen Systems.

Durch Inhibierung der Aktivierung von PP2A durch das MID1 Protein, wird die Aktivität von mechanistic target of rapamycin (mTOR) erhöht, bzw. die Bildung von mTORC1 (mTOR Complex 1) gesteigert. Dieser Komplex besteht aus mTOR, mammalian lethal with SEC13 protein 8 (mLST8) und regulatory-associated protein of mTOR (raptor) und ist beteiligt an der Phosphorylierung diverser Substrate durch die Kinaseaktivität von mTOR. mTORC1 spielt eine Rolle bei der Regulation der Translation und anderen wichtigen zellulären Prozessen. Besonders von Bedeutung sind die mTOR-Substrate eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) und 40S ribosomal S6 kinase (S6K), die beide in den Translationsstart involviert sind (besprochen in (Sengupta et al., 2010)). Folgerichtig führt die Fehlfunktion von MID1 durch Mutationen zu einer Erhöhung der PP2A-Aktivität und damit zu einer Herunterregulierung von mTORC1 (Liu et al., 2011).

1.2.3 OS ist eine Neurokristopathie

Einige für das OS typische Fehlbildungen betreffen Gewebe oder Organe, die von den Neuralleistenzellen abstammen. Diese sind pluripotente Stammzellen, die während der Neurulation nach Einstülpung des Ektoderms und Ausbildung des Neuralrohrs entstehen. Durch Zusammenschluss der beiden Wülste des sich schließenden Neuralrohres entsteht die Neuralleiste, deren Zellen sich durch Migration in der Peripherie im Embryo verteilen und an verschiedensten Stellen im Embryo differenzieren und so unterschiedliche Strukturen bilden. Hierfür durchlaufen sie den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition, einer genetischen Umstrukturierung der Zelle, bei der Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin

herunterreguliert werden und Zellkontakte und damit epitheliale Eigenschaften verloren gehen. Dadurch kann die Neuralleistenzelle wandern, um an anderer Stelle wieder ihre epithelialen Eigenschaften aufzunehmen oder zu anderen Zellen zu differenzieren (Kalluri and Weinberg, 2009). Anomalien der Neuralleistenenwicklung nennt man Neurokristopathien. Diese können kraniofaziale Dysmorphien, wie sie beim OS beobachtet werden, zur Folge haben, als Konsequenz eines Defektes der kranialen Neuralleistenzellenmigration, -proliferation oder -differenzierung. Es ist unklar, in welchen dieser Prozesse MID1 involviert ist. Eine Schwierigkeit die Funktion von murinem Mid1 zu untersuchen, besteht darin, dass in *Mid1*-KO Mäusen bisher keine Symptome der Neurokristopathie beobachtet wurden (Lancioni et al., 2010; Lu et al., 2013), wobei hierfür eine Kompensation des fehlerhaften Mid1-Proteins durch das Geschwisterprotein Mid2 verantwortlich sein könnte.

Generell ist nicht bekannt, ob oder wie stark die Funktion von Mid1 konserviert ist. In Hühnern konnte gezeigt werden, dass cMid1 in migrierenden Neuralleistenzellen des Rhombomers r2 früh exprimiert wird, jedoch nicht in denen von r4 und r6. Durch die Expression eines dominant-negativen Konstrukts von cMid1 wurde das Migrationsverhalten von r2 unterdrückt, wobei die Expression eines wildtypischen (wt) -cMid1 in r4 die Migration beschleunigte (Latta and Golding, 2012). Außerdem ist bekannt, dass cMid1 die Expression von Snail reguliert, einem Transkriptionsfaktor, der die epithelial-mesenchymale Transition initiiert (Granata and Quaderi, 2003). Diese Migrationsdefizite, bedingt durch Mid1, könnten eine Erklärung für die kraniofazialen Dysmorphien liefern, unter denen OS Patienten leiden.

In hemizygoten *MID1*^{-y}-Mäusen (männliche Mäuse, deren einzige Kopie von Mid1 entfernt ist) entwickeln sich die Kleinhirnlappen fehlerhaft, insbesondere die Entwicklung des Anterobasallappens ist abnormal und so kommt es zu Fehlbildungen in den Unterlappen I-III sowie zur Hypoplasie des Kleinhirnwurms (siehe Kapitel 1.1) (Lancioni et al., 2010)). Dieses Phänomen ist bereits in pränatalen Stadien zu beobachten und zusätzlich sind auch Strukturen des angrenzenden Mittelhirns betroffen, was vermuten lässt, dass MID1 in der Maus für die Definierung der

Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze nötig ist.

Fgf8 wird früh im Mausembryo des Isthmus' exprimiert und trennt das *Otx2*-exprimierende Mittelhirnepithel vom *Gbx2*-exprimierenden Hinterhirnepithel (besprochen in (Martinez et al., 2013)). Zusätzlich wird *fibroblast growth factor 17* (*Fgf17*) im Isthmus exprimiert; diese Expression ist auch noch in späteren embryonalen Stadien nachzuweisen (Xu et al., 2000). *Mid1* reguliert die Expression von *Fgf8* im Primitivstreifen (Hensen's node) in Hühnern (Granata and Quaderi, 2003), allerdings nicht im murinen Isthmus von *MID1^{-ly}*-Mäusen; hier wurden keine Expressionsunterschiede gefunden. Trotzdem wird in diesen Mäusen eine Reduktion von *Fgf17* beobachtet. Der funktionelle Zusammenhang zum *Mid1*-KO ist hier noch unklar.

1.3 Die Huntington-Krankheit (HD)

HD ist eine autosomal-dominant vererbte, neurodegenerative Polyglutaminerkrankung, die, früher als Veitstanz bekannt, 1872 von dem New Yorker Arzt George Huntington beschrieben wurde (Huntington, 2003). Die Krankheit hat eine weltweit durchschnittliche Prävalenz von 2,71:100.000, wobei sie für Europa, Nordamerika und Australien bei 5,7:100.000 und für Asien nur bei 0,4:100.000 liegt (Pringsheim et al., 2012). Die Symptome der Krankheit entwickeln sich progressiv und treten durchschnittlich im Alter von 30-50 Jahren erstmals auf. Sie reichen von unwillkürlichen Bewegungen (Chorea), generellen Bewegungsstörungen und Rigidität (Steifigkeit, Starrheit), über psychiatrische Störungen wie z.B. Stimmungsschwankungen und Depressionen bis hin zu Demenz (Montoya et al., 2006). In der Regel beginnen die Symptome mit Dystonie an Fingern und Zehen sowie den Gesichtsmuskeln, aber auch anderen Muskelgruppen. Später kommen dann choreatische, unwillkürliche Bewegungen hinzu, was insgesamt zu einer abnormen Körperhaltung führt (Sturrock and Leavitt, 2010).

Bei Polyglutaminerkrankungen kommt ein sich wiederholendes Basentriplett (repeat),

CAG, das für die Aminosäure Glutamin kodiert, pathologisch häufiger vor als bei gesunden Menschen. 1991 wurde die erste Assoziation zwischen der Länge von CAG-repeats und einer neurodegenerativen Erkrankung beschrieben (La Spada et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass die spinale und bulbuläre Muskelatrophie mit einem pathologisch langen CAG-repeat im *Androgen Rezeptor*-Gen assoziiert ist. In den folgenden Jahren konnten weitere mit CAG-repeats assoziierte Krankheiten identifiziert werden: Die spinocerebelläre Ataxie Typ 1, 2, 3, 6, 7 und 17, die dentatorubral-pallidoluyische Atrophie und HD. Das für HD ursächliche CAG-repeat liegt im *Huntingtin*-Gen (*HTT*), von dem das zuvor identifizierte Transkript ursprünglich *important transcript 15* genannt wurde (Group, 1993). Es ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (p16.3) lokalisiert, ist ca. 180kb lang, enthält 67 Exons und kodiert für das gleichnamige Protein (Ambrose et al., 1994; Hoogeveen et al., 1993). In Exon 1 befindet sich ein CAG-Basentriplett, das sich in gesunden Individuen bis zu 36 mal wiederholt. Ab einer Sequenzwiederholung von 40 CAG-repeats hat die Krankheit eine Penetranz von 100%; der Genotyp führt also im Laufe des Lebens sicher zur Ausbildung der Krankheit. Zwischen 36-39 repeats ist keine definitive Prognose für die Krankheitsentwicklung möglich, die Patienten könnten die Krankheit entwickeln oder aber auch nicht (Clabough, 2013). Das Manifestationsalter und der Schweregrad der Krankheit sind hierbei antiproportional zur Länge der repeats (Duyao et al., 1993).

Da mutiertes HTT (mutHTT) nicht nur im zentralen Nervensystem vorkommt, ist HD zudem mit einer Vielzahl von anderen Veränderungen assoziiert. Veränderung zellulärer Prozesse wie Autophagie, Gentranskription und Energiestoffwechsel führen zu Muskelschwund, Gewichtsverlust und Appetitlosigkeit sowie erhöhten Kortisolspiegeln und erniedrigten Testosteronwerten (Morea et al., 2017; Petersen and Bjorkqvist, 2006; Saleh et al., 2009; Sathasivam et al., 1999). Außerdem konnte ein Zusammenhang mit der Entwicklung von Diabetes mellitus hergestellt werden (Farrer, 1985; Podolsky et al., 1972), was auch im Mausmodell beobachtet werden konnte (Andreassen et al., 2002; Bjorkqvist et al., 2005; Hurlbert et al., 1999).

1.3.1 Das Huntingtin-Protein (HTT)

Die Masse des HTT-Proteins hängt von der Anzahl der Glutaminreste ab, wird aber meist mit 348kDa angegeben. Über die Funktion von Wildtyp-*HTT* (*wtHTT*) ist nicht viel bekannt, außer dass es ubiquitär cytoplasmatisch exprimiert wird und eine bedeutende Rolle im Gehirn und besonders für dessen pränatale Entwicklung spielen muss. Es wird verstärkt im Gehirn exprimiert (DiFiglia et al., 1995; Sharp et al., 1995), vor allem im Cortex und Cerebellum (Gutekunst et al., 1995). Die Expressionsverteilung von *HTT* führte bereits zu der Annahme, dass es möglicherweise die Rolle eines Haushaltsgens, also eines nicht-regulierten und konstitutiv exprimierten Gens in neuronalem Gewebe spielt. Auf subzellulärer Ebene wurde das Genprodukt von *HTT* in neuronalen Zellkörpern, Dendriten und Axonen, jedoch nicht im Zellkern detektiert (Sharp et al., 1995). Aufgrund der Assoziation an Mikrotubuli und Vesikeln sowie der Lokalisation an Dendriten wird weiterhin spekuliert, dass das HTT-Protein eine Rolle beim Transport von intrazellulären Proteinen und Mitochondrien, der Stabilisierung des Zytoskeletts und bei der synaptischen Signalübertragung spielt (DiFiglia et al., 1995; Gutekunst et al., 1995; Hoffner et al., 2002). Zudem reguliert es die Expression von brain-derived neurotrophic factor (BDNF), einem Neurotrophin, das von kortikalen Neuronen produziert wird und essentiell für das Überleben von striatalen Neuronen ist. Ist HTT mutiert, wird die Expression von BDNF herunterreguliert, sodass striatale Neurone absterben, was einen wichtigen Einfluss auf die Krankheitsentwicklung hat (Zuccato et al., 2001).

Die Ursache von HD liegt vermutlich in der Toxizität aufgrund einer Verstärkung der Genaktivität (gain-of-function) des mutierten Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass in heterozygoten Individuen die mRNA beider Allele (*wtHTT* und *mutHTT*) vorlagen, also die Transkription des WT-Allels nicht beeinträchtigt wurde. Mäuse, in denen *Htt* homozygot deletiert war, starben noch im Embryoalter (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Daher gilt ein Funktionsverlust des mutierten Proteins als Krankheitsursache für unwahrscheinlich. Ein heterozygoter KO

führte zwar zur Geburt und zum Heranwachsen bis ins Erwachsenenalter der Mäuse, jedoch litten sie unter neuronaler Hypotrophie im Nucleus subthalamicus und den Basalganglien sowie kognitiven Defiziten und erhöhter Motoraktivität (Nasir et al., 1995). Ein weiteres Argument gegen einen Funktionsverlust als Ursache für HD liefert das 1965 erstmals beschriebene Wolf-Hirschhorn-Syndrom (WHS) (Hirschhorn et al., 1965; Wolf et al., 1965), dem eine Deletion des kurzen Arms von Chromosom 4 zugrunde liegt. Die kritische Region, also der kleinste Abschnitt, der deletiert sein muss, um die für das WHS typischen Symptome zu erzeugen, ließ sich auf 165kb auf der Chromosomenbande 4p16.3 einschränken (Tranebjaerg et al., 1984; Wright et al., 1997) und liegt damit im Bereich des *HTT*-Gens. Einige Studien konnten zeigen, dass der G8-Locus (D4S10), ein genetischer Marker für HD, im WHS deletiert war und vermutlich auch das *HTT*-Gen (Gusella et al., 1985). Eine andere Studie jedoch beschrieb einen Fall, in dem dieser Bereich nicht deletiert war (McKeown et al., 1987). Dennoch scheint beim WHS in einigen oder sogar den meisten Fällen eine loss-of-function des *HTT*-Gens vorzuliegen. Im Gegensatz zu den HD Symptomen sind die Symptome des WHS von Geburt an vorhanden und reichen von Gesichtsfehlbildungen über Minderwuchs und Untergewicht bis hin zu mentaler Retardierung (Wieczorek et al., 2000).

Neuropathologische Studien zeigen eine Aggregatbildung der verlängerten *HTT*-Proteine in Neuronen und dass N-terminale Fragmente des mutierten *HTT*-Proteins, inklusive des verlängerten Polyglutamins, zu unlöslichen sogenannten neuronalen intranukleären Inklusionen (NIs) akkumulieren und ebenso in dystrophischen Axonen im Cortex, Cerebellum und Striatum von HD-Gehirnen zu finden sind. Diese verkürzten Fragmente verursachen sogar pathologische Phänotypen in Mausmodellen, die stärker ausgeprägt sind, als jene, die durch das vollständige mutHTT erzeugt werden (Davies et al., 1997; Walker, 2007). Des Weiteren konnte durch immunohistochemische Versuche gezeigt werden, dass C-terminale Fragmente von *HTT* nur im Cytoplasma, während N-terminale Fragmente des Proteins in NIs zu finden waren (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997; Yamamoto et al., 2000). Dies bedeutet, dass mutiertes *HTT* endogen gespalten wird und sich

das N-terminale Fragment im Nucleus zu NInS zusammenlagert. Das Potential zu aggregieren ist hierbei antiproportional zur Länge des exprimierten mutHTT (Hackam et al., 1998; Lunkes and Mandel, 1998). Allgemein hin wird vermutet, dass lösliches mutHTT die Pathologie von HD initiiert, während in späteren Stadien die entstandenen Aggregate der mutHTT-Fragmente neuronale Dysfunktionen verschlimmern und den Zelltod herbeiführen (Hodgson et al., 1999; Klement et al., 1998; Steffan et al., 2000; Suhr et al., 2001). Hierbei ist noch zu erwähnen, dass in den NInS auch Ubiquitin detektiert worden war, was vermuten lässt, dass die Aggregate zum proteasomalen Abbau markiert werden konnten, jedoch scheinbar eine Art Resistenz dagegen besitzen (DiFiglia et al., 1997). Jüngste Studien konnten diesbezüglich zeigen, dass eine Resistenz gegen selektive Makroautophagie durch unterschiedliche Aggregatkonformationen zustande kommt (Sun et al., 2017).

Es ist derzeit allerdings noch unklar, ob und inwieweit diese NInS einen neurodegenerativen oder, im Gegenteil einen schützenden Effekt für die Zellen haben. In *in vitro* Experimenten mit murinen striatalen Neuronen wurde wt- oder mut*Htt* transfiziert und die Toxizität gemessen. Jene Zellen mit transfiziertem mut*Htt* wiesen Neurodegeneration durch apoptotische Mechanismen auf, die mit transfiziertem wt*Htt* nicht (Saudou et al., 1998). Durch Blockieren der Aggregation von transfiziertem mut*Htt* erhöhte sich jedoch sogar der neuronale Zelltod. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Aggregation möglicherweise einen schützenden Apoptosemechanismus in Gang setzt, ohne den die Auswirkungen des toxischen mut*Htt* weit stärker ausgeprägt wären.

1.3.2 Juvenile HD

Es gibt auch eine sehr seltene frühe oder juvenile Form der Krankheit, wobei man hier üblicherweise von einem Manifestationsalter von unter 20 Jahren spricht. Diese Form der Krankheit wird meist paternal vererbt, es liegt meist eine repeat-Anzahl von über 60 CAG-Basentriplets vor und die Symptome gehen oft mit Rigidität und Krampfanfällen einher (Barbeau, 1970; Nance and Myers, 2001; Ribai et al., 2007).

Eine mögliche Erklärung für die paternale Vererbung ist, dass die maternal vererbten Allele eine konstante Anzahl an CAG-Wiederholungen haben, wohingegen bei den paternal vererbten Allelen eine höhere Wahrscheinlichkeit existiert, durch Verrutschen der DNA-Polymerase während der Replikation in der Spermatogenese, die Anzahl der CAG-Wiederholungen zu erhöhen; man spricht von Antizipation (Ridley et al., 1988). So kann es auch zu Neumutationen und somit zum erstmaligen Auftreten der Krankheit in einer Generation kommen. Wenn ein Vater beispielsweise 39 CAG-Wiederholungen auf einem Allel des *HTT*-Gens hat, dieses weitervererbt und beim Nachkommen dann 40 oder mehr Wiederholungen auftreten, kann es sein, dass der Vater nicht erkrankt, der Nachkomme jedoch schon.

Nachkommen, bei denen beide Elternteile heterozygot für HD waren und bei denen sich eine Homozygotität nachweisen ließ, zeigten keine phänotypischen Unterschiede. Demnach scheint eine homozygote Form der Krankheit weder mit dem Manifestationsalter noch mit der Schwere der Krankheit assoziiert zu sein (Myers et al., 1989; Wexler et al., 1987).

1.3.3 Präklinische Symptome

Obwohl HD als eine Erkrankung mit später Manifestation der Symptome gilt, zeigten Studien bereits vor den klassischen Erkennungsmerkmalen der Krankheit, eine anhaltende, präklinische Phase mit schwer erkennbaren und unspezifischen Symptomen (Ross et al., 2014), wie beispielsweise gestörte Impulsivität, sozialer Rückzug, geringe Konversationsteilnahme und Konzentrationsschwäche (Duff et al., 2007; Ross et al., 2014; Stout et al., 2011) sowie Veränderungen in der kortikalen Netzwerkstruktur und funktionalen Konnektivität (Harrington et al., 2015; Wolf et al., 2012). Die letzteren Netzwerkstrukturstörungen können bereits auftreten, bevor präklinische Symptome erkennbar werden. Damit in Zusammenhang steht auch die Beobachtung von morphologischen Unterschieden im Gehirn bei präklinischen Patienten im Vergleich zu alters- und geschlechtsspezifischen Kontrollgruppen in MRT (Magnetresonanztomographie) –Studien. So war zum Beispiel das Volumen

des Cortex von präklinischen HD-Individuen durchschnittlich größer, während das von Basalganglien und weißer Substanz kleiner war (Paulsen et al., 2006). Zu den ersten betroffenen cortikalen Geweben scheint der visuelle Cortex zu gehören, wie aus Studien hervorgeht, die sich mit Expressionsveränderungen, visueller Wahrnehmung und Verarbeitung sowie mit Gewebeveränderungen bei prodromalen Mutationsträgern befassten (Dogan et al., 2013; Labuschagne et al., 2016; Tabrizi et al., 2009; Wilson et al., 2017; Wilson et al., 2016).

Auch wurden psychiatrische Auffälligkeiten in präklinischen Mutationsträgern gefunden wie zum Beispiel Angststörungen, Paranoia oder Psychotizismus (Marshall et al., 2007) sowie suizidale Tendenzen (Walker, 2007) und phonatorische Dysfunktionen (Rusz et al., 2014).

Funktionale MRT-Studien konnten zeigen, dass in präklinischen Mutationsträgern emotionale Verarbeitungsschaltkreise zwischen präfrontalem Cortex und Amygdala gestört waren und dadurch klinische Merkmale wie Erregbarkeit, Aggression und Impulsivität besonders gefördert werden (Kloppel et al., 2010). Weitere Studien, die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nutzten, um metabolische Veränderungen in präklinischen Mutationsträgern zu untersuchen, fanden heraus, dass der Verfall von striatalen Dopaminrezeptor 2 Bindungen mit regionalen metabolischen Veränderungen einherging. So war der striatale Stoffwechsel zu allen Messzeitpunkten abnormal niedrig, wohingegen der thalamische Stoffwechsel erst später fiel. Gleichzeitig war die Aktivität von zuvor identifizierten HD-assoziierten neuronalen Netzwerken abnormal erhöht, vermutlich um neuronalen Verlust zu kompensieren (Feigin et al., 2001; Feigin et al., 2007).

Zusätzlich spielt Autophagie bei der Entwicklung von HD eine tragende Rolle. Durch Blockieren von Autophagie mit 3-Methyladenin, einem Autophagieinhibitor, der durch Inhibierung der Typ 3 Phosphatidylinositol 3-Kinase die Formierung der Autophagosomen blockiert, wurden höhere exogen exprimierte mutHtt-Konzentrationen und Aggregate in PC12-Zellen und klonalen striatalen Zellen sowie eine reduzierte Lebensfähigkeit der Zellen gemessen. Folgerichtig führte durch

Serummangel induzierte Autophagie zu erhöhter Htt-Degradierung.

Die Expression von mutHtt führt auch zur Erhöhung des Cathepsin D Levels, einer Endoprotease, die in Lysosomen vorkommt. Zellen ohne Cathepsin D häufen N-terminale mutHtt-Fragmente an, wobei auch Zellen mit Cathepsin D wtHtt effizienter abbauen können als muHtt (Qin et al., 2003).

1.3.4 MID1 bei HD

Einen Zusammenhang zwischen HD und der MID1 Ubiquitin-Protein-Ligase lässt sich bei der Translation von mutHTT feststellen. Es konnte gezeigt werden, dass MID1, zusammen mit seinen Bindungspartnern $\alpha 4$, PP2A und S6K als Komplex an das CAG-repeat-Motiv der mutHTT mRNA bindet. Die Anzahl der Bindungen steigt proportional mit der Anzahl der repeats (Krauss et al., 2013). Dadurch, dass MID1 an PP2A bindet, wird die PP2A-Aktivität gesenkt, was zu einer Steigerung der mTOR-Aktivität führt (Liu et al., 2011; Trockenbacher et al., 2001). Phosphorylierte und aktivierte S6K phosphoryliert eIF4B und S6, welche die ribosomale Interaktion mit ihren Ziel-mRNAs steuern und so die Translation einleiten. Demzufolge erhöht die Präsenz von MID1 die Translation elongierter *HTT* mRNA. Eine Inhibierung von MID1 stellt daher einen interessanten Therapieansatz dar.

Klinisch lässt sich interessanterweise ein Zusammenhang zwischen der Region 4p16.3, in der das *HTT*-Gen liegt und dem OS, das durch MID1 Defizienz geprägt ist, erkennen. Bei Patienten mit WHS (siehe Kapitel 1.3.1) ist der Bereich 4p16.3 deletiert und die Phänotypen reichen, wie beim OS, von Hypertelorismus, und Lippenkiefergaumenspalte bis zur mentalen Retardierung (Battaglia et al., 2008; Wieczorek et al., 2000), sodass es bereits zu Fehldiagnosen durch Verwechslungen beider Syndrome, WHS und OS, gekommen ist (Battaglia et al., 1993). In beiden Fällen liegt eine Beeinträchtigung der *HTT*-Expression vor. Beim WHS liegt eine Deletion des Chromosomenbereichs vor, in dem das *HTT*-Gen liegt, beim OS liegt eine Mutation im *MID*-Gen vor, das an der Translation des *HTT*-Gens beteiligt ist.

Dies legt des Schluss nahe, dass auch HTT eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung spielt (Jeong et al., 2006; Reiner et al., 2003).

1.4 Das Hdh150-Mausmodell

Das murine *Htt*-Gen, auch *Huntington's disease gene homolog* (*Hdh*) genannt, konnte auf Chromosom 5 lokalisiert werden (Altherr et al., 1992; Nasir et al., 1994). Die murine DNA-Sequenz des *Htt*-Gens ist mit der humanen zu 86% identisch und die Proteinsequenz zu 91%. Trotz dieser hohen Übereinstimmung besitzt das murine *Htt*-Gen lediglich sieben CAG-repeats (Barnes et al., 1994). In einem relativ zum Menschen sehr kurzlebigen Organismus wie der Maus ist es schwierig eine Krankheit mit hohem Manifestationsalter zu untersuchen. Vor dem Hintergrund, dass das Manifestationsalter und der Schweregrad reziprok mit der Anzahl der repeats korreliert, hat man deshalb Knockin (KI) Mausmodelle generiert, die eine sehr hohe repeat-Anzahl in Exon 1 des murinen *Htt*-Gens tragen. Experimente beispielsweise mit heterozygotem KI mit 111 CAG-repeats (CAG111), zeigten reduziertes Körpergewicht, vergrößerte Hirnventrikel und diverse Bewegungsstörungen (Auerbach et al., 2001).

Für diese Arbeit wurde das Hdh150-Mausmodell verwendet, das heterozygot 150 CAG-repeats trägt. Für dieses Mausmodell wurden schon einige Phänotypen beschrieben, sowohl für heterozygote als auch für homozygote Tiere. So wurden die ersten kognitiven Defizite im Alter von 24 Wochen beschrieben (Brooks et al., 2006). Im Alter von 40 Wochen konnten in den heterozygoten Tieren die ersten motorischen Verhaltensauffälligkeiten, wie zum Beispiel ein abnormaler Gang und außerdem die ersten Nlls in striatalen Neuronen beobachtet werden (Lin et al., 2001; Tallaksen-Greene et al., 2005). Weiter wurde im Alter von etwa 14 Monaten striatale Axondegeneration beschrieben (Yu et al., 2003). Verminderte motorische Aktivität wurde in diesem Mausmodell ab einem Alter von 70 Wochen beobachtet und ab der 100. Woche wurden weitere Auffälligkeiten beobachtet, wie Gewichtsverlust, abnormale Verschränkung der Hinterpfoten, Auffälligkeiten beim Rotarodtest,

signifikanter Schwund von striatalem Volumen und Anzahl der Neurone sowie NIIIs in zahlreichen Hirnregionen (Heng et al., 2007; Tallaksen-Greene et al., 2005).

In einer noch nicht veröffentlichten Studie konnten hyperaktive cortikale Neurone in 10-17 Wochen alten Hdh150-Mäusen nachgewiesen werden (Arnoux et al., 2018). Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Forschungen zur Alzheimer-Krankheit, eine ebenso wie HD progressive neurodegenerative Erkrankung bei der im Verlauf neurotoxische Ablagerungen (Plaques) von β -Amyloidpeptiden im Gehirn entstehen (zusammengefasst in (Kumar et al., 2015)). In diesem Zusammenhang konnten in frühen und fortgeschrittenen Stadien der Alzheimer-Krankheit hyperaktive Neurone identifiziert werden, unabhängig von amyloiden Plaques (Busche et al., 2012; Busche et al., 2008). Es wird spekuliert, dass der Cortex lediglich auf erste pathophysiologische Geschehnisse in subcortikalen Regionen wie zum Beispiel dem Striatum reagiert. Solche Netzwerkfehlregulationen konnten bereits in anderen Mausmodellen beobachtet werden, wie die Ergebnisse von Untersuchungen in Alzheimer-Mäusen zeigen, bei denen zuerst hippocampale Hyperaktivitätsmuster gemessen wurden, die sich im weiteren Verlauf auf den Cortex ausgebreitet haben (Busche et al., 2012; Busche et al., 2008). Diese Beobachtung bei der Alzheimer-Krankheit wird auch dadurch unterstützt, dass bei Alzheimer-Patienten die Degeneration von hippocampalen Projektionen zum Cortex mit zunächst hyperaktiven Mustern im Hippocampus assoziiert ist und somit eine Verbreitung von Netzwerkfehlregulierungen über Verschaltungen möglich ist, die letztlich zu Neurodegeneration führt (Putcha et al., 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass in der frühen bis mittleren Phase von HD Enkephalin produzierende Neurone der indirekten Projektionen vom Striatum zum GPL stärkeren neuronalen Schaden nahmen als Substance P produzierende Neurone, die den direkten Projektionen zum GPM zuzuordnen sind (Reiner et al., 1988; Sapp et al., 1995). Zudem wurde in HD ein verstärkter Verlust von Cannabinoid-Rezeptoren an striatalen Nervenendigungen im GPL gefunden, verglichen mit denen im GPM (Richfield and Herkenham, 1994). Der bevorzugte striatale Verlust der inhibitorischen

Projektionen könnte einen Einfluss auf die in Arnoux et al., 2018 gemessene Hyperaktivität haben. Der Verlust von inhibitorischen Nervenbahnen, könnte zur Folge haben, dass durch fehlende inhibitorische Signale, eine Hyperaktivität im Thalamus und Cortex auftritt.

Aufgrund dieser beschriebenen Phänotypen und einer langen präklinischen Phase, die das klassische Krankheitsbild von HD im Patienten relativ gut widerspiegeln, eignen sich heterozygote Hdh150-Mäuse zur weiteren Untersuchung eventueller präklinischer Symptome und auch hinsichtlich möglicher Behandlungsstrategien.

1.5 Metformin

Metformin oder auch 1,1-Dimethylbiguanid ist ein Biguanid, das als Arzneistoff bei Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt wird. Dabei wirkt es verbessernd auf die Hyperglykämie ohne die Insulinausschüttung zu stimulieren oder Hypoglykämie zu verursachen (Stumvoll et al., 1995). Es hemmt die Gluconeogenese in der Leber (Kirpichnikov et al., 2002; Madiraju et al., 2014) und wirkt kardioprotektiv, indem es positive Effekte auf zirkulierende Kohlenhydrate und Lipoproteine hat, die in Zusammenhang mit erhöhten kardiovaskulären Risiken stehen (Group, 1998; Wu et al., 1990). Es inhibiert den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, was zu reduzierter ATP-Produktion und Anhäufung von AMP führt. Das gestörte AMP/ATP-Verhältnis aktiviert die AMP-activated kinase (AMPK) in Leber und Muskelzellen (Foretz et al., 2014) und hemmt überdies indirekt mTOR (Chau-Van et al., 2007; Soliman et al., 2016). Ein weiteres Zulassungsgebiet für Metformin ist das polycystische Ovarialsyndrom (zusammengefasst in (Lord et al., 2003)), bei dem es zu Zysten in den Ovarien, Menstruationsstörungen und einem hohen Androgenspiegel kommen kann (zusammengefasst in (Teede et al., 2010)) Kontrovers diskutiert wird der Einsatz von Metformin gegen Adipositas (Levri et al., 2005; Seifarth et al., 2013).

Starke Nebenwirkungen des Medikaments wurden bisher nicht beschrieben. Es ist

von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen und wird aktuell auch für präventive Krebstherapien diskutiert (Demir et al., 2014; Micic et al., 2011).

Kürzlich wurde es gegen Defizite in Mäusen mit fragilem-X-Syndrom (FXS) eingesetzt. Das FXS ist eine Trinukleotiderkrankung, bei der es durch Verlust des fragile X mental retardation protein (FMRP) zu einer Hyperaktivität von mTOR und extracellular-signal-regulated kinase (ERK) kommt (Hou et al., 2006; Price et al., 2007; Sharma et al., 2010). Aufgrund der erhöhten ERK-Aktivität kommt es zu einer erhöhten Translation der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9). MMP9 degradiert extrazelluläre Proteine, die u. a. bei synaptischen Funktionen eine wichtige Rolle spielen und mit FXS assoziiert sind. Ein *Mmp9*-KO in *Fmr1*^{-y}-Mäusen konnte zelluläre und Verhaltenssymptome weitgehend aufheben (Sidhu et al., 2014). In älteren Studien konnte gezeigt werden, dass Metformin einen inhibierenden Einfluss auf ERK hat (Soares et al., 2013) und so durch Normalisierung der ERK-Signalkaskade gegen Defizite in Mäusen mit fragilem-X-Syndrom eingesetzt werden kann (Gantois et al., 2017).

Darüber hinaus hat Metformin positive Effekte auf die Lebensdauer von männlichen Mäusen (Ma et al., 2007) und verzögert HD assoziierte Symptome (Adhietty, 2010). Die Bioverfügbarkeit und damit die Eignung als potentiell Medikament gegen HD lässt sich durch Experimente belegen, die gezeigt haben, dass es die Bluthirnschranke überwinden kann (Jin et al., 2016).

Weitere Studien belegen, dass Metformin in die Bildung des MID1/mTOR/PP2A-Proteinkomplex eingreift (Kickstein et al., 2010) und dass dieser Komplex die Translation von mutHTT reguliert (Krauss et al., 2013). In einer noch nicht veröffentlichten Studie wird die Wirkung von Metformin auf die Expression von mutHTT noch detaillierter untersucht (Arnoux et al., 2018). HEKT-Zellen, die das Exon 1 des *HTT*-Gens mit 83 CAG-repeats exprimieren, wurden 48h mit Metformin oder Vehikel behandelt. In einem filter retardation assay konnte die Aggregation der mutHTT-Fragmente gemessen und eine signifikante Reduktion nach Metforminbehandlung festgestellt werden. Dies impliziert auch einen möglichen

positiven Langzeiteffekt von Metformin auf die erst in späteren Stadien der Krankheit auftretenden Aggregate. Zudem wird in der besagten Studie auch der Effekt von Metformin durch eine Blockade des MID1-Proteinkomplexes untersucht. Zu diesem Zweck wurde in der gleichen Zelllinie die Expression von *MID1* durch siRNA blockiert und zusätzlich eine Behandlung mit und ohne Metformin durchgeführt. Der *MID1*-Knockdown (KD) hatte eine Reduktion der mutHTT-Aggregate zur Folge und die zusätzliche Behandlung mit Metformin hatte keinen additiven Effekt, was vermuten lässt, dass Metformin tatsächlich durch einen Einfluss auf den MID1-Proteinkomplex die Translation von mutHTT inhibiert.

1.6 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Funktion der Ubiquitin-Protein-Ligase MID1 im Krankheitskonzept, sowohl beim OS als auch bei HD, näher untersucht werden. Hierfür waren zunächst KD-Experimente *in vitro* und *in vivo* als auch ÜE-Experimente *in vitro* sowie Experimente mit fetalen Fibroblastenzelllinien eines OS-Patienten geplant, die Aufschluss über den Einfluss von MID1 auf Proliferations- und Migrationsverhalten der Zelle geben sollten. Weiter sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Blockade des MID1/mTOR/PP2A-Proteinkomplex durch die Behandlung mit Metformin *in vitro* und *in vivo* auf die Translation von mutHTT hat. Hierfür wurde zunächst ein Einfluss auf primäre Neurone eines HD-Mausmodells durch die Behandlung mit Metformin *in vitro* getestet. Anschließend wurden cortikale Hirninjektionen durchgeführt, um zu testen, ob ein potenzieller Einfluss von Metformin in neuronalem Gewebe auch *in vivo* Erfolg hat.

Insbesondere sollte überprüft werden, ob Metformin frühe Symptome im HD-Krankheitsverlauf beeinflussen kann. Hierfür wurde zunächst die präklinische Phase im Hdh150-Mausmodell verhaltensbiologisch untersucht. Da der visuelle Cortex in Patienten und in einigen Mausmodellen eine wichtige Rolle in der frühen Krankheitsentwicklung zu spielen scheint, wurde ein Visual Discrimination Task (VD) durchgeführt. Weiterhin wurden soziale Interaktion, Angstverhalten und

Gedächtniskonsolidierung mit Hilfe entsprechender Verhaltenstests untersucht. Im Anschluss sollte getestet werden, ob die orale Applikation von 5 mg/ml Metformin im Trinkwasser über einen Zeitraum von drei Wochen eventuelle Verhaltensauffälligkeiten beseitigen kann. Zusätzlich wurden Westernblotanalysen durchgeführt, um die Auswirkungen der Metforminbehandlung auf die Phosphorylierung des mTOR-Targets S6 sowie die Expression des mutHTT-Proteins zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte und ihre Hersteller

Gerät	Hersteller
ChemiDoc MP Imaging System	Biorad
Electrophoresis Power Supply	Peqlab
Kryostat, Leica CM1900	GMI Inc.
Luminometer, Infinite M200	Tecan
Mikroskop DM 6000 CS	Leica
Mikroskop Evos XL	life technologies
Mini Protean Tetra Cell	Biorad
pH-Messgerät Satorius pH Meter PB-11	Satorius AG
Qubit 2.0	Invitrogen
Thermocycler MJ Research PTC-200	Biorad
TransBlot Turbo Transfer System	Biorad
UV Transilluminator Intas Gel iX Imager	Intas-Science-Imaging Instruments GmbH

2.1.2 Chemikalien/Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien/Reagenzien und ihre Hersteller

Reagenzien	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Roth
Acrylamid Rothiphorese Gel	Roth
Agarose	AppliChem
Albumin Fraktion V	Roth
Ammoniumperoxidsulfat	Roth
Ampicillin	AppliChem
Bromphenolblau	Roth
c0mplete tablets easy pack	Roche

Reagenzien	Hersteller
Ethanol	Honeywell
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth
Fastgreen	Sigma-Aldrich
FBS	gibco (life technologies)
Fluoromount aqueous Mounting	Sigma-Aldrich
Formamid	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Roth
Laminin	Sigma-Aldrich
Metformin (1,1-Dimethylbiguanid Hydrochlorid)	MP
Milchpulver	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
PBS	gibco (life technologies)
PBS Tabletten	gibco (life technologies)
PenStrep	gibco (life technologies)
Paraformaldehyd	Roth
Phosstop	Roche
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich
PolyFect	Qiagen
Schafserum	abcam
SDS	Roth
Sucrose	Sigma-Aldrich
TEMED	Invitrogen
TissueTek	Sakura
TRIS	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin	gibco (life technologies)
Trypton	Roth
Tween	Roth
Wasser	Ampuwa

2.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen und ihre Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
Annealingbuffer	30 mM Hepes pH 7,4, 100 mM Kaliumacetat, 2 mM Magnesiumacetat, ad 100 ml H ₂ O
MagicMix (2x)	48% Harnstoff, 15 mM TRIS pH7,5, 8,7% Glycerin, 1% SDS, 1% β-Mercaptoethanol
Natriumcitratpuffer (10mM)	1 g Natriumcitrat, 1 ml 0,2% Tx-100, ad. 500 ml H ₂ O, pH6
PBS-T	2 PBS Tabletten, 1 ml Tween, ad 1 l H ₂ O
Paraformaldehyd (4%)	4 g PFA in 90 ml PBS bei 60°C und Erhöhung des pH-Werts mit 1 M NaOH lösen. Anschließend mit HCL einstellen auf pH6,9
SDS-Laufpuffer	6 g TRIS, 28,8 g Glycin, 2 g SDS, ad 2 l H ₂ O
TAE-Puffer (50x)	242 g TRIS, 18,6 g EDTA, 57,1 ml Essigsäure (100%), ad 1 l H ₂ O
Towbin Puffer (10x)	30,3 g TRIS, 144 g Glycin, 10% SDS, ad 1 l H ₂ O
Towbin Puffer (1x)	100 ml 10x Towbin Puffer, 200 ml EtOH, 700 ml H ₂ O
TBS-T	6,05 g TRIS, 8,76 g NaCl, 800 ml H ₂ O, pH mit 1 M HCl auf 7,6 einstellen, ad 1 l H ₂ O. Anschließend 1 ml Tween dazugeben.

2.1.4 Gele

Tabelle 4: Gele und ihre Zusammensetzung

Gel	Zusammensetzung
Agarosegel (1,5%)	6 g Agarose, ad 400 ml 1x TAE-Puffer. Unter Hitze lösen und + 8 µl EtBr
Separating Gel (10%)	1,5 M TRIS pH8,8, 30% Acrylamid, 10% SDS, 10% APS, 0,04% TEMED, ad 5 ml H ₂ O
Stacking Gel	0,5 M TRIS pH6,8, 30% Acrylamid, 10% SDS, 10% APS, 0,1% TEMED, ad 2 ml H ₂ O

2.1.5 Kits

Tabelle 5: Kits und ihre Hersteller

Kit	Hersteller
Cell Titer Glo	Promega
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
GelExtract	5Prime
GoTaq G2 DNA Polymerase Kit	Promega
Oligofectamine	Invitrogen
QiaShredder Kit	Qiagen
Qubit Protein Assay Kit	molecular probes
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
TransBlot Turbo Transfer Pack	Biorad
Western Lightning Plus-ECL	PerkinElmer, Inc.

2.1.6 Primer

Tabelle 6: Primersequenzen

Primer	Sequenz (5' – 3')
HttQ150 forward	CCCATTTCATTGCCTTGCTGCTAGG
HttQ150 reverse	CCTCTGGACAGGGAACAGTGTTGG
MID1-HA-Tag-EcoRI F	ACTGGAATTCGCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTAC GCTGAAACACTGGAGTCAGAACT
MID1-XhoI R	ACTGCTCGAGTCACGGCAGCTGCTCTGTGCAGTCC
MID1 pCAG-IG F1	CTGGTTGTTGTGCTGTCTCA
MID1 pCAG-IG R1	AGGGCTTCTTATTCGGGTGA
MID1 pCAG-IG F2	ACGCTGTGAAGACCTGTGT
MID1 pCAG-IG R2	TCTGTCGTCTTTGCTGAATGA
MID1 pCAG-IG F3	ATGCATCACGTCAAGAAGCC
MID1 pCAG-IG R3	GGTCCAATGCACAGTGATGG
MID1 pCAG-IG F4	CTCCCAACCCTCCCACAATT
MID1 pCAG-IG R4	CCACTTCCCAATAATGCCGG
MID1 pCAG-IG F5	CCAGGGGAGCTATGGAGTAG
MID1 pCAG-IG R5	CACACCGGCCTTATTCCAAG

2.1.7 Plasmide

Tabelle 7: Plasmide und ihre Hersteller/Herkunft

Plasmid	Hersteller/Herkunft
pCAG-IG	AG Nitsch, Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (DE)
pCAGGS-GFP	Verdon Taylor, Embryology and Stem Cell Biology Department of Biomedicine University of Basel (CHE)
pCMV-Tag 2A	Sybille Krauss, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen in der Helmholtz-Gemeinschaft, Bonn (DE)
pSUPERIOR.puro	OligoEngine
shcontrol Plasmid mit scrambled shRNA-Sequenz	AG Winter, Institut für Humangenetik, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (DE)

2.1.8 Bakterien

Tabelle 8: Bakterien und ihre Hersteller

Bakterien	Hersteller
One Shot Top10 Chemically Competent E.coli	ThermoScientific

2.1.9 Enzyme

Tabelle 9: Enzyme und ihre Hersteller

Marker	Hersteller
BglII	New England Biolabs
EcoRI	New England Biolabs
HindIII	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs

2.1.10 Antikörper

Tabelle 10: Antikörper und ihre Hersteller

Antikörper	Hersteller
anti-Actin	Sigma-Aldrich
anti-Gapdh	abcam
anti-GFP	Sigma-Aldrich
anti-Htt	abcam
anti-S6	Cell Signaling Technology
anti-pS6	Cell Signaling Technology
anti-NeuN	Millipore
anti-Tbr1	abcam
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	ThermoScientific
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 conjugate	ThermoScientific
HRP-anti-mouse	Dianova
HRP-anti-rabbit	Dianova
MID1 Ab #1F3 (selfmade)	Sybille Krauss, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen in der Helmholtz-Gemeinschaft, Bonn (DE)

2.1.11 Marker

Tabelle 11: Marker und ihre Hersteller

Marker	Hersteller
GeneRuler 100bp	Thermo Scientific
GeneRuler 1kb	Thermo Scientific
HiMark™ Pre-stained Protein Standard	Invitrogen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Fisher

2.1.12 Medien

Tabelle 12: Medien und ihre Hersteller/Zusammensetzung

siRNA	Hersteller/Zusammensetzung
DMEM	Sigma-Aldrich
IMDM	gibco (life technologies)
LB-Medium	5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl, ad 1 l H ₂ O, pH auf 7 einstellen, autoklavieren
Neurobasalmedium	gibco (life technologies)
OptiMEM	gibco (life technologies)

2.1.13 Zelllinien

Tabelle 13: Zelllinien und ihre Herkunft

Zelllinie	Herkunft
Fibroblastenzelllinie 17/98 (mit <i>MID1</i> -Mutation im Exon 9 c.1801_1804delCTCC)	Charité University Hospital Berlin
Fibroblastenzelllinie 18/98 (gleichaltrige Kontrolle)	Charité University Hospital Berlin
HeLa-Zellen	Sybille Krauss, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen in der Helmholtz-Gemeinschaft, Bonn (DE)

2.1.14 siRNAs

Tabelle 14: siRNAs und ihre Hersteller

siRNA	Hersteller
scr	Qiagen
MID1-8	Qiagen
MID1-9	Qiagen

2.1.15 shRNAs

Tabelle 15: shRNAs und ihre Sequenzen

shRNA	Sequenz
Mid1-shRNA1-f	gatccccTGTGCCACCAACGAGCCTGtcaagagaCAGGCTCGTTGGTGGCACA tttta
Mid1-shRNA1-r	agcttaaaaaTGTGCCACCAACGAGCCTGtctcttgaaCAGGCTCGTTGGTGGCA CAggg
Mid1-shRNA2-f	gatccccCCTGCCGGCATGTCATCACtcaagagaGTGATGACATGCCGGCAGG tttta
Mid1-shRNA2-r	agcttaaaaaCCTGCCGGCATGTCATCACtctcttgaaGTGATGACATGCCGGCA GGggg
Mid1-shRNA3-f	gatccccCATCCCGTCAAGAAGCCAAAtcaagagaTTGGCTTCTTGACGGGATGt tttta
Mid1-shRNA3-r	agcttaaaaaCATCCCGTCAAGAAGCCAAAtctcttgaaTTGGCTTCTTGACGGGAT Gggg

2.1.16 EDV-Programme und Tools

Tabelle 16: EDV-Programme und ihre Entwickler

Software/Tool	Entwickler
EthoVision	Noldus
GraphPad	GraphPad Software Inc.
icontrol	Tecan
ImageJ	Wayne Rasband
Image Lab	Biorad
K-Llimbic	Med Associates Inc.
LAS X	Leica
Oligoengine	DNA Engine Inc

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Auf grundlegende Standardmethoden der Molekularbiologie wie DNA-Extraktion,

Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR), Gelelektrophorese oder das Herstellen von Standardlösungen wird hier nicht detailliert eingegangen. Es wurden Standardprotokolle verwendet, sofern nicht anders angegeben (Sambrook et al., 2006).

2.2.2 Zellkultur

HeLa Zellen wurden in DMEM (inkl. 10% FBS und 1% PenStrep), Fibroblastenzelllinien in IMDM (inkl. 15% FBS und 1% PenStrep) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin und als Einfriermedium das entsprechende Kulturmedium inkl. 10% DMSO verwendet.

2.2.3 Erstellung eines *MID1*-ÜE-Konstrukt

Die cDNA von *MID1* (Transcript: MID1-201, ENST00000317552) sollte aus dem Vektor pCMV-Tag 2A herausgeschnitten und in einen passenden Transfektionsvektor (pCAG-IG) hineinligiert werden. Hierfür wurden Primer designt, die die cDNA amplifizieren und flankierende Restriktionsschnittstellen für die Enzyme EcoRI und XhoI sowie eine Kozak-Sequenz (5'-GCCACCATG-3') und einen Hämagglutinin-Tag (engl. Human influenza hemagglutinin, HA, 5'-TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT-3') beinhalten (*MID1*-HA-Tag-EcoRI F und *MID1*-XhoI R). Die Kozak-Sequenz trägt zur Initiierung der Translation bei und der HA-Tag dient einer potentiellen Detektion durch Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 5).



Abbildung 5: Schematische Darstellung des ÜE-Inserts, das in den Transfektionsvektor pCAG-IG hineinkloniert wurde.

Mittels PCR wurde dann das Konstrukt amplifiziert und durch Gelelektrophorese vom linearisierten Plasmid getrennt. Das Konstrukt wurde aus dem Gel unter UV-Licht herausgeschnitten und mittels GelExtract-Kit aufgereinigt. Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau, um die doppelsträngige DNA des PCR-Produktes und den Plasmid pCAG-IG mit den entsprechenden Restriktionsenzymen zu schneiden (Tabelle 17).

Tabelle 17: Restriktionsansatz für den Verdau

Komponente	Menge
10x BSA	3 µl
NEB Buffer 2.1	3 µl
EcoRI	1 µl
XhoI	1 µl
Plasmid/PCR-Produkt	0,5 µg/0,1 µg
H ₂ O	ad. 30 µl

Wieder wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die Restriktion zu überprüfen und den Plasmid aufzureinigen. Die entstandenen Überhänge wurden nun mittels T4 DNA Ligase ligiert (Tabelle 18). Der Ansatz wurde für 1h bei 24°C inkubiert.

Tabelle 18: Ligationsansatz für das ÜE-Konstrukt

Komponente	Menge [µl]
Plasmid	2
Insert	6
10x Buffer	2
T4 DNA Ligase	1
H ₂ O	9

2.2.4 Erstellung von *MID1*-Knockdown-Konstrukten

2.2.4.1 Der Mechanismus der RNA-Interferenz

Short hairpin RNAs (shRNAs) dienen der RNA-Interferenz (RNAi) und somit der Abschaltung von Genen (Knockdown, KD), deren Sequenz gewöhnlich als

doppelsträngige DNA als Insert in einem Plasmid integriert ist. Nachdem der Vektor in das Wirtsgenom integriert wurde (*in utero* Elektroporation, siehe Kapitel 2.2.14) wird die shRNA abhängig vom verwendeten Promotor durch die RNA Polymerase II oder III transkribiert. Durch die Ribonuklease Drosha wird das Transkriptionsprodukt zur pre-shRNA verarbeitet und mithilfe des Transportproteins Exportin-5 in das Zytoplasma der Zelle transportiert. Das Enzym Dicer entfernt nun die Haarnadelstruktur und bildet an beiden Enden 3'-Überhänge. Diese doppelsträngige siRNA besteht nun aus einem Sense- und einem Antisense-Strang, wobei Letzterer aus einer kurzen komplementären Sequenz der mRNA des zu untersuchenden Gens besteht und wird mit dem RNA-induced silencing complex (RISC) assoziiert. Unter ATP-Verbrauch wird nun die doppelsträngige siRNA entwunden und anschließend dirigiert der verbliebene Antisense-Strang den Komplex zur endogenen mRNA und das Oligonukleotid wird mit diesem hybridisiert. Durch die katalytische Untereinheit Argonaute-2 (Ago2) des RISC-Komplexes, wird die hybridisierte RNA geschnitten und mithilfe von endogenen Nukleasen die mRNA nun degradiert. Somit kommt es zu einer verminderten Translation (Pratt and MacRae, 2009).

2.2.4.2 Design der shRNAs

Mithilfe der Online-Software Oligoengine 2.0 können die effektivsten Hybridisierungsstellen innerhalb eines Gens ermittelt werden. Diese Sequenz entspricht dem Sense-Strang, wodurch der Antisense-Strang revers komplementär ebenfalls vorgegeben ist. Diese beiden Sequenzen werden nun durch eine Sequenz von neun Nukleotiden miteinander verbunden, die später eine Haarnadelstruktur ausbildet (Brummelkamp et al., 2002). An das 5'-Ende wurde die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym BglIII vorangestellt. Die so erzeugte Sequenz entspricht dem forward Oligonukleotid. Das reverse Oligonukleotid entspricht der komplementären Sequenz, wobei an dessen 5'-Ende die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym HindIII vorangestellt wurde und entsprechend an das 3'-Ende des forward Oligonukleotids ergänzt wurde. Schließlich wurden noch 5'-Überhänge erzeugt, indem bei beiden Sequenzen die 3'-Enden

verkürzt wurden (Abbildung 6).

2.2.4.3 Annealing

Forward und reverse Oligonukleotide wurden miteinander hybridisiert, indem jeweils 1 µl des jeweiligen Oligonukleotids und 48 µl Annealingbuffer in ein Reaktionsgefäß pipettiert wurden. Die Reaktion wurde für die Denaturierungsphase für 4 min auf 95°C erhitzt und anschließend für 10 min auf 70°C herunter gekühlt, um die beiden Stränge zu hybridisieren.



Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung eines forward- und reverse-Oligonukleotids nach Annealing.

2.2.4.4 Restriktionsverdau und Ligation

Das hybridisierte Insert sollte nun in den Vektor pSUPERIOR.puro kloniert werden. Hierfür musste dieser linearisiert und mit entsprechenden Schnittstellen versehen werden. Es wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt wie in Kapitel 2.2.3 jedoch mit den Enzymen BglII und HindIII sowie dem NEB Puffer 3.1.

Anschließend wurde der Restriktionsverdau gelelektrophoretisch aufgetrennt und der linearisierte Plasmid aufgereingt. Nun konnten die erstellten shRNA-Konstrukte in den Vektor ligiert werden. Die Ligation erfolgte nach folgendem Ansatz:

Tabelle 19: Ligationsansatz für das KD-Konstrukt

Komponente	Menge [µl]
Plasmid	2
Insert	4
10x Buffer	2
T4 DNA Ligase	1
H ₂ O	11

2.2.5 Vermehrung von Vektoren

2.2.5.1 Transformation

Durch Transformation sind kompetente Bakterien in der Lage, freie DNA aufzunehmen (Griffith, 1928). Dies kann man sich zunutze machen, um Plasmide zu vervielfältigen. Hierfür wurde 1 µl Plasmid-DNA in ca. 50 µl One Shot Top 10 *Escherichia coli* (E. coli) Zellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte ein Hitzeschock für 90 sek bei 42°C und eine sofortige Inkubation auf Eis für 2 min. Dann wurden 250 µl LB (lysogeny broth)-Medium hinzugegeben und der Ansatz für weitere 30 min im Inkubator bei 37°C geschüttelt. Zum Schluss wurden 150 µl auf einer Agar-Platte mit Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden etwa 10 der gewachsenen Kolonien gepickt und in 3 ml LB-Medium inkl. Antibiotikum bei 37°C über Nacht geschüttelt.

2.2.5.2 Minipräparation

Das folgende Protokoll zur Minipräparation (Minipröp) bedient sich aus den Puffern P1, P2 und P3 aus dem EndoFree Plasmid Maxi Kit, folgt jedoch einem nicht vom Hersteller angegebenen Ablauf ohne Verwendung von Säulen. Aus der Übernachtskultur wurden 1,5 µl in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 100 µl P1 Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl P2 Puffer hinzugegeben und das Gefäß mehrmals invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Das enthaltene Sodiumdodecylsulfat (SDS)

löst Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembran, was zur Zellyse führt und damit zur Freisetzung der Zellinhalte. Danach wurden 100 µl gekühlter P3 Puffer auf das Lysat pipettiert und der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 100%igem EtOH versetzt, um die Plasmid-DNA auszufällen. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm, woraufhin der Überstand verworfen wurde. Das DNA-Pellet wurde mit 150 µl 70%igem EtOH gewaschen. Nach weiteren 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der EtOH möglichst gut abgenommen und das Gefäß mit geöffnetem Deckel auf einen Heizblock bei 50°C gestellt, um den restlichen Alkohol vollständig zu entfernen. Das Pellet wurde dann in 20-50 µl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.5.3 Sequenzierung

Durch Sequenzierung der entsprechenden Plasmidabschnitte wurde kontrolliert, ob sich das Insert tatsächlich an der richtigen Stelle im Plasmid befand (Primer MID1 pCAG-IG F/R 1-5). Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech und nach deren Angaben erfolgten die Vorbereitungsschritte.

2.2.5.4 Maxipräparation

Nach Sequenzierkontrolle konnten die Plasmide nun durch Maxipräparation (Maxipräp) weiter vermehrt werden. Hierfür mussten die Plasmide zunächst retransformiert werden. Die Maxipräp erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers.

2.2.6 Transfektion

2.2.6.1 Überexpression von *MID1*

HeLa Zellen wurden am Vortag in DMEM mit 10% FBS und 1% PenStrep ausgesät (6-Well Format, 100.000 Zellen/ml). Pro Well wurde ein Transfektionsgemisch angesetzt mit 1,5 µg Plasmid (pCAG-IG + *MID1*, als Kontrolle diente der leere Vektor pCAG-IG) und 12 µl PolyFect in DMEM (ohne Zusätze) auf ein totales Volumen von 100 µl. Das Gemisch wurde resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und durch 3 ml frisches ersetzt. Nach der Inkubation wurde dem Transfektionsgemisch 600 µl DMEM (inkl. 10% FBS, 1% PenStrep) zugesetzt und die Gesamtmenge (712 µl) auf die Zellen pipettiert. Die Ansätze wurden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

2.2.6.2 Knockdown von *MID1*

HeLa Zellen wurden am Vortag in DMEM mit 10% FBS ohne PenStrep ausgesät (6-Well Format, 50.000 Zellen/ml). Pro Well wurde ein Transfektionsgemisch 1 angesetzt mit 5 µl siRNA (scrambled (scr) oder *MID1*-8 und *MID1*-9) und 175 µl OptiMEM sowie ein Transfektionsgemisch 2 mit 4 µl Oligofectamine und 15 µl OptiMEM. Transfektionsgemisch 2 wurde nach Ansetzen 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Transfektionsgemische zusammen pipettiert und 20 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und einmal mit DMEM (ohne Zusätze) gewaschen und schließlich durch 800 µl DMEM (ohne Zusätze) ersetzt. Nach der Inkubation wurden 204 µl vom Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben, gut verteilt und 4h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden 500 µl DMEM inkl. 30% FBS zugegeben.

2.2.6.3 Überprüfung der Transfektionen

Zur Überprüfung der der Transfektionen wurden Westernblotanalysen durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.13).

2.2.7 Proliferationsassay

Fibroblasten oder transfizierte Zellen wurden in einer 96-Well Platte ausgesät (100 μ l je Well) in einer Konzentration von 25.000 Zellen/ml in ihrem jeweiligen Kulturmedium. Aus dem Rest der transfizierten Zellen wurden Proteinlysate erstellt, zur Überprüfung der Transfektionseffektivität. Der angewandte Proliferationsassay (Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega) basiert auf der Quantifizierung von ATP als Indikator für metabolisch aktive Zellen. Durch die zugegebene Ultra-Glo rLuciferase wird Luciferin unter Verbrauch von ATP zu Oxyluciferin oxydiert, welches als Lumineszenz gemessen werden kann. Der Verbrauch von ATP, der nur in vitalen Zellen stattfinden kann, ist proportional zur messbaren Lumineszenz.

Es sollten zwei Messzeitpunkte pro Tag stattfinden. Der erste wurde direkt nach Aussähen der Zellen in die 96-Well Platte gemessen, also solange die Zellen noch nicht adhären waren. Das ist möglich, da zu späteren Zeitpunkten, die adhären Zellen durch die Zugabe des Reagens ohnehin lysiert und abgelöst werden. Für die jeweiligen Messungen wurden 25 μ l Cell-Titer-Glow (CTG) in die zu messenden Wells pipettiert. Aus dem Gesamtvolumen (100 μ l Medium + 25 μ l CTG) wurden 80 μ l in eine weiße 96-Well Messplatte pipettiert. Die Lumineszenz wurde mit dem Luminometer Infinite M200 und der Software iconcontrol von Tecan ermittelt.

2.2.8 Migrationsassay

Zur Vorbereitung des Migrationsassays wurde je Ansatz ein Culture Insert (ibidi) in ein Well einer 6-Well Platte geklebt. Mit Hilfe eines Skelpells wurde auf der

Unterseite der Platte ein kleiner Querschnitt markiert. Dieser ist unter dem Mikroskop klarer und deutlicher zu sehen als beispielsweise eine Farbmarkierung mit einem Stift. Diese Markierung diente später als obere Bildmarkierung bei der bildlichen Dokumentation des Assays. Somit konnte sichergestellt werden, dass immer der gleiche Bildausschnitt festgehalten wurde.

Fibroblasten oder transfizierte Zellen wurden zu 100.000 Zellen/ml in ihrem Kulturmedium verdünnt und davon 70 µl in beide Kammern des Inserts pipettiert. Der Rest der transfizierten Zellen wurde wieder in die Kulturplatten zurückgegeben und weiter kultiviert, da der Migrationsassay zu diesem Zeitpunkt noch nicht gestartet wurde und somit die Überprüfung der Transfektionen noch nicht sinnvoll wäre. Von jedem Ansatz wurden drei biologische Replikate zur Migration angesetzt, von denen nochmal jeweils zwei technische Replikate angesetzt wurden. Die Inserts wurden 24h später mit einer Pinzette entfernt und der Migrationsassay damit gestartet. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Assay das erste Mal bildlich als Ausgangspunkt dokumentiert. Außerdem wurden die weiterhin kultivierten Zellen abtrypsiniert und aus der Hälfte wurden Proteinlysate erstellt zur Überprüfung der Transfektion. Der Rest wurde wieder ausgesät, um die Transfektionseffektivität zu einem späteren Zeitpunkt erneut überprüfen zu können. Folgende Zeitpunkte wurden dokumentiert: 0h, 12h, 16h, 20h (hier wurden aus den restlichen Zellen erneut Proteinlysate erstellt) und 24h. Für die Bildaufnahmen wurde das Mikroskop Evos XL von life technologies verwendet.

2.2.9 Mauszucht

Die Zucht der Hdh150-Mäuse erfolgte in der TARC (Translational Animal Research Center) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Dr. Jan Baumgart. Zur Generierung von heterozygoten Hdh150-Mäusen wurden C57BL/6J-Weibchen (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) mit heterozygoten Hdh150-Männchen, ebenfalls mit C57BL/6J-Hintergrund, gekreuzt (Lin et al., 2001). Zur Genotypisierung wurden Schwanzbiopsien entnommen, aus denen DNA extrahiert

wurde. Das Management der Zucht erfolgte durch die Tierpfleger der TARC. Für sämtliche Experimente wurden ausschließlich Männchen verwendet.

2.2.10 Genotypisierung

Für die Genotypisierungs-PCR wurde folgender Master Mix je sample angesetzt:

Tabelle 20: Mastermix für Genotypisierungs-PCR

Komponente	Menge [μ l]
H ₂ O	11,5
5x Go-Taq Puffer	5
DMSO	1,25
dNTPs (25mM)	2
Primer HttQ150 forward	2
Primer HttQ150 reverse	2
Go-Taq Polymerase	0,25
DNA	1

Für die Amplifizierung wurde das Programm „HTT“ (Tabelle 21) verwendet. Anschließend wurden die Reaktionsansätze gelelektrophoretisch auf einem 1,5%igen Agarosegel großzügig aufgetrennt, um die mutHtt-Bande von der wtHtt-Bande zu trennen und unter einem Gel iX Imager ausgewertet. Bei allen Proben wurde eine wtHtt-Bande bei 379 bp erwartet. Bei den heterozygoten Mäusen wurde zusätzlich eine muHtt-Bande bei 829 bp erwartet.

Tabelle 21: Thermocyclerprogramm „HTT“ für die Genotypisierungs-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1. Denaturierung	95	2 min
2. Denaturierung	95	30 sek
3. Annealing	62,3	30 sek
4. Elongation	72	1 min
5. Elongation	72	5 min
Lagern	4	∞

39 Zyklen

2.2.11 Erstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Die Zellen wurden abtrypsiniert (5 min bei 37°C) und im Anschluss in Medium mit FBS aufgenommen, um die Trypsinreaktion zu stoppen. Anschließend wurden sie zentrifugiert (5 min 200 rpm), das Medium abgenommen und in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 min 1000 rpm), woraufhin das Medium abgezogen wurde und das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min bei 1000 rpm) wurde das PBS abgenommen und das Pellet je nach Größe in 50-200 ml MagicMix inklusive 1% Mercaptoethanol resuspendiert. Das Gemisch wurde auf eine Shredder-Säule (Qiagen) pipettiert und bei 13.500 rpm 2 min lang zentrifugiert. Das Lysat wurde in einem bereitgestellten Gefäß aufgefangen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Die Konzentration wurde mittels Qbit gemessen.

2.2.12 Erstellung von Proteinlysaten aus Gewebe

Hirne wurden nach cervikaler Dislokation möglichst schnell entnommen und die entsprechenden Areale präpariert. Das Gewebe wurde in MagicMix inklusive 1 % Mercaptoethanol überführt und gemörsert. Anschließend wurde das Gemisch 2h bei 4°C geschüttelt. Im Anschluss wurde das Gemisch auf eine Shredder-Säule (Qiagen) pipettiert und bei 13.500 rpm 2 min lang zentrifugiert. Das Lysat wurde in einem bereitgestellten Gefäß aufgefangen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Die Konzentration wurde mittels Qbit gemessen.

2.2.13 Westernblot

2.2.13.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden

Proteine nach ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Dafür müssen die Proteine zunächst mit dem anionischen Detergenz SDS und dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol bei hoher Temperatur denaturiert und dissoziiert werden. Durch die Bindung an SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung und können nun bei angelegter elektrischer Spannung ihrer Größe nach aufgetrennt werden, da die Menge an gebundenem SDS proportional zu ihrem Molekulargewicht ist.

Proteinlysate wurden zusammen mit 3 μ l MagicMix inkl. Bromphenolblau für 5 min bei 95°C denaturiert und auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen zu 30 μ g (zum Nachweis von Htt wurden 40 μ g verwendet) aufgetragen und elektrophoretisch in SDS-Laufpuffer bei 200 V für ca. 1h aufgetrennt; die Auftrennung von wtHtt und mutHtt erfolgte über Nacht bei 100 V.

2.2.13.2 Blotting

Beim Blotting werden die aufgetrennten Proteine vom SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Die Membranen wurden vorbereitet, indem sie kurz (ca. 5 sek) in EtOH und anschließend für etwa 5-10 min in 1x Towbin-Puffer getaucht wurden. Das Blottingpapier wurde ebenfalls kurz in 1x Towbin-Puffer getränkt. Für Htt-Blots wurden die kommerziellen TransBlot Turbo Transfer Packs (Biorad) verwendet. Danach wurde der Blot in der Reihenfolge (Kathode) – Blottingpapier, SDS-Gel, PVDF-Membran, Blottingpapier – (Anode) in eine Trans-Blot SD semidry Transfer Cell (Biorad) gelegt. Das Blotting erfolgte bei 20 V für 30 min für den Blot von Standardproteinen. Das Blotting von Htt-Proteinen erfolgte bei 20 V für 90 min.

Im Anschluss wurden die Membranen entweder in 5% Milchpulver in PBS-T (Actin, Gapdh, Htt) oder 1% BSA in PBS-T (pS6) für 30 min geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C im entsprechenden Blockingpuffer in der Antikörperkonzentration 1:1000. Anschließend wurden die Membranen dreimal mit PBS-T für 5 min

gewaschen. Die Inkubation des entsprechenden sekundären Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish peroxidase, HRP)-konjugierten Antikörpers erfolgte bei RT für ca. eine Stunde im entsprechenden Blockingpuffer im Verhältnis 1:6000. Im Anschluss wurden die Membranen erneut dreimal mit PBS-T gewaschen. Detektiert wurde mit dem Western Lightning Plus ECL Kit (PerkinElmer Inc.) nach den Angaben des Herstellers unter einem ChemiDoc MP Imaging System und mit der Software Image Lab von Biorad.

2.2.14 *In utero* Elektroporation

Als Vorbereitung wurden die zu elektroporierenden Plasmidkonstrukte in einer Konzentration von 1,5 µg/µl mit PBS verdünnt und zudem mit dem fluoreszenzmarkierten Kontrollplasmid pCAGGS-GFP (0,5 µg/µl) 1:5 gemischt. Als Sichtkontrolle bei Injektion und Elektroporation diente Fastgreen.

Trächtige C57BL/6J-Weibchen mit Embryonen im Stadium E13 wurden mit Isofluran betäubt und auf einer 37°C warmen Heizplatte an den Extremitäten fixiert. Das Tier wurde mit einem Tuch bedeckt, das den Zugriff auf das Abdomen zuließ. Das Tuch wurde mit bakteriostatischem Wasser beträufelt, welches 0,9% NaCl und 0,9% Benzylalkohol als Konservierungsmittel enthält. Das Abdomen wurde mit 70%igem EtOH desinfiziert. Ein konstanter Fluss eines Isofluran/Sauerstoff-Gemisches gewährleistete eine Betäubung des Tieres während des gesamten Eingriffs. Die Bauchdecke wurde geöffnet und der Uterus freigelegt. Die nun sichtbaren Embryonen wurden vorsichtig herausgezogen und um die geöffnete Bauchdecke herum platziert. Zum Schutz vor Austrocknung wurden alle Embryos mit bakteriostatischem Wasser beträufelt. Mit einer Mikropipette wurden die Plasmidkonstrukte in einem Volumen von etwa 1-1,5 µl in einen der lateralen Ventrikel injiziert. Anschließend wurde mit Elektroden eine Spannung von 35 V für einige Sekunden angelegt, was dazu führte, dass sich die negativ geladene DNA in Richtung Anode bewegte. Bei richtig angelegten Elektroden wurden die Plasmide

demnach in den Bereich des Neocortex transferiert.

Schließlich wurden die Embryonen wieder in das Muttertier gelegt und die Bauchdecke zugenäht. 48h später wurde die Mutter durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen (E15) entnommen und die Hirne herauspräpariert. Diese wurden nun fixiert und für die Immunhistochemie vorbereitet (siehe Kapitel 2.2.15).

2.2.15 Immunhistochemie (IHC)

2.2.15.1 Erstellung von Hirnschnitten

Nach Entnahme der adulten oder embryonalen Gehirne, konnten diese nun entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und verwahrt oder direkt verarbeitet werden. Für die Erstellung von sagittalen adulten Hirnschnitten wurden zunächst die beiden Hemisphären durch einen sagittalen Schnitt voneinander getrennt. Adulte und embryonale Hirne wurden dann sofort in 15 ml 4°C kaltes Paraformaldehyd (PFA) überführt und über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurde das PFA abgenommen und entsorgt und die Hirne in 15 ml 4°C kalte 15%ige Sucroslösung (in PBS) gegeben zum osmotischen Entzug von Wasser. Als die Hirne in der Lösung abgesunken waren, wurden sie in 15 ml 4°C kalte 30%ige Sucroslösung (in PBS) überführt, bis sie abgesunken waren. Anschließend wurden sie für 10 min in 50/50 TissueTek/30% Sucroslösung bei RT gegeben. Danach erfolgte die Einbettung in TissueTek. Hierfür wurden die Hirne in ein Cryomoldschälchen gelegt und mit TissueTek übergossen (luftblasenfrei). Das Schälchen wurde dann auf Trockeneis mit 100% EtOH gelegt, bis das TissueTek festgefroren war. Die Lagerung der Hirne erfolgte bei -80°C.

Die Schnitte wurden an einem Leica CM1900 Kryostat nach Angaben des Herstellers angefertigt. Es wurden 10 µm dicke Sagittalschnitte (adulte Hirne) bzw. 20 µm dicke Coronalschnitte (embryonale Hirne) angefertigt und auf einem Objektträger für die spätere Färbung platziert. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei -20°C.

2.2.15.2 Fluoreszenzmarkierung

Alle Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt in einer Kammer mit in 1:1 H₂O:Formamid getränkten Zellstofftüchern. Zunächst wurden die Hirnschnitte auf dem Objektträger für 10 min mit TBS-T gewaschen. Durch die Formalinfixierung kann es sein, dass die Immunreaktivität des Gewebes durch Quervernetzungen der Proteine zum Teil verlorengeht (French and Edsall, 1945; Helander, 1994). Diese sogenannte Maskierung von Antigenen kann durch Retrieval-Lösungen wieder rückgängig gemacht werden (Antigendemaskierung oder Antigenretrieval) (Shi et al., 1991). Das Antigenretrieval erfolgte in 10 mM Natriumcitratpuffer bei 84°C für 40 min. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit TBS-T. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert, indem die Schnitte für 1h bei RT in 20% Schafserum inkubiert wurden. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden die primären Antikörper 1:200 in TBS-T vorbereitet und nach dem Blocken auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte unter Deckgläschen bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für 15 min mit TBS-T gewaschen. Die sekundären Antikörper wurden vorbereitet, 1:200 in TBS-T verdünnt und im Anschluss auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für ca. 3h bei RT. Im Anschluss wurde erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte in Fluoromount aqueous Mounting eingebettet und mit einem Deckgläschen fixiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Zur Detektion diente das Mikroskop DM 6000 CS von Leica.

2.2.16 Erstellung primärer Neuronen aus embryonalem Mausgewebe

2.2.16.1 Terminverpaarung

Für die Erstellung primärer Neurone wurden E14-Embryos benötigt. Um das Alter von Mausembryonen genau zu kennen, muss eine Terminverpaarung durchgeführt werden. Hierfür werden heterozygote Hdh150-Männchen und WT-Weibchen zu genau festgelegten Zeitpunkten zusammengesetzt und wieder getrennt. Nach

einigen Tagen wird ein Plugcheck durchgeführt, um festzustellen, ob das Weibchen trächtig ist. Ist das der Fall, kann auf den Tag genau festgelegt werden, wie alt die Embryonen sind. Die Terminverpaarungen wurden nach Anweisung von den Tierpflegern der TARC durchgeführt.

2.2.16.2 Präparation

Vor der Präparation der Neurone mussten am Vortag einige Vorbereitungen getroffen werden. Zunächst wurden Kulturplatten beschichtet (12-Well Format). Hierfür wurden die Platten mit je 1 ml Poly-L-Ornithin für 1-2h bei 37°C inkubiert. Dann wurde dieses abgesaugt und die Platte einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit 1 ml Laminin + PBS über Nacht bei 4°C inkubiert und mit Parafilm verschlossen. Kurz vor Verwendung der Platten wurden diese zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit PBS befüllt.

Die trächtige Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet und die Bauchdecke mit EtOH desinfiziert. Alle Werkzeuge wurden in EtOH desinfiziert sowie zweimal in PBS und einmal in DMEM getunkt, um eine sterile und optimale Kontaktfläche zu schaffen. Das Bauchfell wurde v-förmig eingeschnitten und die Embryos mit der Plazenta abgetrennt. Die Plazenta wurde anschließend in einem Zug aufgeschnitten. Der Kopf der Embryos wurde abgetrennt und der Hirnschädel vom Gesichtsschädel mit zwei Pinzetten isoliert. Dann wurden die Gehirne isoliert, die Hemisphären vom Rest getrennt, die Hirnhäute entfernt und der Cortex isoliert. Dieser wurde in einem Falcon mit DMEM auf Eis gelagert. Von den Embryos wurde jeweils noch etwas Handgewebe entnommen, das für die Genotypisierung verwendet wurde.

Die Falcons wurden zentrifugiert (200 g, 3 min) und das DMEM abgesaugt. Danach erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Trypsin und eine Inkubation von 6 min bei 37°C. Anschließend wurde 1 ml Stoppmedium (12 ml DMEM + 3 ml FBS) hinzugegeben und zentrifugiert (200 g, 3 min). Der Überstand wurde abgesaugt und 15 ml DMEM dazugegeben. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Im Anschluss wurde der

Überstand wieder abgenommen und diesmal 1 ml Kulturmedium (48,5 ml Neurobasalmedium + 1 ml B27 mit VitA + 0,5 ml Glutamax) dazugegeben. Nun wurde häufig resuspendiert und im Anschluss noch 2-6 ml Kulturmedium dazugegeben. Die Zellen wurden nun zu 1 ml auf die vorbereiteten Platten pipettiert (vier Wells pro Embryo) und bei 37°C und 8% CO₂ inkubiert.

Die Genotypisierung der Embryonen erfolgte nach Extraktion der DNA gemäß Kapitel 2.2.10.

Nach fünf Tagen Kultivierung der primären Neuronen wurde die Hälfte der WT- und die Hälfte der Hdh150-Zellen mit 2,5 mM Metformin behandelt. Dafür wurde eine 100x Stocklösung in Kulturmedium vorbereitet und davon 10 µl in jeden zu behandelnden Well pipettiert und gut gemischt. 24h nach dem Start der Behandlung wurden die Zellen in PBS abgeschabt, alle zu einem Embryo gehörenden Zellen gepoolt und gemäß Kapitel 2.2.11 Proteinlysate erstellt. Die Auswertung des Versuchs erfolgte durch Westernblotanalyse.

2.2.17 Metformin-Applikationen *in vivo*

2.2.17.1 Orale Applikation

Die orale Applikation von Metformin erfolgte über das Trinkwasser. Jeden Tag wurden 5 mg/ml Metformin in das Trinkwasser gegeben. Das Trinkverhalten wurde überwacht, indem die Trinkflasche vorher und nachher gewogen wurde. Die Differenz wurde durch die Anzahl der Mäuse dividiert, die in einem Käfig gehalten wurde, um so einen Durchschnittswert zu ermitteln, den jede einzelne Maus zu sich genommen hat.

2.2.17.2 Injektionen

Die Injektionen erfolgten unter Narkose in den visuellen Cortex. Hierfür wurden die

Mäuse zunächst mit Isofluran betäubt und dann in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Eine konstante Gabe eines Sauerstoff/Isofluran-Gemisches sorgte für anhaltende Betäubung der Maus. Nachdem der Schädel freigelegt wurde und das Bregma detektiert worden war, wurde der visuelle Cortex lokalisiert mit den stereotaktischen Koordinaten 3,2 mm posterior zum Bregma und 2,3 mm lateral zur Mittellinie. Ein kleines Loch wurde gebohrt und eine Injektionsnadel in die fünfte Schicht des visuellen Cortex gesenkt. 1,5 µl einer aquatischen Lösung mit 10 mg/ml Metformin wurde mit einer Geschwindigkeit von maximal 100 nl/min injiziert. Anschließend wurde die Nadel etwas angehoben in die Schicht 2/3 und weitere 1,5 µl wurden injiziert. Die Nadel wurde nach der Injektion noch weitere 5 min im Gewebe gelassen und anschließend langsam entfernt. Die Kopfhaut der Maus wurde zugenäht und das Tier zum Aufwachen in seinen Käfig zurückgelegt. In Wasser getränkte Futterpellets sollten die Nahrungsaufnahme des geschwächten Tieres erleichtern und für ausreichende Hydratation sorgen. Eine Heizplatte unter dem Käfig sorgte für eine angenehm warme Temperatur. 24h später wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet, das Gehirn entnommen und das Gewebe um die Injektionsstelle herum sowie das entsprechende Gewebe der kontralateralen Hemisphäre entfernt und Proteinlysate erstellt (siehe Kapitel 2.2.12).

2.2.18 Verhaltensexperimente

Alle hier durchgeführten Verhaltensexperimente wurden mit Mäusen im Alter von 12 Wochen durchgeführt. Eine Ausnahme bildet der VD, bei dem aus organisatorischen Gründen Mäuse im Alter von 13-16 Wochen eingesetzt wurden.

Bevor eine Maus in einen Versuchsaufbau gesetzt wurde, wurde sie zuvor jedes Mal in eine Holdingbox gesetzt. Dies diente zum Gewöhnen an die bevorstehende Prozedur und erzielte aktivere Teilnahme an den Experimenten. Sämtliche Versuchsgegenstände (Versuchsbox, Objekte etc.) wurden vor jedem Durchgang sorgfältig mit 70% EtOH gereinigt und getrocknet, um eine olfaktorische Manipulation des Versuchs zu verhindern. Um eventuellen Präferenzen vor allem beim Social

Interaction Test (SI) oder Novel object recognition Task (NORT) vorzubeugen, wurden Genotypen, unbekannte Objekte sowie Objekt- oder Interaktionsmausstandorte untereinander ausgleichend variiert (counterbalancing).

2.2.18.1 Visual Discrimination Task (VD)

WT- und Hdh150-Mäuse im Alter von 13-16 Wochen wurden unter Futterentzug für 24h in Einzelkäfige gesetzt. Vorher und nachher und an jedem Folgetag des Experiments wurde das Gewicht gemessen und ggf. Futterpellets verabreicht, damit das Gewicht 75-85% vom Ausgangsgewicht der jeweiligen Maus betrug und verblieb. Das Experiment bestand aus drei Phasen:

1. Habituation: Am ersten Tag nach Futterentzug wurden die Mäuse in eine Kammer mit einem Touchscreen (Abbildung 8) auf der einen und einem Futterspender auf der gegenüberliegenden Seite gesetzt. Sie hatten nun 30 min Zeit sich in der Kammer aufzuhalten. Jedes Mal, wenn sie ihre Nase in den Futterspender hielten, wurde diese Bewegung vom Programm K-Limbic registriert, gezählt und ein Futterpellet freigegeben. Diese Session wurde am gleichen Tag für jede Maus noch einmal wiederholt.
2. Touch Training: Am nächsten Tag sollten die Mäuse lernen, das Pellet erst zu bekommen, wenn sie den aufleuchtenden Touchscreen auf der gegenüberliegenden Seite berührten. Ein Trial bestand aus Berühren und Abholen des Futterpellets aus dem Spender; nach der Berührung wurde der Touchscreen dunkel und leuchtete erst wieder, wenn das Pellet geholt wurde. Eine Session dauerte entweder 30 min oder 70 Trials, je nachdem, was zuerst erreicht wurde. Das Touch Training war beendet, sobald die Mäuse an drei aufeinander folgenden Tagen 70 Trials innerhalb der 30 min beendet hatten.
3. Visual Discrimination: Der Touchscreen war nun durch eine davorgeschiebene Leiste nur noch durch zwei Fenster zu erreichen. Das Programm K-Limbic steuerte zufallsbedingt unterschiedliche Leuchtstärken (schwarz und weiß, Abbildung 7, Kombination 1) auf jeder Seite. Die hellere Leuchtstärke (weiß)

war immer die richtige Wahl. Die Mäuse bekamen nur nach der richtigen Wahl eine Belohnung in Form eines Futterpellets. Jede Session dauerte entweder 30 min oder 100 Trials, wobei auch die falschen Entscheidungen als Trial gezählt wurden. Es wurde angenommen, dass die Mäuse diesen Test bestanden hatten, sobald sie an drei aufeinanderfolgenden Tag 70% der Trials korrekt absolviert hatten.

Diese Phase wurde erweitert durch einen höheren Schwierigkeitsgrad, der sich durch zwei weniger stark unterschiedliche Leuchtstärken auszeichnete (schwarz und grau, Abbildung 7, Kombination 2).

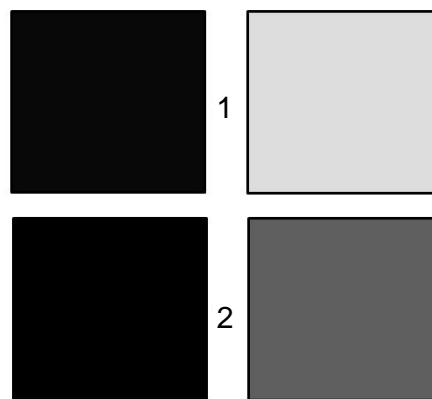


Abbildung 7: Anzeigoptionen für den Touchscreen. Kombination 1: Schwarz/weiß, Kombination 2: Schwarz/grau

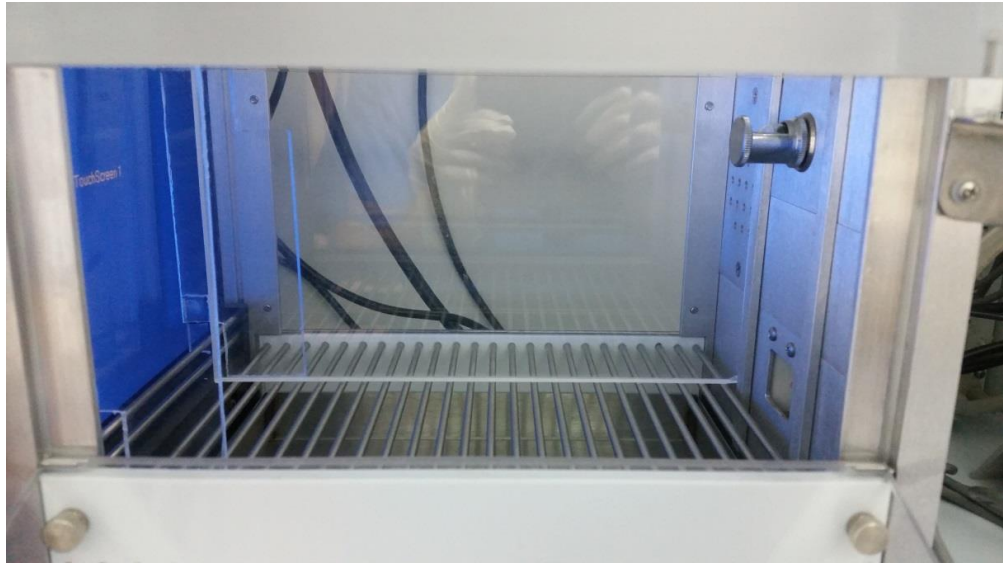


Abbildung 8: Setup für den VD, links der Touchscreen, rechts der Futterspender.

2.2.18.2 Social Interaction (SI) - Sequentielle Exposition zu leerem Käfig und Käfig mit Interaktionsmaus

Behandelte und nicht behandelte WT- und Hdh150-Mäuse wurden zur Habituation für 2,5 min in eine Box gesetzt, in der ein leerer Experimentalkäfig stand (Schema, Abbildung 9). Um den Käfig herum wurde eine Zone definiert im Abstand zum Käfig von etwa einer Mauslänge (ohne Schwanz). Anschließend wurden die Mäuse kurz herausgeholt und zwischenzeitlich in eine Holdingbox gesetzt. In den Experimentalkäfig wurde nun eine Interaktionsmaus gesetzt. Wieder wurde die zu testende Maus für 2,5 min. in die Box gesetzt. Gemessen wurde die Zeit, die sie in der Zone rund um den Experimentalkäfig verbrachte. Die Zeit wurde automatisch mithilfe des Programms EthoVision dokumentiert, sobald sich der Center Point der Maus in der jeweiligen Zone befand. Es wurden immer zwei Mäuse (in verschiedenen Boxen) parallel aufgenommen.

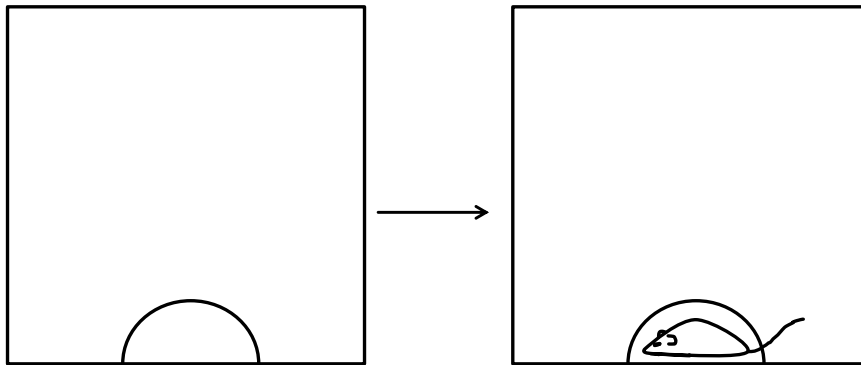


Abbildung 9: Schematische Darstellung und zeitlicher Ablauf der sequentiellen Exposition zu leerem Käfig und Käfig mit Interaktionsmaus.

2.2.18.3 Social Interaction (SI) – 3-Teile Kammer

Behandelte und nicht behandelte WT- und Hdh150-Mäuse wurden zur Habituation für 5 min in die mittlere Kammer der 3-Teile Kammer zur Habituation gesetzt (Schema, Abbildung 10). Die Durchgänge zu den äußeren Kammern wurden versperrt. In den Ecken der äußeren Kammern befanden sich leere Experimentalkäfige. Nach der Habituation wurde in einen der beiden Käfige eine Interaktionsmaus gesetzt. Die Durchgänge wurden geöffnet und die Test-Maus konnte sich für 10 min frei im Versuchsaufbau bewegen. Jede Kammer bildete eine Zone. Die Zeit wurde automatisch mithilfe des Programms EthoVision dokumentiert, sobald sich der Center Point der Maus in der jeweiligen Zone befand. Es wurden immer zwei Mäuse (in verschiedenen Boxen) parallel aufgenommen.

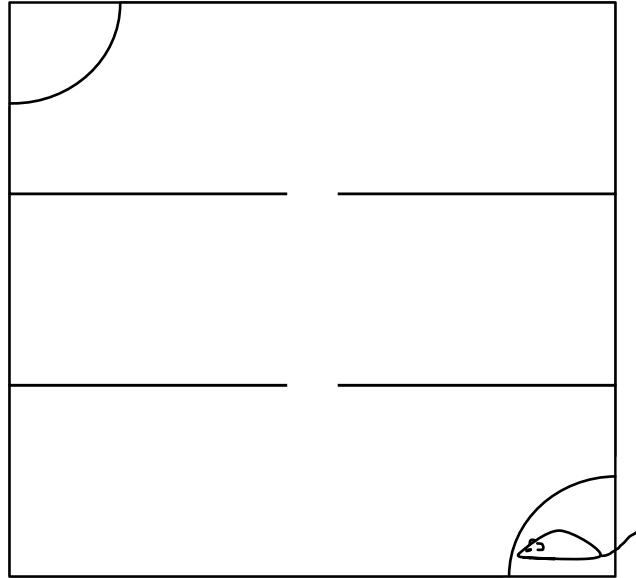


Abbildung 10: Schematische Darstellung der 3-Teile Kammer.

2.2.18.4 Elevated Plus Maze (EPM)

Behandelte und nicht behandelte WT- und Hdh150-Mäuse wurden nacheinander für 5 min in die Mitte des EPMS gesetzt und konnten sich innerhalb der Apparatur frei bewegen. Gemessen wurde die Zeit, die sie in den geschlossenen und offenen Armen verbrachten (Abbildung 11). Die Zeit wurde automatisch mithilfe des Programms EthoVision dokumentiert, sobald sich der Center Point der Maus in der jeweiligen Zone befand.

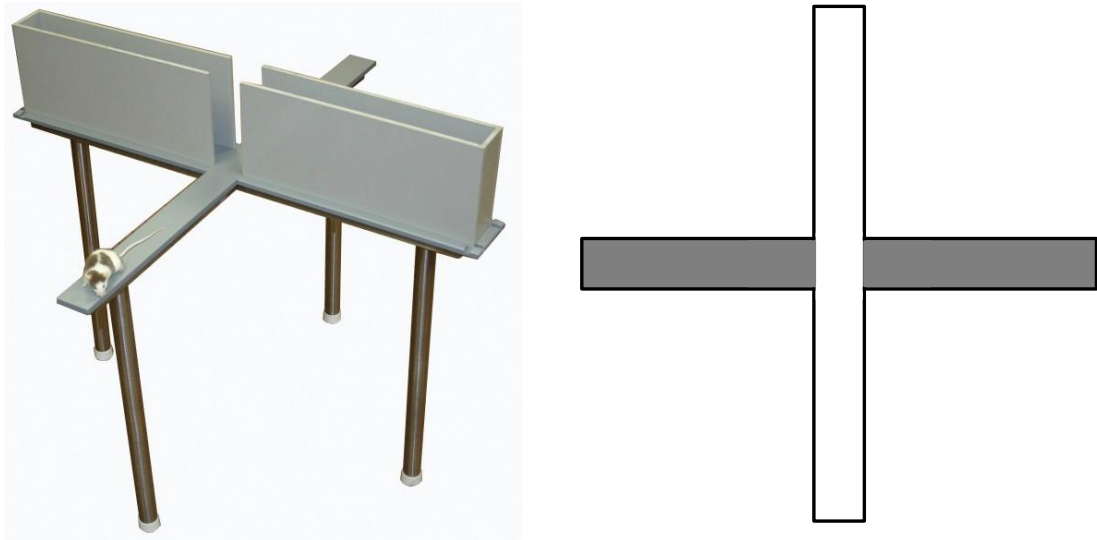


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Elevated Plus Maze (linke Abbildung von: <https://www.stoeltingco.com/elevated-plus-maze.html>)

2.2.18.5 Open Field Test (OF)

Behandelte und nicht behandelte WT- und Hdh150-Mäuse wurden nacheinander für 5 min in eine leere Box gesetzt, in der sie sich frei bewegen konnten. Zuvor wurde in EthoVision eine Zone definiert, die das Zentrum der Box darstellte, in einem Abstand von 10 cm von jeder Wand (Schema, Abbildung 12). Die Zeit wurde automatisch mithilfe des Programms EthoVision dokumentiert, sobald sich der Center Point der Maus in der Zone befand. Es wurden immer zwei Mäuse (in verschiedenen Boxen) parallel aufgenommen.

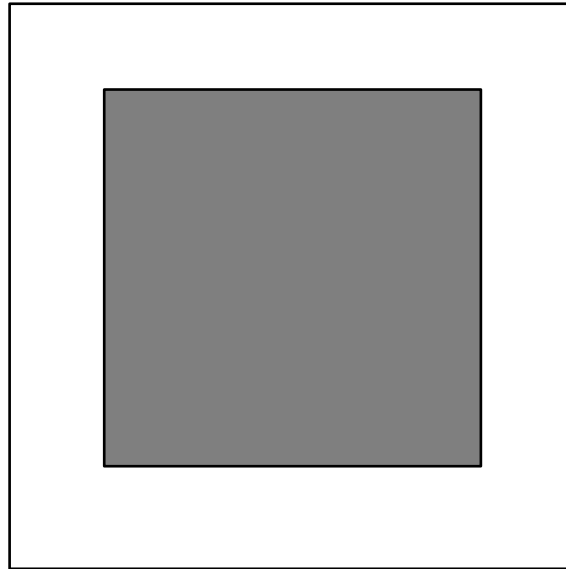


Abbildung 12: Schematische Darstellung des OF. Graues Quadrat zeigt definiertes Zentrum.

2.2.18.6 Novel Object Recognition Task (NORT)

Behandelte und nicht behandelte WT- und Hdh150-Mäuse wurden am ersten Tag an den Experimentator gewöhnt, indem man sie behutsam aus ihrem Käfig nahm und sich mit Ihnen für ca. 15 min beschäftigte. Anschließend wurden sie zur weiteren Habituation in ihren Käfiggruppen in eine leere Box gesetzt, die sie für 15 min erkunden konnten. Am zweiten Tag wurden sie einzeln für 10 min in die Box gesetzt. Am dritten Tag wurden zwei identische Objekte in der Box postiert und die Mäuse wieder einzeln in die Box gesetzt. Sie hatten nun wieder 10 min Zeit, die Box und die beiden Objekte zu erkunden. Abbildung 13 zeigt beispielhaft einige dieser Objekte. Alle Objekte waren geruchsneutral, aus bissfestem Material, in mindestens einer Raumdimensionen größer als eine Bl/6-Maus und erkletterbar, so dass die Mäuse darauf sitzen konnten. Am vierten Tag wurde diese Habituation in exakter Weise wiederholt. Am fünften Tag wurde nun eines der beiden bekannten Objekte durch ein vollkommen neues ersetzt. Bei Objektkombinationen wurde darauf geachtet, dass die

Objekte ungefähr dieselbe Größe und Komplexität besaßen, aber aus unterschiedlichem Material bestanden. Wieder wurden die Mäuse nacheinander für 10 min in die Box gesetzt, in der sie sich frei bewegen und alles erkunden konnten (Schema in Abbildung 14). Die Zeit, in der sie sich mit den Objekten beschäftigten wurde diesmal manuell vom Experimentator gemessen. Hierzu wurden die aufgenommenen Videos im Anschluss an das Experiment kryptisch benannt, um den Experimentator für den jeweiligen Genotyp und die Behandlungsweise blind zu machen. Die Zeit wurde manuell gemessen, da das Programm EthoVision zwar sehr gut erkennen kann, ob die Maus sich in einem Radius um das entsprechende Objekt aufhält, aber nicht unterscheiden kann, ob sie tatsächlich Interesse daran zeigt oder sich beispielsweise nur in dessen Nähe putzt. Auch das Klettern auf die Objekte bei offensichtlichem Umherschauen wird im Allgemeinen nicht als Interesse an einem Objekt gewertet (zusammengefasst in (Ennaceur, 2010)). Mäuse, die generell zu wenig oder gar kein Interesse an den Objekten hatten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Bilsland et al., 2008; Ennaceur and Delacour, 1988; Langston and Wood, 2010). Anschließend wurde ein Discrimination Index berechnet, der zwischen -1 und 1 schwanken kann, wobei ein Wert von 0 keine Präferenz für eines der beiden Objekte und ein Wert >0 eine Präferenz für das neue, unbekannte Objekt bedeutet. Ein negativer Wert würde bedeuten, dass sich die Maus für das alte Objekt mehr interessiert, jedoch ist das für keine der untersuchten Gruppen zu erwarten.

$$\text{Discrimination index} = \frac{\text{Zeit (neues Objekt)} - \text{Zeit (bekanntes Objekt)}}{\text{Zeit (neues Objekt)} + \text{Zeit (bekanntes Objekt)}}$$

Objekte und Standorte der Objekte wurden über die Genotypen und Behandlungsweisen ausgleichend variiert (counterbalancing).



Abbildung 13: Beispielhafte Auswahl der eingesetzten Objekte.

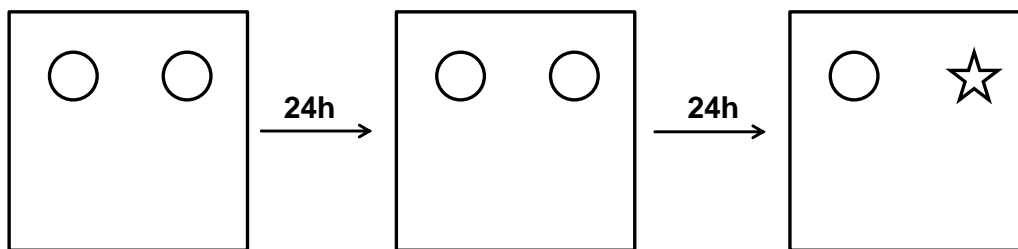


Abbildung 14: Schematische Darstellung und zeitlicher Ablauf des NORT.

2.2.19 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Wegen der z. T. sehr niedrigen Probenanzahl wurde für alle Westernblotanalysen Normalverteilung angenommen. Diese wurde mithilfe des Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstests in einer beispielhaften Westernblotanalyse mit genügend großer Probenanzahl geprüft. Die Auswertung aller Westernblotanalysen erfolgte anschließend unter Verwendung eines

Zweistichproben-t-Tests.

Alle weiteren Daten wurden mithilfe des Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstests auf Normalverteilung geprüft. War Normalverteilung gegeben, erfolgte die Auswertung mittels parametrischer Tests (Zweistichproben-t-Test bzw. two-way ANOVA in zeitlichen Verläufen). Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte die Auswertung mittels nicht-parametrischer Tests (Mann-Whitney-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test in zeitlichen Verläufen). Ein p-Wert $<0,05$ verwirft die Nullhypothese H_0 (H_0 : kein Gruppenunterschied).

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Als Darstellung des statistischen Fehlers wurde der Standardfehler angegeben, Ausnahmen wurden in den Abbildungslegenden beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 MID1 in Zellproliferation und –migration

Basierend auf früheren Studien, die zeigten, dass MID1 einen Einfluss auf die Proliferation hat (Xie et al., 2015; Yang et al., 2016), sollte ein Proliferationsassay zeigen, ob Zellen mit einer *MID1*-Mutation, bzw. einem KD oder einer ÜE von *MID1*, schneller oder langsamer proliferieren, als eine Kontrolle ohne entsprechenden *MID1*-Defekt. Zudem sollte sichergestellt werden, ob ein möglicher Migrationseffekt durch einen potenziellen Proliferationseffekt beeinflusst wird. Da es sich beim OS um eine Neurokristopathie handelt, also eine Anomalie der Neuralleistenentwicklung und die Neuralleistenzellen während der Embryogenese eine epithelial-mesenchymale Transition durchlaufen, um zu bestimmten Zielregionen im Embryo zu wandern (Kalluri and Weinberg, 2009), liegt die Vermutung nahe, dass Zellen, die einen *MID1*-Defekt aufweisen, einen Migrationsdefekt haben könnten. Ein Migrationsdefekt sollte im Folgenden durch einen Migrationsassay überprüft werden.

3.1.1 Fibroblasten

Für den Proliferationsassay wurden Fibroblastenzellen der Linien 17/98 mit einer 4bp-Deletion im Exon 9 des *MID1*-Gens (c.1801_1804delCTCC) eines Feten mit OS und 18/98, einer alters- und geschlechtsangepassten Kontrolle ohne *MID1*-Mutation, ausgesät und zweimal täglich die Lumineszenz gemessen nach Zugabe einer Ultra-Glo rLuciferase, durch die Luciferin unter ATP-Verbrauch zu Oxyluciferin oxidiert. Anschließend wurden alle Werte auf den Mittelwert des ersten Messpunkts (0h) normalisiert. Der Proliferationsassay ergab für die Fibroblastenlinie 17/98 keinen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten 18/98 (Abbildung 15). Das bedeutet, dass die hier vorliegende 4bp-Deletion c.1801_1804delCTCC im *MID1*-Gen keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten hat. Die Patientenzellen proliferieren laut dieser Ergebnisse

somit in gleicher Weise wie die Kontrollzellen.

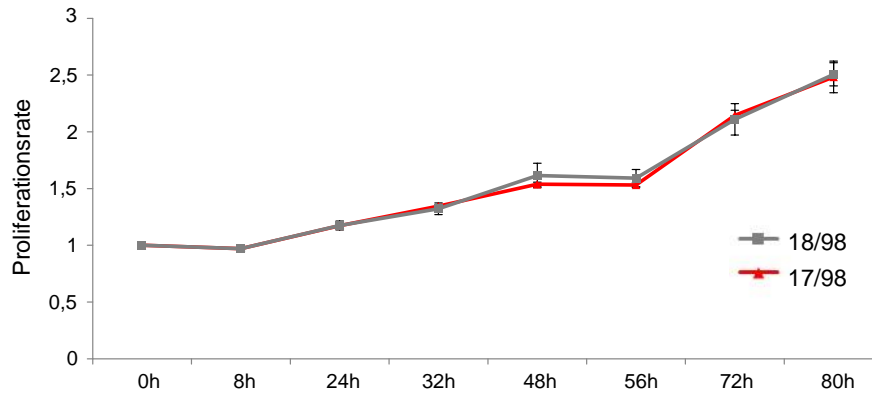


Abbildung 15: Ergebnisse des Proliferationsassays von Fibroblasten mit (17/98) und ohne *MID1*-Mutation (18/98). Die Proliferationsrate der Fibroblasten 17/98 zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen. Als Darstellung des statistischen Fehlers wurde die Standardabweichung gewählt ($p=0,6896$, two-way ANOVA, $N_{17/98}=4$, $N_{18/98}=4$).

Für den Migrationsassay wurden ebenfalls Fibroblastenzellen der Linien 17/98 und 18/98, in ein Culture Insert (ibidi) ausgesät und über 24h kultiviert. Ein zufälliger Punkt zwischen den Zellfronten wurde für die Bildmarkierung gewählt und markiert, damit an unterschiedlichen Tagen der gleiche Bildausschnitt dokumentiert werden konnte. Nach 24h wurde das Insert entfernt und damit die Migration gestartet. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde der Migrationsfortschritt dokumentiert und nach vollständiger Migration quantifiziert. Da sich eine Zellzählung aufgrund der länglichen Form der Fibroblasten mit ImageJ als sehr schwierig und ungenau erwies, wurde die Quantifizierung über die Dichte der Zelleinwanderung in den Spalt vorgenommen und in Prozent des Dichtesignals vor dem Hintergrund angegeben. Der Migrationsassay mit den Fibroblastenlinien 17/98 und 18/98 ergab einen schwachen Unterschied im Migrationsverhalten. Die Fibroblastenlinie 17/98 mit *MID1*-Mutation migrierte etwas langsamer im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrolle 18/98. Jedoch ergab dieses Ergebnis zu keinem Zeitpunkt eine Signifikanz (Abbildung 17). Zusätzlich wurde beobachtet, dass sich die Morphologie der beiden Zelllinien deutlich voneinander unterschied. Die Zellen der 17/98-Linie wiesen

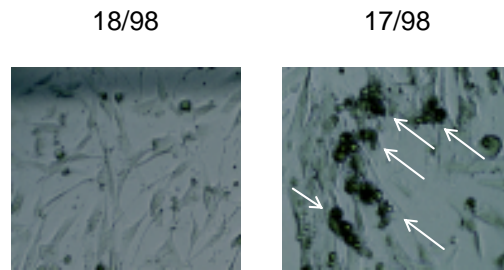


Abbildung 16: Morphologische Unterschiede der 17/98- und 18/98-Fibroblastenzelllinien. Einzelne Zellen der 17/98-Zelllinie lagern sich zusammen.

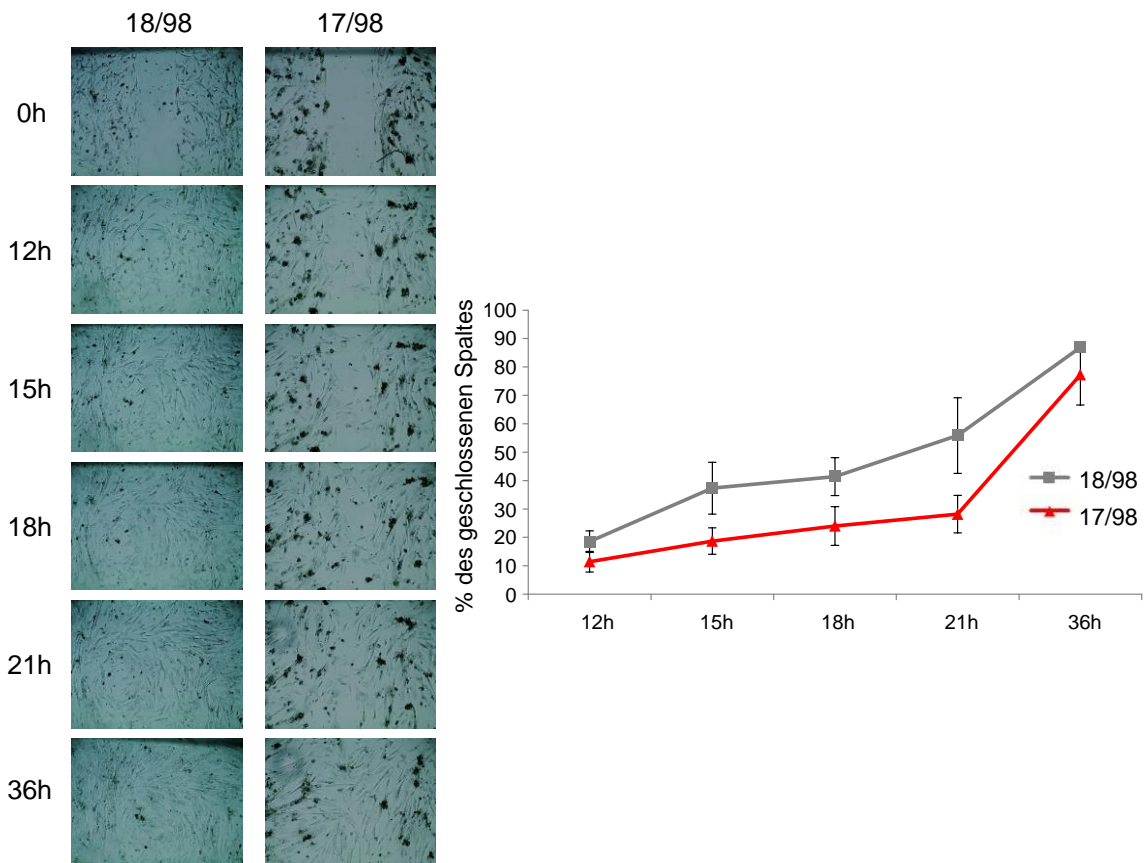


Abbildung 17: Ergebnisse des Migrationsassays von Kontroll- (18/98) und Patientenfibroblasten (17/98). Links: Beispielhafte Darstellung des Migrationsassays einer Kontrolle und einer Patientenzelllinie. Rechts: Quantifizierung des zeitlichen Verlaufs der Migration. Zu keinem Zeitpunkt gab es signifikante Unterschiede im Migrationsverhalten. ($p=0,1519$, two-way ANOVA, $N_{17/98}=3$, $N_{18/98}=3$).

stärkere Zusammenlagerungen oder „Klumpen“ auf (Abbildung 16). Die Zellen hatten zum Zeitpunkt des Versuchs allerdings bereits eine relativ hohe Passage von p23, was einen Einfluss auf die Morphologie erklären könnte.

3.1.2 HeLa-Zellen - Knockdown

Für den *MID1*-KD in HeLa-Zellen wurden kommerzielle siRNAs von Qiagen verwendet (scr, MID1-8 und MID1-9). Es wurden HeLa-Zellen ausgesät und mit Oligofectamine von Invitrogen entweder scr-Oligonukleotide oder beide *MID1*-Oligonukleotide transfiziert. 24h nach Transfektionsstart wurde der KD mit einer Westernblotanalyse überprüft und die Zellen neu für den Proliferationsassay ausgesät. Somit wurde der erste Messpunkt (0h) 24h nach dem Transfektionsstart gemessen. Der KD mit komplementären siRNA-Oligonukleotiden zur Stilllegung des *MID1*-Gens ergab im Westernblot eine Effektivität von etwa 65% (Abbildung 18a). Die weiteren Messpunkte des Proliferationsassays wurden 32h, 48h, 56h, 72h und 80h nach Transfektionsstart genommen. Das Ergebnis ergab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterscheid zwischen siRNA-KD und unspezifischer scr-siRNA (Abbildung 18b). Das bedeutet, dass in diesem Fall kein Hinweis darauf besteht, dass eine Reduktion des MID1-Proteins um 65% einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat.

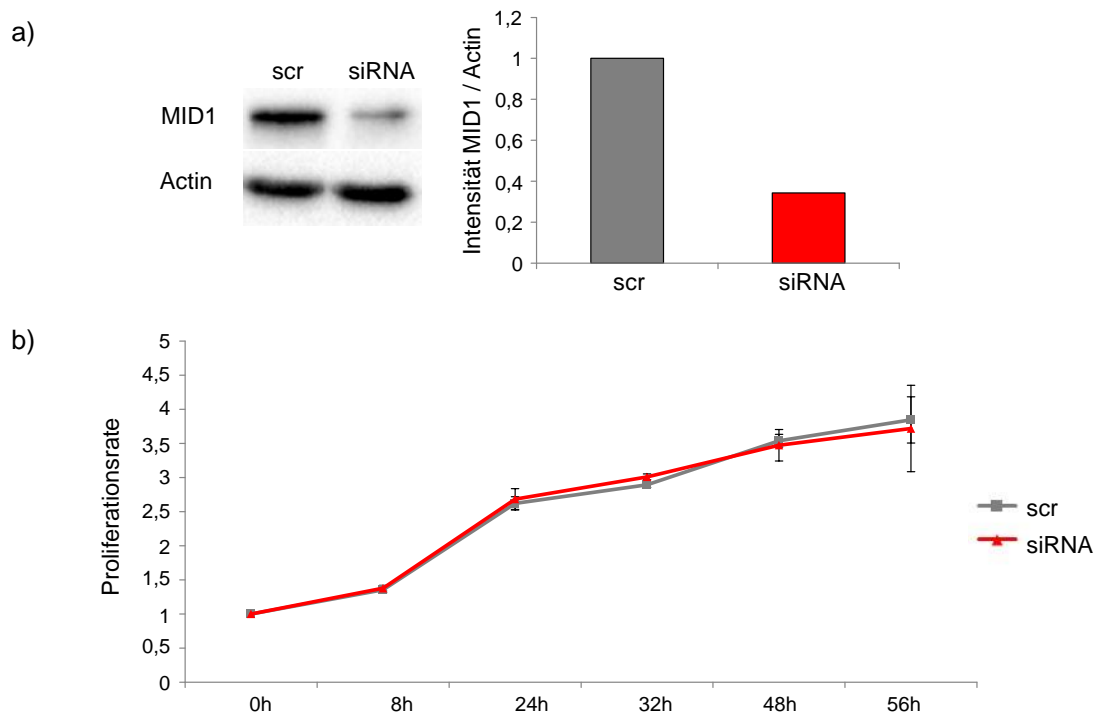


Abbildung 18: Ergebnisse des Proliferationsassays von Kontrolle (scr) und *MID1*-KD in HeLa-Zellen (siRNA). a: Westernblot und Quantifizierung des KD. b: Zeitlicher Verlauf der Proliferation. Keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten wurden gemessen. Als Darstellung des statistischen Fehlers wurde die Standardabweichung gewählt ($p=0,4411$, two-way ANOVA, $N_{scr}=4$, $N_{siRNA}=4$).

Für den Migrationsassay erfolgte der KD von *MID1* in HeLa-Zellen wie beim Proliferationsassay mit RNAi-Technik (s. o). Es wurden jedoch je Ansatz (scr, siRNA) drei Proben unabhängig voneinander transfiziert, um so drei biologische Replikate zu generieren. Diese wurden ebenfalls unabhängig voneinander auf Effizienz im Westernblot überprüft (Abbildung 19b). Zudem wurde die Effizienz zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen, um zu überprüfen, ob der KD zu einem späteren Zeitpunkt des Experiments noch gewährleistet war. Ein beispielhafter Verlauf des Migrationsassays zeigt Abbildung 19a. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageJ auf Basis der Zellzählung innerhalb des Spaltes (Abbildung 19c). Die Westernblotanalyse bestätigte, dass die *MID1*-Expression zu beiden gemessenen Zeitpunkten signifikant reduziert war (92% bzw. 45%). Dennoch wiesen

die Zellen zu keinem der gemessenen Zeitpunkte einen signifikanten Migrationsdefekt auf.

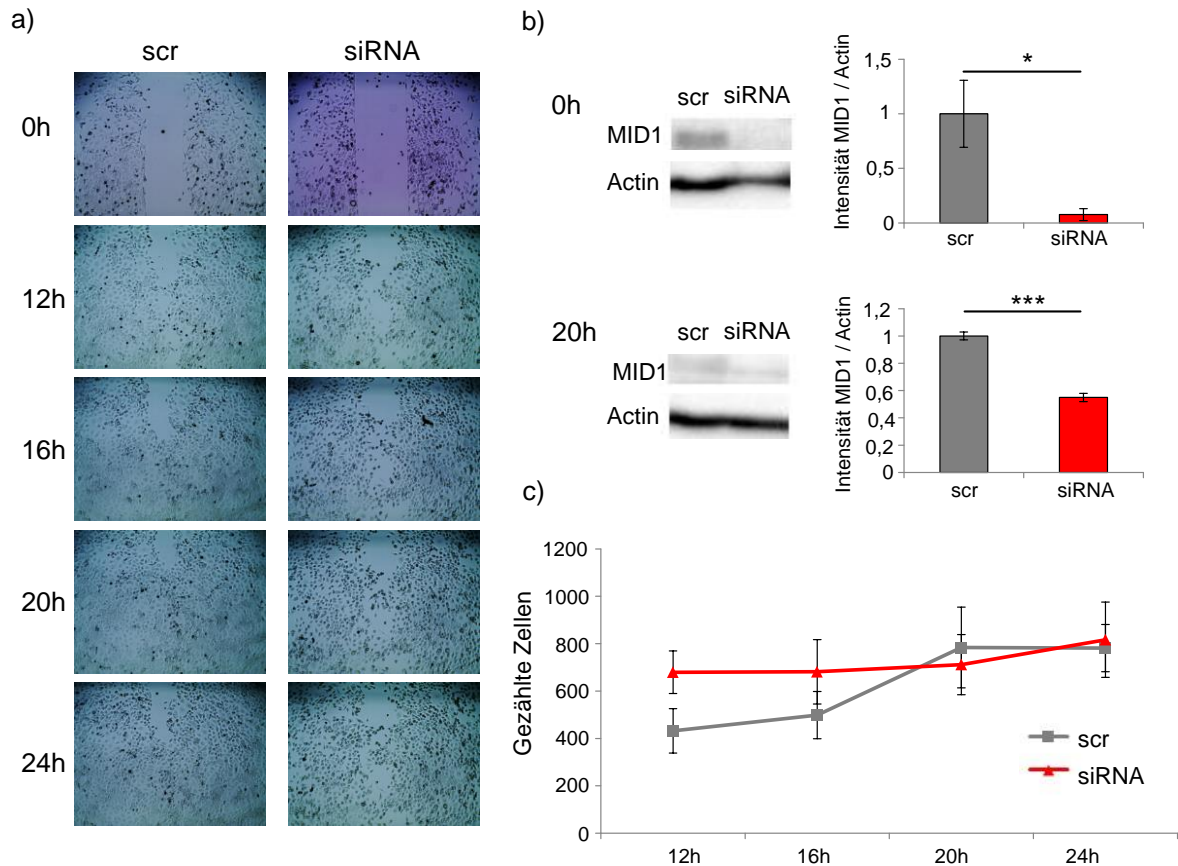


Abbildung 19: Ergebnisse des Migrationsassays von Kontrolle (scr) und *MID1*-KD in HeLa-Zellen (siRNA). a: Beispielhafte Darstellung des Migrationsassays einer Kontrolle und einem KD in HeLa-Zellen. b: Westernblot und Quantifizierung des KD. Zu beiden Zeitpunkten war der KD stabil und zeigte eine signifikante Reduktion der *MID1*-Expression (0h: $p=0,031$, 20h: $p=0,0004$, Zweistichproben-t-Test). c: Quantifizierung des zeitlichen Verlaufs der Migration. Zu keinem Zeitpunkt gab es signifikante Unterschiede im Migrationsverhalten ($p=0,6035$, two-way ANOVA, $N_{scr}=3$, $N_{siRNA}=3$).

3.1.3 HeLa-Zellen – Überexpression

Für die *MID1*-ÜE in HeLa-Zellen wurde ein *MID1*-cDNA-Konstrukt in den Vektor pCAG-IG kloniert. Es wurden HeLa-Zellen ausgesät und mit PolyFect von Qiagen entweder ein leerer pCAG-IG Vektor als Kontrolle oder der Vektor mit dem *MID1*-cDNA-Konstrukt transfiziert. 24h nach Transfektionsstart wurde der KD mit einer Westernblotanalyse überprüft und die Zellen neu für den Proliferationsassay ausgesät. Somit wurde der erste Messpunkt (0h) 24h nach dem Transfektionsstart gemessen. Die ÜE mit der *MID1*-cDNA ergab im Westernblot eine Effektivität von etwa 250% (Abbildung 20a). Die weiteren Messpunkte des Proliferationsassays wurden 32h und 48h nach Transfektionsstart genommen. Das Ergebnis ergab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterscheid zwischen Kontrolle (pCAG-IG leer) und überexprimiertem MID1 (pCAG-IG MID1) (Abbildung 20b). Das bedeutet, dass kein Hinweis darauf besteht, dass eine ÜE des MID1-Proteins um ca. 250% einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat.

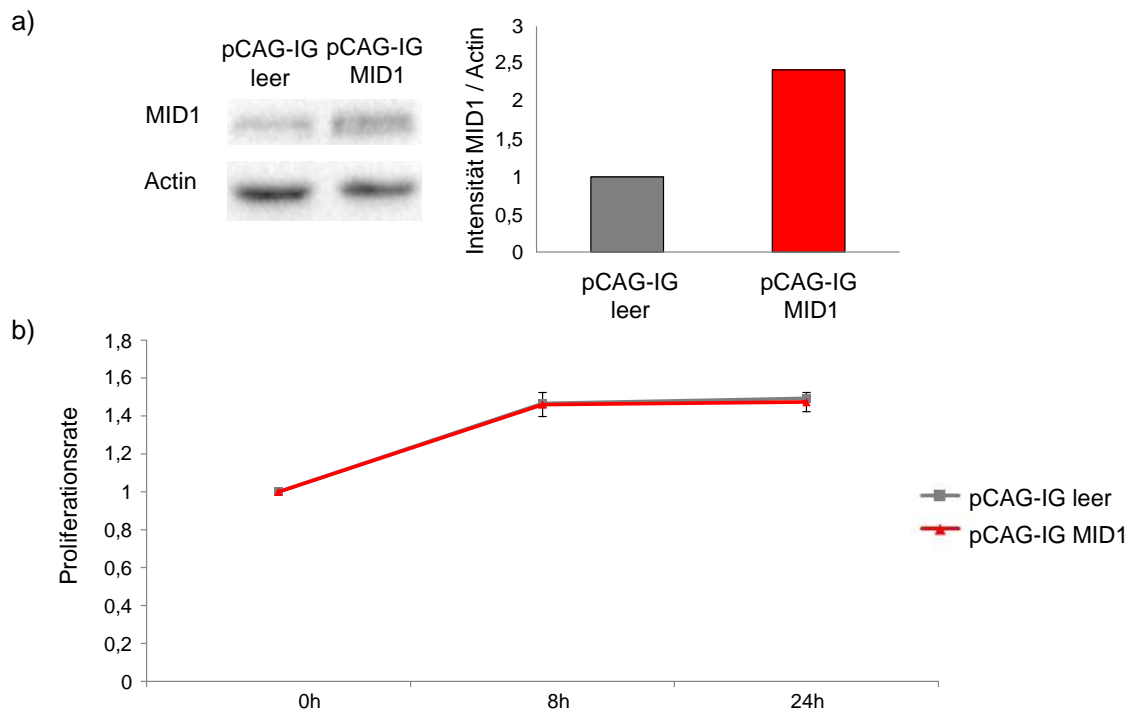


Abbildung 20: Ergebnisse des Proliferationsassays von Kontrolle (pCAG-IG leer) und *MID1*-ÜE in HeLa-Zellen (pCAG-IG *MID1*). a: Westernblot und Quantifizierung der ÜE. b: Zeitlicher Verlauf der Proliferation. Keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten wurden gemessen. Als Darstellung des statistischen Fehlers wurde die Standardabweichung gewählt ($p=0,4509$, two-way ANOVA, $N_{\text{pCAG-IG leer}}=4$, $N_{\text{pCAG-IG MID1}}=4$).

Die ÜE für den Migrationsassay erfolgte wie beim Proliferationsassay mit der *MID1*-cDNA in einem pCAG-IG Vektor. Als Kontrolle diente der leere pCAG-IG Vektor ohne *MID1*-Konstrukt. Für den Migrationsassay wurden auch hier wieder je Ansatz (leerer Vektor und *MID1*-Konstrukt) drei Proben unabhängig voneinander transfiziert, um so drei biologische Replikate zu generieren. Diese wurden ebenfalls unabhängig voneinander auf Effizienz im Westernblot überprüft (Abbildung 21b). Zudem wurde die Effizienz zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen, um zu überprüfen, ob die ÜE zu einem späteren Zeitpunkt des Experiments noch gewährleistet war.

Ein beispielhafter Verlauf des Migrationsassay zeigt Abbildung 21a. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageJ auf Basis der Zellzählung

innerhalb des Spaltes (Abbildung 21c). Die Westernblotanalyse bestätigte, dass nach Transfektion die Expression von *MID1* zu beiden gemessenen Zeitpunkten signifikant erhöht war (ca. 350% bzw. ca. 290%). Zudem war über den kompletten Zeitraum ein signifikanter Unterschied im Migrationsverhalten sichtbar; die *MID1*-überexprimierenden Zellen migrierten signifikant schneller als die Kontrollzellen.

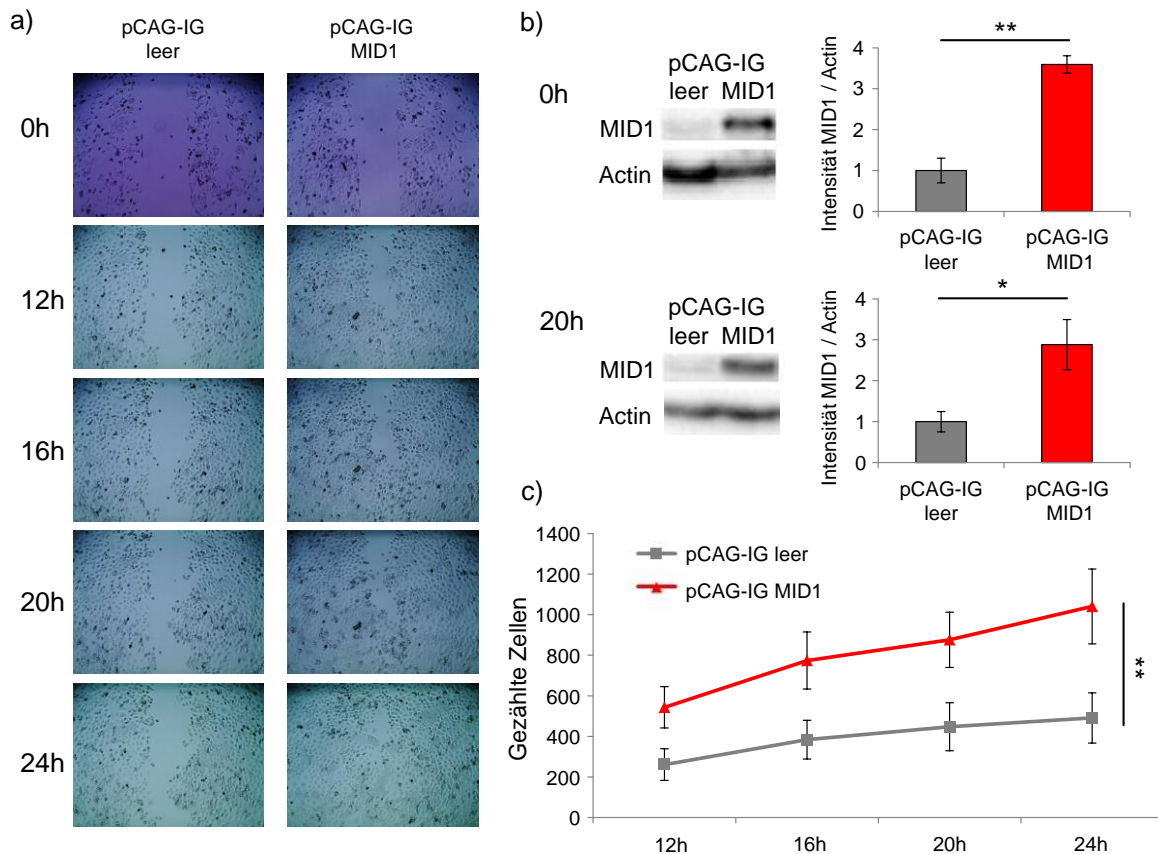


Abbildung 21: Ergebnisse des Migrationsassays von Kontrolle (pCAG-IG leer) und *MID1*-ÜE in HeLa-Zellen (pCAG-IG MID1). a: Beispielhafte Darstellung des Migrationsassays einer Kontrolle und einer *MID1*-ÜE in HeLa-Zellen. b: Westernblot und Quantifizierung der ÜE. Zu beiden Zeitpunkten war die ÜE stabil und zeigte eine signifikante Erhöhung der *MID1*-Expression (0h: $p=0,002$, 20h: $p=0,047$, Zweistichproben-t-Test). c: Quantifizierung des zeitlichen Verlaufs der Migration. Über den gesamten Zeitraum war die Migration der *MID1*-überexprimierenden Zellen signifikant schneller ($p=0,0072$, two-way ANOVA, $N_{\text{pCAG-IG leer}}=3$, $N_{\text{pCAG-IG MID1}}=3$).

3.2 *In utero* Elektroporation

Da in den *MID1*-überexprimierenden HeLa-Zellen ein erhöhtes Migrationsverhalten gegenüber den Kontrollzellen und in den Patientenfibroblasten zumindest ein deutlicher Trend zu einem verlangsamten Migrationsverhalten nachgewiesen werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob auch *in vivo* ein Migrationsdefekt auftritt, nachdem die Expression von *Mid1* erniedrigt wurde. Hierfür sollten Konstrukte in die ventrikuläre Zone des Neocortex von E13-Embryonen elektroporiert werden, um 48h später die Migration der hier entstehenden Neurone zu beobachten.

Zur Bestimmung eines potentiellen Migrationseffektes *in vivo* aufgrund eines *Mid1*-KD wurden Konstrukte elektroporiert, die DNA-Sequenzen enthielten, die für *Mid1* spezifische shRNAs kodieren. Diese Sequenzen wurden mithilfe der Online-Software Oligoengine 2.0 generiert, die die effektivsten Hybridisierungsstellen innerhalb eines Gens ermitteln kann. Die generierten Sequenzen entsprechen dem Sense-Strang, wodurch ein Antisense-Strang transkribiert werden kann, der mit der entsprechenden mRNA hybridisiert. Diese Konstrukte sowie eine unspezifische scr-Kontrolle wurden in einen p.Superior.puro-Vektor kloniert, der als Marker eine GFP-Sequenz enthält. Anschließend wurden die Proben in den Ventrikel von E13-Embryonen injiziert und anschließend in den Neocortex elektroporiert. Die Embryonen wurden dann für 48h zur weiteren Entwicklung in das Muttertier zurückgelegt. Im Anschluss wurden die Embryonen herausgeholt, dekaptiert und das Gehirn isoliert und eingefroren. Von den Hirnen wurden dann coronale Cryoschnitte angefertigt und anschließend immunhistochemisch fluoreszenzmarkiert. Die elektroporierten Zellen wurden durch die Visualisierung mit einem anti-GFP-Antikörper markiert. Zur Abgrenzung der verschiedenen Schichten wurden die Schnitte mit einem anti-Tbr1-Antikörper gefärbt. Tbr1 wird vor allem in der embryonalen CP exprimiert, nicht jedoch in der VZ (Hevner et al., 2001).

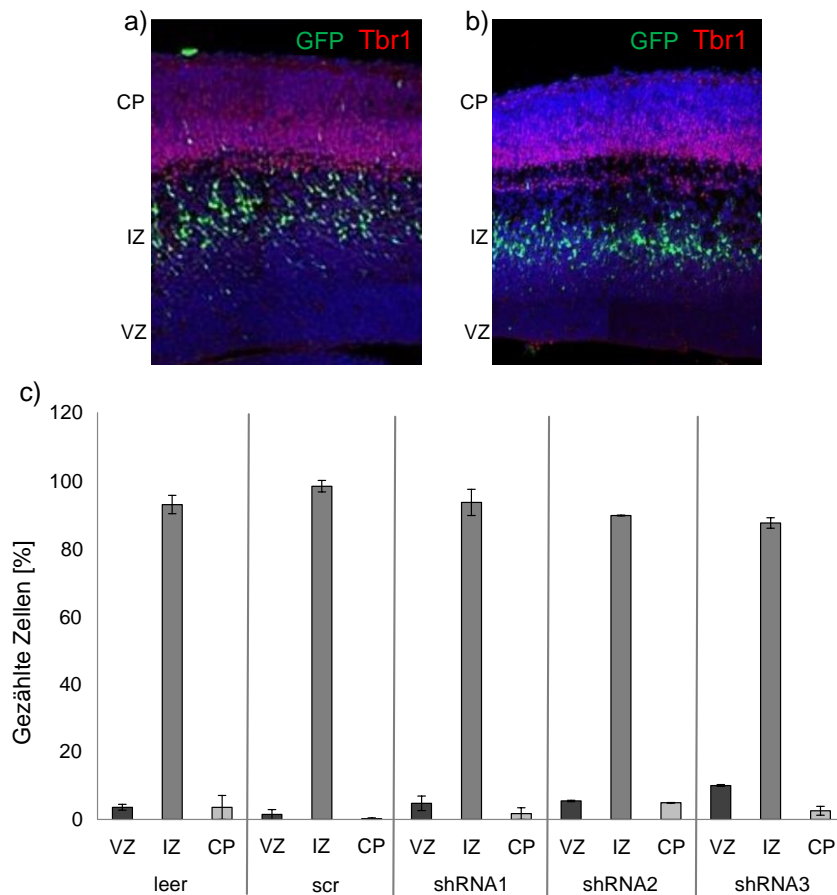


Abbildung 22: Ergebnisse der *in utero* Elektroporation (IUE) von Kontrolle (leer und scr) und *MID1*-KD im embryonalen Neocortex (shRNA 1-3). a, b: Beispielhafte Darstellung der IHC nach erfolgter IUE einer Kontrolle (scr) und einer shRNA (shRNA2). c: Quantifizierung der gefärbten Zellen in VZ, IZ und CP. Zu keinem Zeitpunkt gab es signifikante Unterschiede im Migrationsverhalten im Vergleich zur scr-Kontrolle. Abkürzungen: VZ: ventrikuläre Zone, IZ: intermediäre Zone, CP: Cortikalplatte (VZ: scr vs. shRNA1 $p=0,6667$, scr vs. shRNA2 $p=0,3333$, scr vs. shRNA3 $p=0,3333$; IZ: scr vs. shRNA1 $p=0,3333$, scr vs. shRNA2 $p=0,6667$, scr vs. shRNA3 $p=0,3333$; CP: scr vs. shRNA1 $p<0,9999$, scr vs. shRNA2 $p=0,3333$, scr vs. shRNA3 $p=0,6667$; Mann-Whitney-Test, N=2).

Für die KD-Experimente diente zum einen der Vektor pSuperior.puro ohne enthaltene Sequenz für eine shRNA (leer) und zum anderen der Vektor mit enthaltener Sequenz für eine scr-shRNA als Kontrolle. Zudem wurden drei verschiedene Konstrukte elektroporiert mit jeweils einer enthaltenen Sequenz für eine mit *Mid1* interferierenden shRNA (shRNA1-3). Die Auswertung erfolgte über die Zellzählung mit ImageJ. Dabei fiel auf, dass die Verteilung der elektroporierten Zellen in allen

Schnitten hauptsächlich auf die IZ begrenzt war. VZ und CP enthielten wenig bis gar keine elektroporierten Zellen. Zudem war kein Trend oder ein signifikanter Unterschied zu erkennen zwischen Kontrollen und *Mid1*-KD. Abbildung 22 zeigt beispielhaft Färbungen der Kontrollen und des KD und die Quantifizierung der elektroporierten Zellen.

In Folgeexperimenten soll noch eine *in-utero* ÜE von *Mid1* versucht werden, um einen möglichen Einfluss von *Mid1* ÜE auf die neuronale Migration zu untersuchen.

3.3 Charakterisierung des *Hdh150*-Mausmodells im präklinischen Verlauf

Auch bei der Entstehung von HD spielt die Ubiquitin-Protein-Ligase MID1 eine wichtige Rolle. MID1 bildet einen Proteinkomplex mit seinen Bindungspartnern $\alpha 4$, PP2A und S6K und bindet dann an das CAG-repeat-Motiv der mut HTT mRNA, wobei die Anzahl der Bindungen proportional mit der repeat-Anzahl steigt (Krauss et al., 2013). Die Aktivität von PP2A wird reduziert und die mTOR-Aktivität erhöht, was zu einer Phosphorylierung der S6K und zu einer Aktivierung von eIF4B und S6 (Liu et al., 2011; Trockenbacher et al., 2001) und schließlich zur Interaktion mit ihren Ziel-mRNAs und der Einleitung der Translation führt. Somit reguliert MID1 die Translation von mut HTT mRNA.

Der Entwicklung von typischen, klinischen HD-Symptomen geht ein Prodromalstadium voraus, lange bevor sich die klassische HD manifestiert hat (Ross et al., 2014). In früheren Studien wurden bereits die Degeneration von Neuronen im Occipitallappen und damit des visuellen Cortex sowie räumlich-visuelle Defizite in präsymptomatischen Mutationsträgern beschrieben (Dogan et al., 2013; Labuschagne et al., 2016). Den visuellen Cortex betreffende Defizite im Mausmodell (YAC-128) konnten ebenfalls bereits beobachtet werden (Kim et al., 2016), was dazu führte, dass in dieser Arbeit die Charakterisierung des *Hdh150*-Mausmodells im präklinischen Verlauf, zunächst auf visuelle Fähigkeiten in einem VD untersucht werden sollte.

3.3.1 Visual Discrimination Task (VD)

Da für den VD Hunger als Motivation Voraussetzung ist, wurden die Mäuse zunächst unter Futterentzug gestellt. Nachdem die Tiere in Einzelhaltung genommen wurden und über 24h kein Futter bekommen haben, wurde für jede einzelne Maus die Gewichtsänderung ermittelt. Die Gewichtsabnahme von etwa 15% entsprach den Erwartungen und damit der Voraussetzung für das weitere Vorgehen (Abbildung 23).

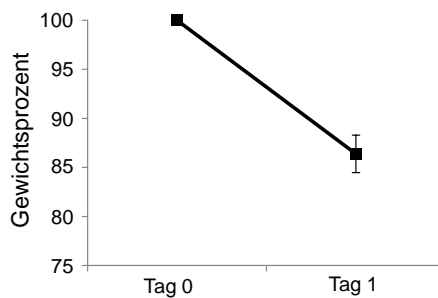


Abbildung 23: Darstellung der Gewichtsabnahme aller Mäuse nach 24h Futterentzug. Alle Mäuse verloren etwa 10-15% ihres ursprünglichen Körpergewichts und erzielten damit die Voraussetzungen für den VD (N=29).

Die am ersten Tag absolvierte Habituation, das Erlernen innerhalb von 30 min Futterpellets aus dem Futterspender aufzusammeln, war erfolgreich und zeigte zudem im zweiten Durchgang eine signifikante Steigerung für beide Genotypen, weshalb von einem Lerneffekt ausgegangen werden kann (Abbildung 24). Zwischen beiden Genotypen gab es keine signifikanten Unterschiede.

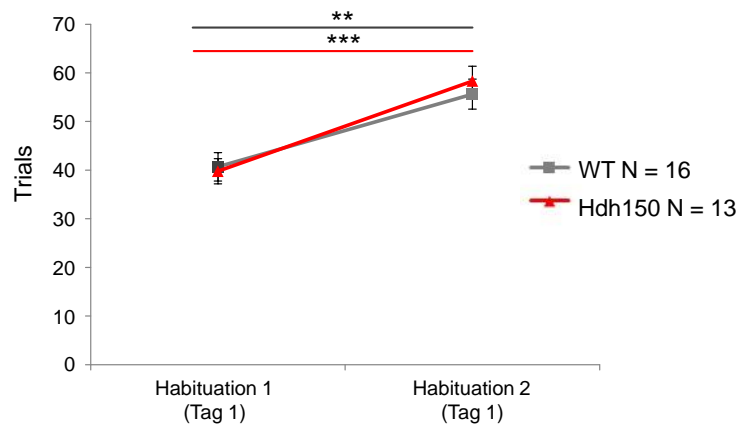


Abbildung 24: Habituationstraining für den VD. Nach 24h Futterentzug verstanden es alle Mäuse sehr schnell, dass sie Futterpellets aus dem Futterspender sammeln konnten. Die zweite Habituation am selben Tag zeigte ein signifikant besseres Ergebnis im Vergleich zur ersten (WT: $p=0,001341$, Mann-Whitney-Test, $N_{WT}=16$; Hdh150: $p=0,000324$, Mann-Whitney-Test, $N_{Hdh150}=13$). Zwischen den Genotypen war kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p=0,8217$, two-way ANOVA).

Beim Touchtraining sollten die Tiere lernen, erst den Touchscreen zu berühren, bevor sie ein Futterpellet bekamen. Zunächst starteten beide Genotypen im Durchschnitt mit einer deutlich niedrigeren Anzahl an Trials (>20) innerhalb der vom Programm vorgegebenen 30 min. Dies steigerte sich jedoch an jedem folgenden Tag immer mehr, so dass an den Tagen 5-7 des Touch Trainings an drei aufeinanderfolgenden Tagen das Maximum von 70 erfolgreichen Trials erreicht und damit diese Phase erfolgreich beendet wurde (Abbildung 25).

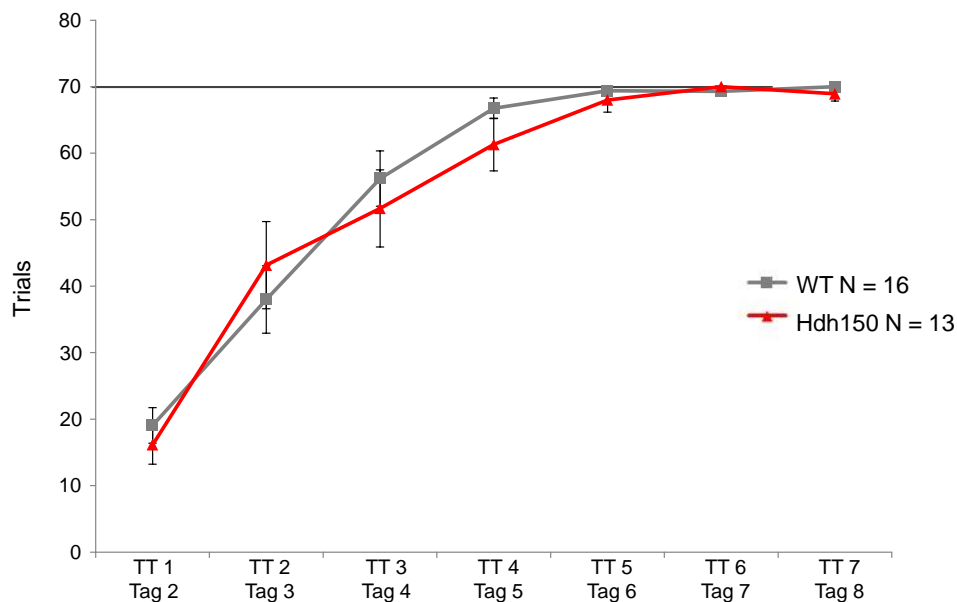


Abbildung 25: Touchtraining für den VD. Alle Mäuse lernten stetig den Zusammenhang zwischen Berühren des Touchscreens und Belohnung in Form eines Futterpellets. An Tag 5-7 war das Training erfolgreich bestanden. Zwischen den Genotypen war kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p=0,5938$, two-way ANOVA, $N_{WT}=16$, $N_{Hdh150}=13$), TT: Touch Training.

Der nun folgende eigentliche VD wurde mit Kombination 1 der in Abbildung 7 dargestellten Bilderpaare absolviert, dem leichtesten Schwierigkeitsgrad, der Unterscheidung zwischen schwarz und weiß. Die Tiere bekamen nur eine Belohnung in Form eines Futterpellets, wenn sie die richtige (weiße) Seite des Touchscreens berührten. In dieser Phase konnten erstmals die erfolgten Trials als falsch gewertet werden, wenn die Maus die falsche Seite des Touchscreens antippte (schwarz). Im Ergebnis wurde demnach eine relative Anzahl von erfolgreichen (korrekten) Trials gewertet, bezogen auf die Anzahl der gesamten absolvierten Trials (maximal 100). Diese Phase startete erneut mit einer deutlich niedrigeren Anzahl an erfolgreichen Trials. Anfangs begannen die Hdh150-Mäuse noch mit einem Vorsprung von etwa 13% mehr erfolgreichen Trials. Dieser Vorsprung wurde jedoch im Verlauf des Experiments deutlich geringer und erreichte keinen signifikanten Wert (Abbildung 26). Am 8. Tag des VD (insgesamt Tag 16) wurde von beiden Genotypen durchschnittlich ein Wert von 70% korrekten Trials erreicht und konnte an drei

aufeinanderfolgenden Tagen gehalten werden.

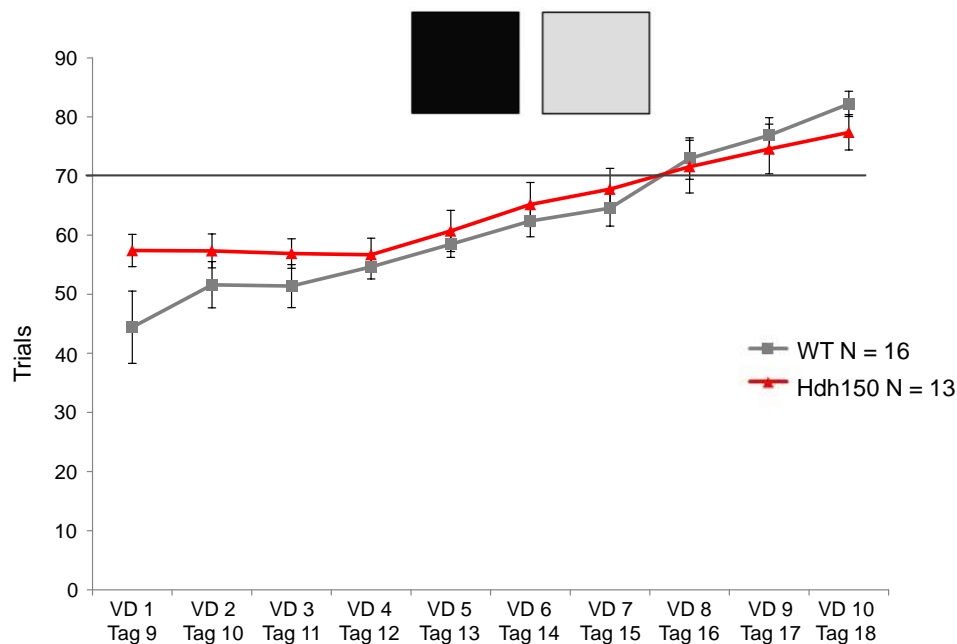


Abbildung 26: Ergebnisse des VD (Kombination 1). WT- und Hdh150-Tiere brauchten etwa eine Woche um die Kriterien zu erreichen, die zum Bestehen des Tests erforderlich waren. An den Tagen 8, 9 und 10 des Tests erreichten beide Genotypen durchschnittlich den Schwellenwert von 70% korrekter Trials und der Test war abgeschlossen. Zwischen den Genotypen war kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p=0,4837$, two-way ANOVA, $N_{WT}=16$, $N_{Hdh150}=13$), VD: Visual Discrimination.

Der zweite Teil der Diskriminierungsphase wurde direkt im Anschluss gestartet mit dem Schwierigkeitsgrad der Kombination 2 (Abbildung 7). Dieser Teil des Versuchs startete für beide Genotypen deutlich besser, nämlich kurz unterhalb des Schwellenwertes von 70%, stagnierte dann und erreichte an VD 5 (Tag 23) dieses Teilversuchs das erste Mal den Schwellenwert und steigerte diesen noch etwas an den beiden darauffolgenden Tagen, sodass diese Phase ebenfalls erfolgreich beendet war. Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen beobachtet (Abbildung 27).

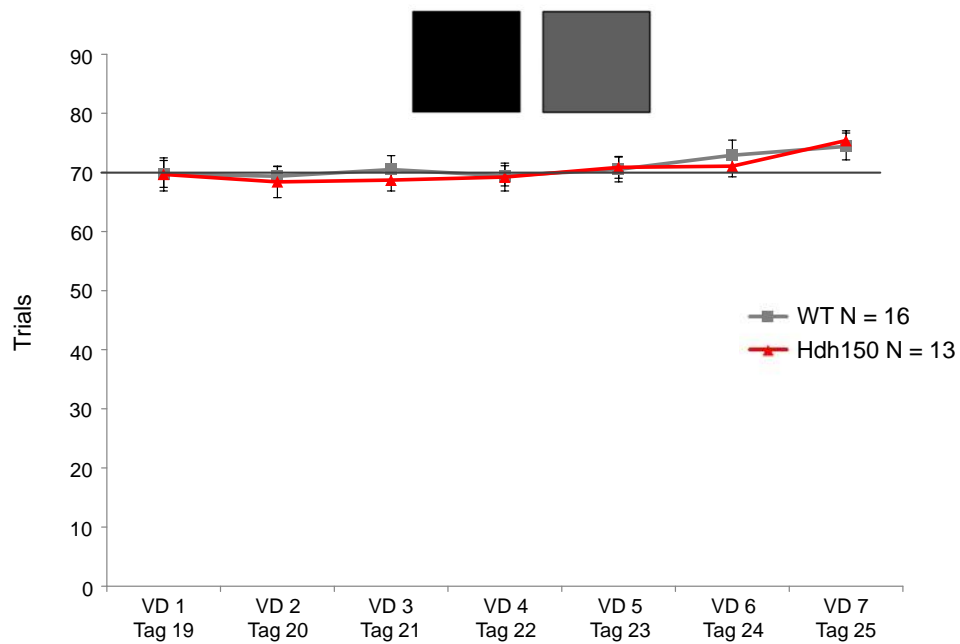


Abbildung 27: Ergebnisse des VD (Kombination 2). WT- und Hdh150-Tiere begannen den Test leicht unter dem Schwellenwert von 70% korrekter Trials und erreichten ihn im Durchschnitt vier Tage lang nicht. Dann war der Schwellenwert erreicht und wurde über drei Tage hinweg nicht mehr unterschritten. Zwischen den Genotypen war kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p=0,8221$, two-way ANOVA, $N_{WT}=16$, $N_{Hdh150}=13$) VD: Visual Discrimination.

Abbildung 28 zeigt abschließend den Gewichtsverlauf des gesamten Experiments. Der an Tag 1 erreichte Wert sollte möglichst über den gesamten Zeitraum beibehalten werden.

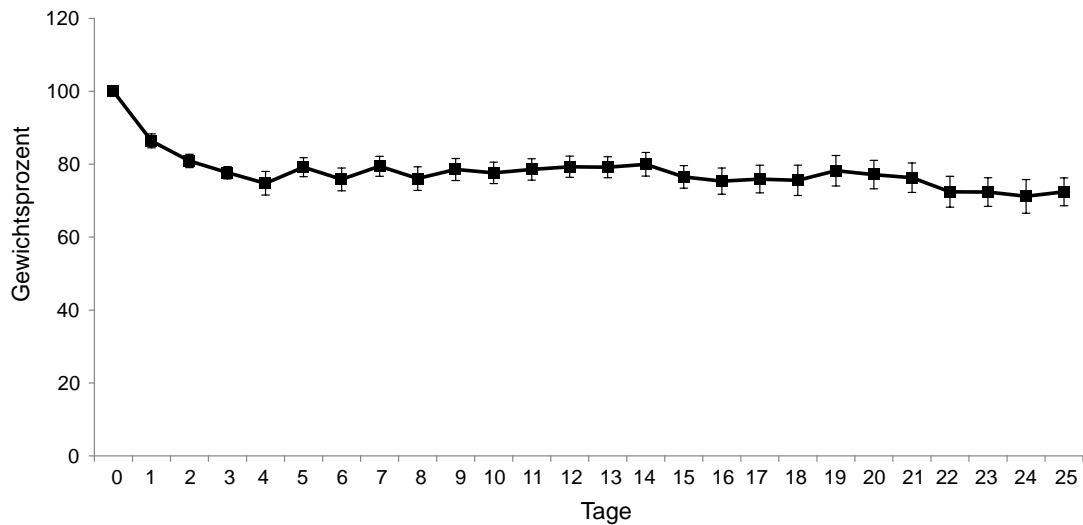


Abbildung 28: Gewichtsverlauf über die gesamte Dauer des VD. Alle Mäuse behielten in etwa 80% ihres ursprünglichen Körpergewichts (N=29).

3.3.2 Social Interaction (SI)

Da im VD noch keine frühen Defizite im Hdh150-Mausmodell zu identifizieren waren, sollten nun in weiteren Verhaltenstests mögliche HD-assoziierte Defizite in den Hdh150-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren überprüft werden.

In den folgenden Experimenten sollten die Tiere auf ihr Sozialverhalten getestet werden. Es wurden zwei verschiedene SI-Tests durchgeführt. Zunächst wurde eine sequentielle Exposition zu einem leeren Käfig und anschließend einem Käfig mit Interaktionsmaus durchgeführt. Hierbei war demnach die Kontrolle (leerer Käfig) zeitlich zur Interaktionsmaus getrennt. Beim zweiten Test wurde eine 3-Teile Kammer verwendet, bei der durch einen Zwischenraum, zwei Räume miteinander verbunden waren, in denen jeweils ein Käfig stand. In einem der beiden Käfige befand sich eine Interaktionsmaus, so dass in diesem Versuch der Kontrollkäfig nicht zeitlich, sondern räumlich zur Interaktionsmaus getrennt war (Abbildung 29).

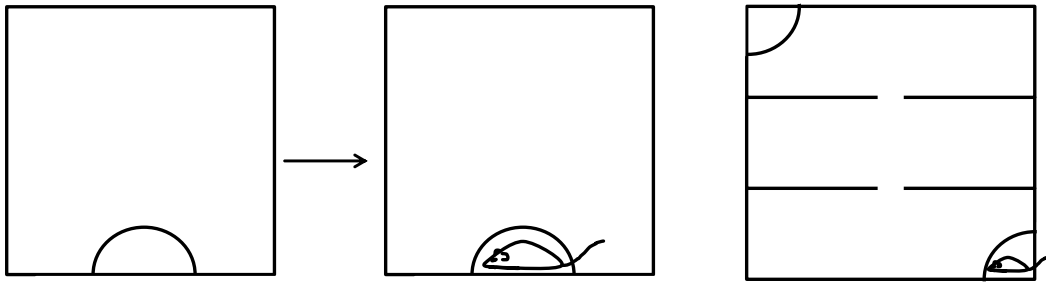


Abbildung 29: Schematische Darstellung beider SI-Tests. Links: Sequentielle Exposition zu leerem Käfig und Käfig mit Interaktionsmaus. Rechts: 3-Teile Kammer.

Bei beiden hier angewandten SI-Tests wurde ein Interaktionsindex berechnet, bei dem die Interaktionszeit gegen die Zeit beim leeren Käfig normalisiert wird. Der Interaktionsindex berechnet sich wie folgt:

$$\text{Interaktionsindex} = \frac{\text{Zeit Interaktionszone}}{\text{Zeit bei leerem Käfig}} \times 100$$

Bei der ersten Variante des SI-Tests wurde überprüft, ob Unterschiede in der sozialen Interaktion zwischen WT- und Hdh150-Mäusen bestehen. Einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen gab es jedoch nicht. Die Hdh150-Mäuse interagierten durchschnittlich in etwa genauso lange mit der unbekanntem Interaktionsmaus wie die WT-Mäuse (Abbildung 30).

Um auszuschließen, dass die Versuchsmaus nur Interesse an dem leeren Käfig als Objekt hatte, wurde ein weiterer SI-Test durchgeführt, bei dem zusätzlich zum Interaktionskäfig mit der Interaktionsmaus, ein weiterer, leerer Interaktionskäfig zeitgleich angeboten wurde. Die beiden Käfige standen in zwei gleichberechtigten, abgetrennten Kammern, die durch eine weitere Kammer miteinander verbunden waren, in der die zu untersuchende Maus den Versuch startete. Welcher der beiden Käfige die Interaktionsmaus beinhalten, alternierte.

Auch in diesem Versuch war das Interesse an der Interaktionsmaus groß, die

Hdh150-Mäuse hielten sich durchschnittlich sogar etwas länger im Bereich der Interaktionsmaus auf als die WT-Tiere, jedoch war auch hier kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abbildung 30).

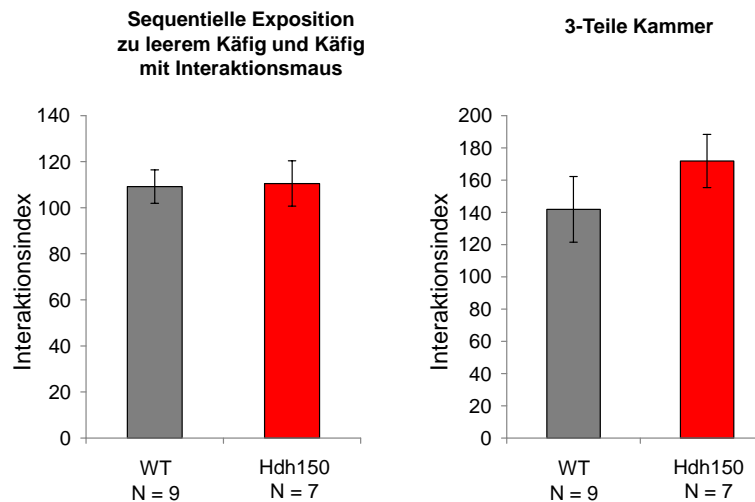


Abbildung 30: Ergebnisse der beiden SI-Tests. Links: Die sequentielle Exposition zu leerem Käfig und Käfig mit Interaktionsmaus zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und Hdh150-Mäusen. Rechts: Auch in der 3-Teile Kammer verhielten sich beide Genotypen ohne signifikante Unterschiede (Sequentielle Exposition: $p=0,9140$, Zweistichproben-t-test, $N_{WT}=9$, $N_{Hdh150}=7$; 3-Teile Kammer: $p=0,2928$, Zweistichproben-t-test, $N_{WT}=9$, $N_{Hdh150}=7$).

3.3.3 Elevated Plus Maze (EPM)

Bei dem hier durchgeführten EPM sollte im Rahmen der verschiedenen Verhaltenstests gezeigt werden, ob es ein abnormales Angstverhalten bei den Hdh150-Mäusen im Gegensatz zu den WT-Tieren auftritt. Größeres oder kleineres Angstverhalten wird durch die längere oder kürzere Anwesenheit der Mäuse im offenen bzw. geschlossenen Arm getestet. Tatsächlich hielten sich die Hdh150-Mäuse durchschnittlich länger in den offenen Armen auf, als die WT-Tiere. Dies kann jedoch nur als Trend gewertet werden, da kein signifikanter Unterschied zu messen war (Abbildung 31).

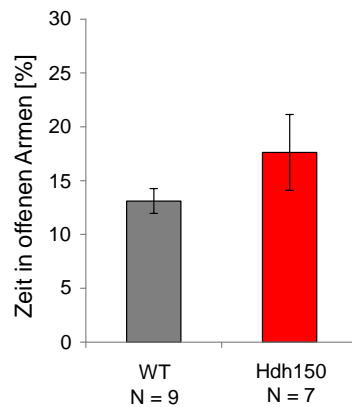


Abbildung 31: Ergebnisse des EPM. Die Hdh150-Mäuse hielten sich etwas länger in den offenen Armen auf als die WT-Tiere. Ein signifikanter Unterschied war jedoch nicht zu erkennen ($p=0,2262$, Zweistichproben-t-test, $N_{WT}=9$, $N_{Hdh150}=7$)

3.3.4 Open Field Test (OF)

Der OF ist wie der EPM ein Test, der ein potentiell abnormales Angstverhalten misst. Dabei wird gemessen, ob sich die Mäuse präferentiell im Zentrum (angstfrei) oder am Rand (ängstlich) des Feldes aufhalten. Nach fünf Minuten konnte gezeigt werden, dass sich die Hdh150-Mäuse im Durchschnitt signifikant länger im Zentrum der Versuchsbox aufhielten als die WT-Tiere (Abbildung 32). Hierbei blieb die gesamte zurückgelegte Wegstrecke jedoch ohne signifikanten Unterschied, was motorische Unterschiede der beiden Gruppen ausschließt.

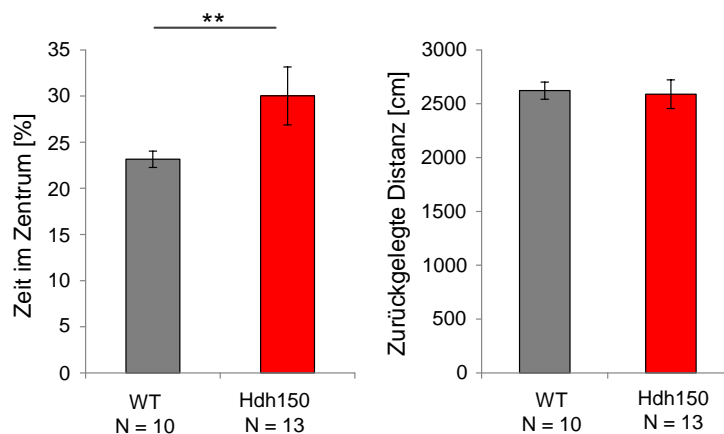


Abbildung 32: Ergebnisse des OF. Die Hdh150-Mäuse hielten sich signifikant länger im Zentrum der Versuchsbox auf als die WT-Tiere. Die Gesamtstrecke, die zurückgelegt wurde, blieb dabei ohne signifikante Veränderung (Zeit im Zentrum: $p=0,002$, Mann-Whitney-Test; Zurückgelegte Distanz: $p=0,4492$, Zweistichproben-t-Test, $N_{WT}=10$, $N_{Hdh150}=13$).

3.3.5 Novel Object Recognition Task (NORT)

In den weiteren Experimenten wurden die Mäuse auf kognitive Fähigkeiten getestet. Beim NORT sollte untersucht werden, ob in 12 Wochen alten Hdh150-Mäusen schon ein früher kognitiver Phänotyp zu erkennen ist im Vergleich zu WT-Tieren des gleichen Alters. Hierzu sollten sich die Mäuse an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zwei identische Objekte merken. Die Leistung dieses Gedächtnisprozesses sollte anhand der Neugier an einem neuen, unbekanntem Objekt gemessen werden. Die Hdh150-Mäuse zeigten einen signifikant geringeren Discrimination Index (ca. 0,1) für das neue Objekt als die WT-Tiere (ca. 0,4) (Abbildung 33). Die summierte Explorationszeit, bezogen auf beide Objekte, blieb dabei ohne signifikante Unterschiede. Die beiden Genotypen zeigten somit auch hier keine motorischen Unterschiede.

$$\text{Discrimination index} = \frac{\text{Zeit (neues Objekt)} - \text{Zeit (bekanntes Objekt)}}{\text{Zeit (neues Objekt)} + \text{Zeit (bekanntes Objekt)}}$$

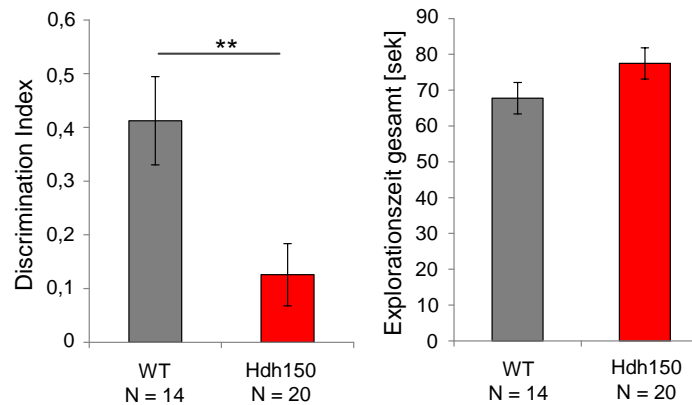


Abbildung 33: Ergebnisse des NORT. Die Hdh150-Mäuse zeigten einen signifikant niedrigeren Discrimination Index als die WT-Tiere und damit eine signifikant schlechtere kognitive Leistung. Die gesamte Explorationszeit, bezogen auf beide Objekte, blieb dabei ohne signifikante Veränderung (Discrimination Index: $p=0,0034$, Mann-Whitney-Test; Explorationszeit: $p=0,6410$, Mann-Whitney-Test, $N_{WT}=14$, $N_{Hdh150}=20$).

3.4 Metformin in der Therapie von HD

Metformin beeinflusst die Bildung des MID1/PP2A/mTOR-Proteinkomplexes, welcher die Translation von elongierter *HTT*-mRNA reguliert (Kickstein et al., 2010; Krauss et al., 2013). Aus diesem Grund sollte in den folgenden Experimenten überprüft werden, ob Metformin in der Therapie von HD eingesetzt werden könnte.

3.4.1 Die Wirkung von Metformin auf primäre Neurone

Eine mögliche Wirkung von Metformin auf die mTOR-Translationskaskade sollte zunächst *in vitro* in primären Neuronen getestet werden. Nach 24h Metforminbehandlung der primären Neuronen mit 2,5 mM Metformin im Medium wurden die Ergebnisse auf einem Westernblot analysiert. Die mTOR-Aktivität wurde indirekt über die Phosphorylierung des mTOR-Targets S6 gemessen. Die *Htt*-

Expression war auch nach mehrmaligem Wiederholen nicht auswertbar. Da die Lysatkonzentrationen nach dem Ernten der Zellen äußerst gering waren, ließen sich nicht die üblichen Mengen von 30 µg auf den Westernblot auftragen. Deshalb wurde von jeder Probe 10 µl auf das Gel geladen, weshalb hier auf die Darstellung eines repräsentativen Blots verzichtet wird. Blots, bei denen die Konzentration derart gering war, dass bei einer Lysatmenge von 10 µl kein Protein detektiert werden konnte, wurden exkludiert. Als Ladekontrolle bzw. zur Normalisierung diente das Haushaltsgen Actin. Die Metforminbehandlung reduzierte die Phosphorylierung in primären Neuronen von WT- und Hdh150-Tieren signifikant (Abbildung 34).

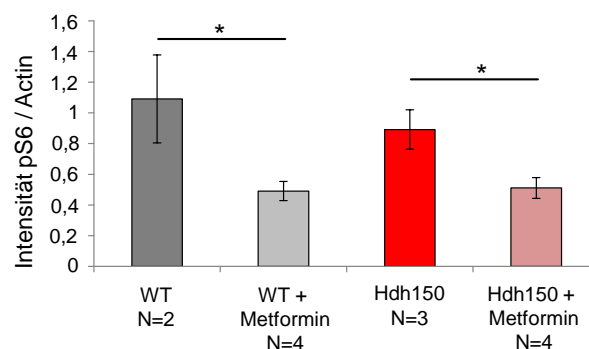


Abbildung 34: Quantifizierung der Phosphorylierung des mTOR-Targets S6 nach erfolgter Metforminbehandlung und Kontrollen in primären Neuronen von WT- und Hdh150-Embryos. In beiden Genotypen war die Phosphorylierung von S6 nach Metforminbehandlung signifikant reduziert (WT vs. WT+Metformin: $p=0,0395$, Zweistichproben-t-Test, $N_{WT}=2$, $N_{WT+Met}=4$; Hdh150 vs. Hdh150+Metformin: $p=0,036$, Zweistichproben-t-test, $N_{Hdh150}=3$, $N_{Hdh150+Met}=4$).

3.4.2 Cortikale Metformininjektion

Um zu überprüfen, ob Metformin einen Effekt auf die mTOR-Translationskaskade bzw. auf die Expression von *Htt in vivo* im Gehirn von Mäusen hat, wurde eine wässrige Lösung mit 10 mg/ml Metformin oder pures Wasser als Kontrolle direkt in das Gehirn der Hdh150-Mäuse injiziert. Als Injektionsstelle wurde der visuelle Cortex gewählt, da er leicht mit einer Injektionsnadel zu erreichen ist und zudem als früh

betroffenes Gewebe im präsymptomalen Stadium von HD beschrieben ist.

24h nach der Injektion von 10 mg/ml Metformin oder Wasser als Kontrolle in den visuellen Cortex, wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und das Gewebe rund um die Injektionsstelle sowie die korrespondierende Stelle der anderen Hemisphäre als Kontrolle entnommen und Proteinlysate erstellt. Diese wurden auf einem Westernblot analysiert.

Die Westernblotanalyse ergab für das mTOR-Target S6 eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung für die Lysate der mit Metformin injizierten Gewebe, während in der H₂O-Kontrolle kein Unterschied zu sehen war (Abbildung 35). Die Expression von *Htt*, d.h. die Summe der Quantifizierung der wtHtt- und der mutHtt-Bande, war ebenfalls signifikant reduziert, während in der H₂O-Kontrolle kein Unterschied zu sehen war.

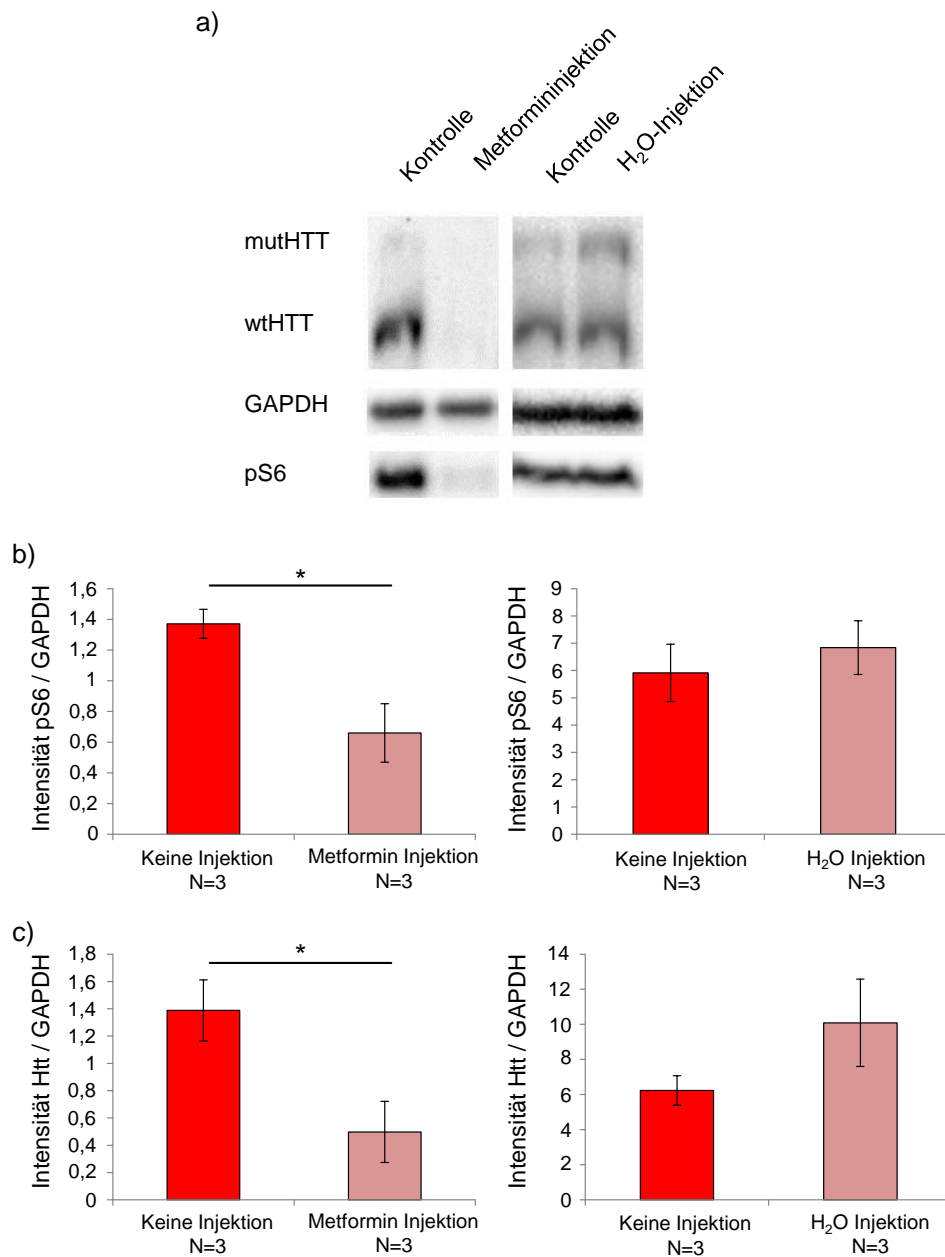


Abbildung 35: Ergebnisse der Westernblotanalyse von cortikalem Gewebe nach Injektion von 10 mg/ml Metformin. a: Beispielhafte Westernblots. b, c: Quantifizierung der Westernblots. Nach Metformininjektion war pS6 und Htt signifikant reduziert verglichen mit dem Gewebe der kontralateralen Hemisphäre (Keine Injektion vs. Metformininjektion: pS6/GAPDH: $p=0,0289$, Zweistichproben-t-test, $N=3$; Htt/GAPDH: $p=0,0482$, Zweistichproben-t-test, $N=3$). Nach Injektion von H₂O war kein signifikanter Unterschied zu detektieren (Keine Injektion vs. H₂O-Injektion: pS6/GAPDH: $p=0,5579$, Zweistichproben-t-test, $N=3$; Htt/GAPDH: $p=0,2161$, Zweistichproben-t-test, $N=3$).

3.4.3 Orale Applikation im Trinkwasser

Da die Metformininjektionen zu signifikanten Reduktionen der S6-Phosphorylierung und der *Htt*-Expression führten, sollte im Folgenden überprüft werden, ob durch weniger invasive Applikationsformen ein ähnlicher Effekt erreicht werden konnte. Hierfür wurde den Hdh150-Mäusen in einem Zeitraum von drei Wochen 5 mg/ml Metformin jeden Tag frisch ins Trinkwasser gegeben. Als Kontrollte diente eine Gruppe, die einfach pures Trinkwasser bekam. Die Metforminkonzentration im Trinkwasser basiert auf einer früheren Studie, bei der bereits in einem anderen Kontext die Auswirkungen von Metformin erfolgreich auf die mTOR-Translationskaskade getestet wurde (Kickstein et al., 2010).

Das Trinkverhalten der behandelten und nicht behandelten Mäuse wurde beispielhaft über drei Wochen lang jeden Tag kontrolliert, indem die Wasserflaschen vor und nach jedem Wechsel gewogen wurden. So konnte ermittelt werden, wieviel Wasser fehlte und durchschnittlich pro Maus getrunken wurde. Das Trinkverhalten der Gruppe mit purem Wasser und der Gruppe mit Wasser mit 5 mg/ml Metformin unterschied sich an keinem Tag signifikant, so dass davon ausgegangen werden kann, dass 5 mg/ml Metformin im Trinkwasser zu keinem abnormalen Trinkverhalten führt (Abbildung 36).

Nach dreiwöchiger Behandlung wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Gehirne entfernt. Aus jeweils einer Hemisphäre wurden dann Proteinlysate erstellt und diese auf einem Westernblot analysiert.

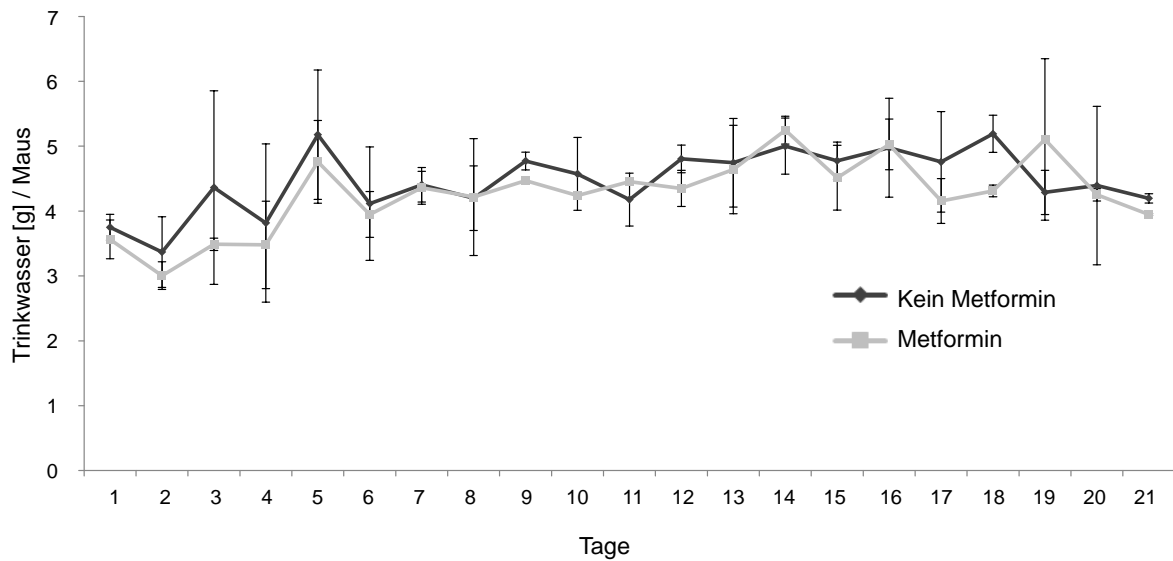


Abbildung 36: Trinkverhalten von Mäusen mit und ohne 5 mg/ml Metformin im täglichen Trinkwasser über drei Wochen. Es wurde kein signifikanter Unterschied im Trinkverhalten festgestellt ($p=0,2986$, two-way ANOVA, $N_{\text{Kein Metformin}}=7$, $N_{\text{Metformin}}=8$)

Die Westernblotanalyse ergab eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von S6 in den Lysaten der behandelten Hdh150-Mäusen verglichen mit den unbehandelten (Abbildung 37 a, b). Für Htt war nach drei Wochen Behandlung noch kein signifikanter Expressionsunterschied zu erkennen, jedoch ein deutlicher Trend, sowohl bei Normalisierung von mutHtt gegen wtHtt als auch des kompletten Proteins (mutHtt + wtHtt) gegen das Haushaltsgen Actin (Abbildung 37 a, c, d).

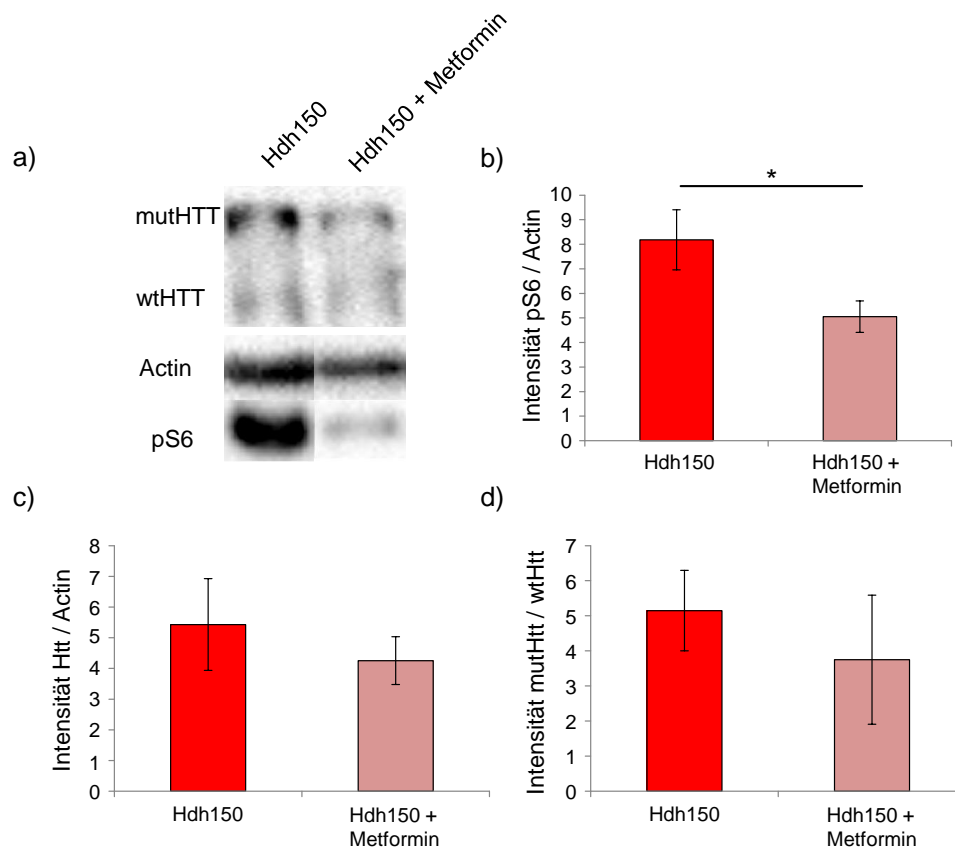


Abbildung 37: Ergebnisse der Westernblotanalyse von Whole-Brain-Lysaten nach dreiwöchiger Behandlung von 5 mg/ml Metformin im Trinkwasser und Kontrollen ohne Metformin. a: Beispielhafte Westernblots. b-d: Quantifizierung der Westernblots. b: Nach Metforminbehandlung war die Phosphorylierung von S6 signifikant reduziert verglichen mit den nicht behandelten Mäusen (pS6/Actin: $p=0,0473$, Zweistichproben-t-test). c, d: Die *Htt*-Expression zeigte keine signifikante Veränderung, weder wtHtt+mutHtt normalisiert zu Actin, noch mutHtt normalisiert zu wtHtt (Htt/Actin: $p=0,5013$, Zweistichproben-t-test; mutHtt/wtHtt: $p=0,5327$, Zweistichproben-t-test, $N_{\text{Hdh150}}=6$, $N_{\text{Hdh150+Metformin}}=6$).

Aufgrund des Trends der *Htt*-Expressionsreduktion nach drei Wochen Metforminbehandlung im Trinkwasser, wurden erneut Hdh150-Mäuse mit Metformin im Trinkwasser behandelt, diesmal über einen Zeitraum von elf Wochen, um zu sehen, ob sich dieser Trend eventuell noch verstärkt und ggf. sogar zu einer statistischen Signifikanz entwickelt. Die Prozedur war exakt die gleiche wie bei der dreiwöchigen Behandlung, nur dass die Mäuse entsprechend acht Wochen älter

waren zum Zeitpunkt der Westernblotanalyse. Um weitere Fehlerquellen auszuschließen und ggf. regionale Unterschiede zu erkennen, wurden diesmal allerdings keine Lysate aus einer kompletten Gehirnhälfte erstellt, sondern Lysate aus Hippocampus, Striatum und präfrontalem Cortex generiert. Das hatte den Vorteil zu erkennen, ob ein potenzieller Effekt der Metforminbehandlung möglicherweise auf eines dieser Hirnareale beschränkt ist. Abbildungen 38 und 39 zeigen, dass es im Hippocampus und Striatum zu keiner Reduktion von Htt kommt, weder bei Htt/Actin noch bei mutHtt/wtHtt. Im präfrontalen Cortex jedoch ist eine signifikante Reduktion von mutHtt zu erkennen bei Normalisierung zu wtHtt (Abbildung 40).

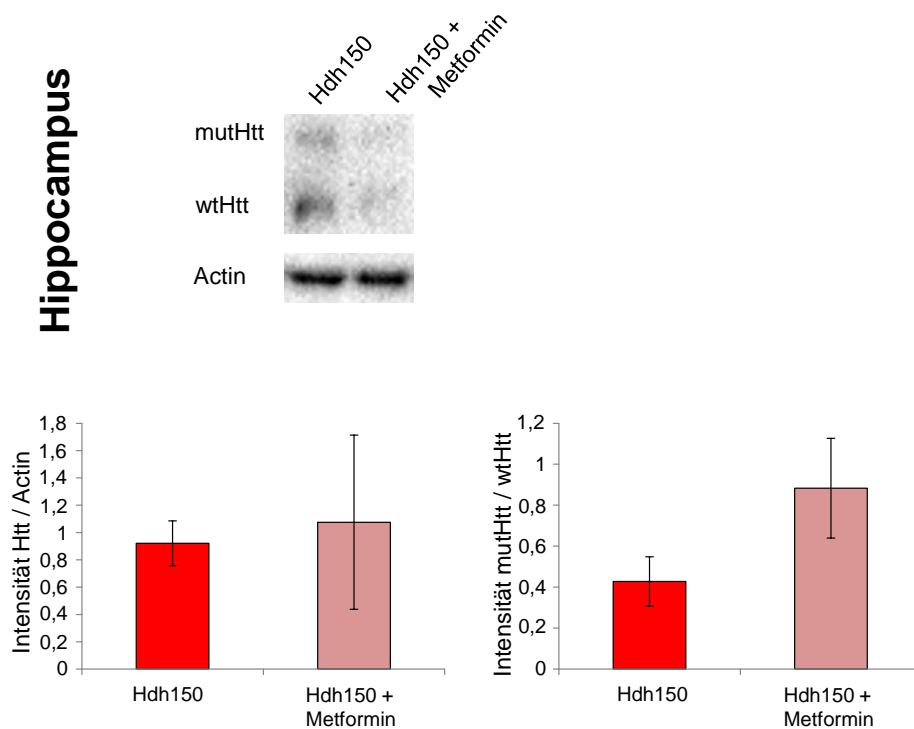


Abbildung 38: Ergebnisse der Westernblotanalyse von Hippocampus-Lysaten nach elfwöchiger Behandlung von 5 mg/ml Metformin im Trinkwasser und Kontrollen ohne Metformin. Oben: Beispielhafte Westernblots. Unten: Die Quantifizierung ergab keine signifikanten Expressionsunterschiede von Htt oder mutHtt (Htt/Actin: $p=0,8263$, Zweistichproben-t-test; mutHtt/wtHtt: $p=0,1688$, Zweistichproben-t-test, $N_{Hdh150}=3$, $N_{Hdh150+Metformin}=3$).

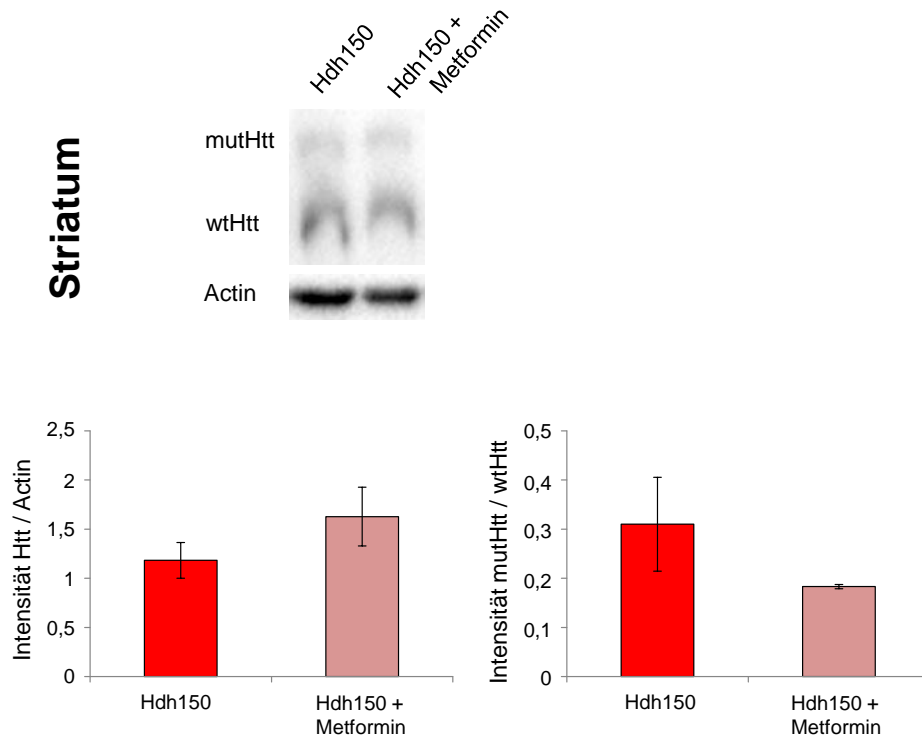


Abbildung 39: Ergebnisse der Westernblotanalyse von Striatum-Lysaten nach elfwöchiger Behandlung von 5 mg/ml Metformin im Trinkwasser und Kontrollen ohne Metformin. Oben: Beispielhafte Westernblots. Unten: Die Quantifizierung ergab keine signifikanten Expressionsunterschiede von Htt oder mutHtt (Htt/Actin: $p=0,2728$, Zweistichproben-t-test; mutHtt/wtHtt: $p=0,2546$, Zweistichproben-t-test, $N_{\text{Hdh150}}=3$, $N_{\text{Hdh150+Metformin}}=3$).

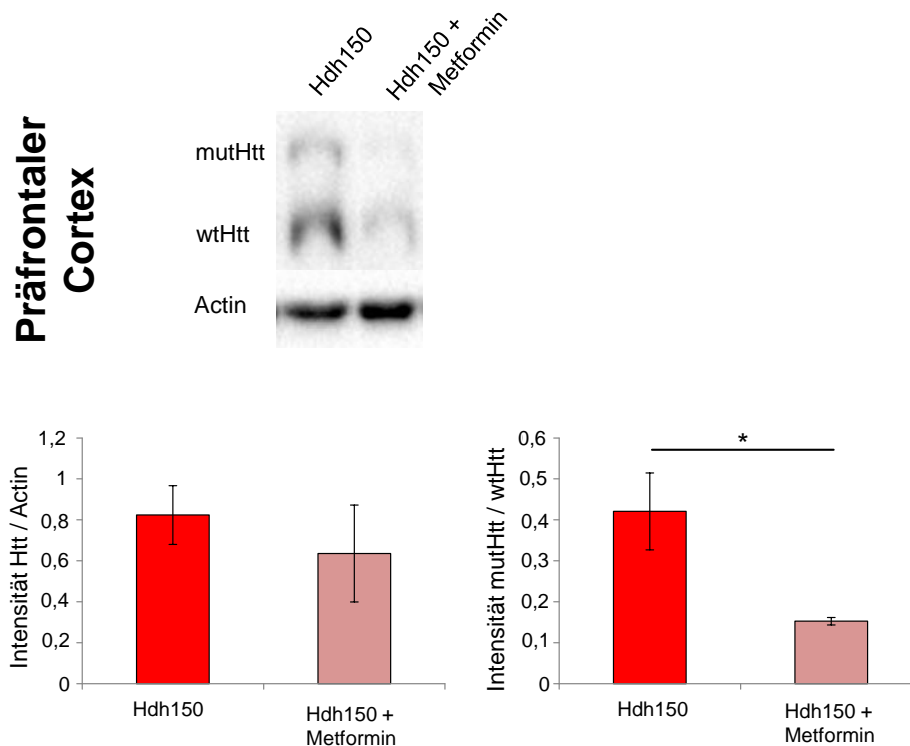


Abbildung 40: Ergebnisse der Westernblotanalyse von Lysaten des präfrontalen Cortex nach elfwöchiger Behandlung von 5 mg/ml Metformin im Trinkwasser und Kontrollen ohne Metformin. Oben: Beispielhafte Westernblots. Unten: Die Quantifizierung ergab keine signifikanten Expressionsunterschiede von Htt normalisiert zu Actin, aber eine signifikante Reduktion von mutHtt normalisiert zu wtHtt (Htt/Actin: $p=0,5351$, Zweistichproben-t-test; mutHtt/wtHtt: $p=0,0467$, Zweistichproben-t-test, $N_{\text{Hdh150}}=3$, $N_{\text{Hdh150+Metformin}}=3$).

Aufgrund der nun vorliegenden signifikanten Reduktion von mutHtt wurde zusätzlich eine immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von Hirnschnitten der behandelten und nicht behandelten Mäuse durchgeführt und im Bereich des präfrontalen Cortex analysiert. Als neuronaler Marker diente NeuN, auf dessen Signal bei der Analyse die Intensität von Htt normalisiert wurde. Nach elfwöchiger Metforminbehandlung konnte eine leichte, jedoch vor allem wegen des hohen Standardfehlers keine signifikante Reduktion des Htt-Signals erkennbar werden (Abbildung 41).

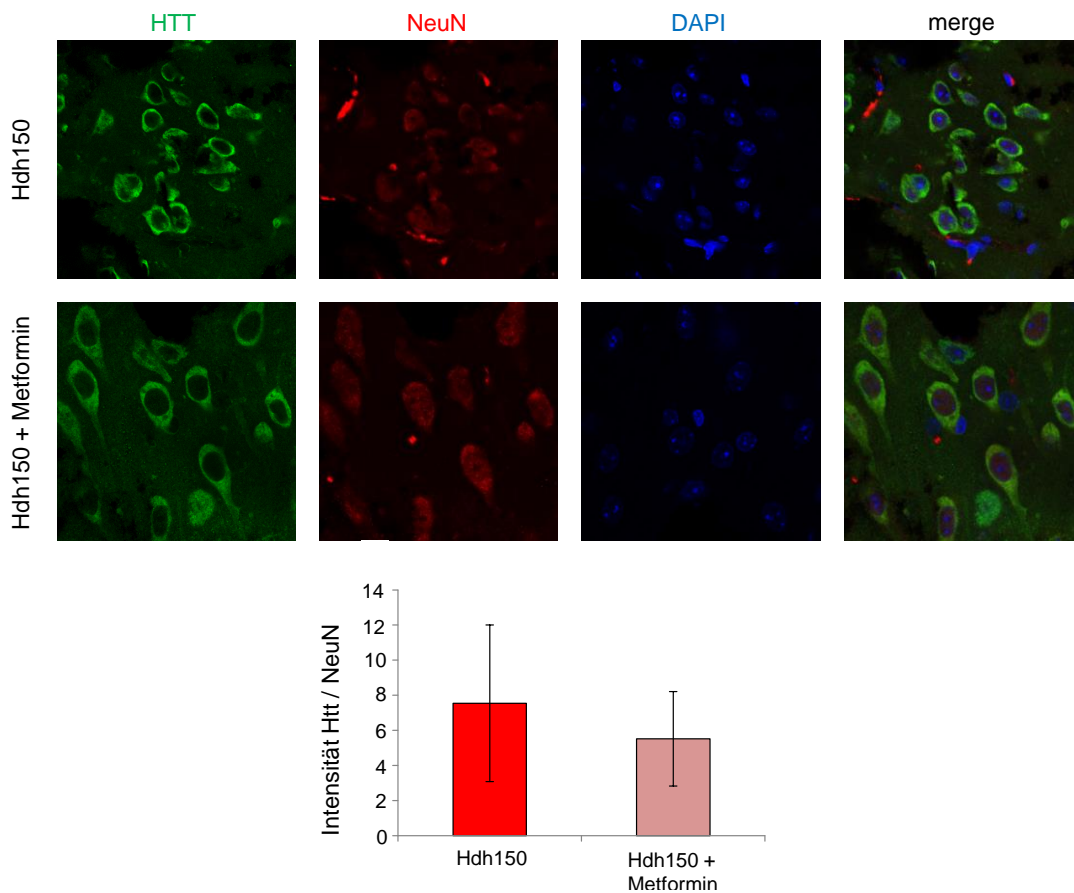


Abbildung 41: Ergebnisse der IHC von sagittalen Schnitten des präfrontalen Cortex nach elfwöchiger Behandlung von 5 mg/ml Metformin im Trinkwasser und Kontrollen ohne Metformin. Oben: Beispielhafte immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen. Unten: Die Quantifizierung ergab keine signifikanten Expressionsunterschiede von Htt (Htt/NeuN: $p > 0,9999$, Mann-Whitney-Test, $N_{\text{Hdh150}}=3$, $N_{\text{Hdh150+Metformin}}=3$).

3.4.4 Verhaltensnormalisierung durch Metforminbehandlung

Die hier durchgeführten Verhaltensversuche dienten dazu festzustellen, ob die im präklinischen Stadium der Hdh150-Mäuse auffälligen Tests (OF und NORT) durch Metforminbehandlung normalisiert werden können. Dazu wurden die Tests mit beiden Genotypen durchgeführt mit und ohne dreiwöchiger Metforminbehandlung im Trinkwasser (5 mg/ml).

3.4.4.1 Open Field Test (OF) - Metformin

Die über drei Wochen mit Metformin im Trinkwasser behandelten WT-Tiere verhielten sich ähnlich wie die unbehandelten WT-Tiere, es war kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die behandelten Hdh150-Tiere jedoch zeigten ein den WT-Tieren entsprechendes Verhalten und verbrachten signifikant weniger Zeit im Zentrum als die unbehandelten Hdh150-Tiere. Die zurückgelegte Distanz blieb in allen vier Gruppen ohne signifikanten Unterschied (Abbildung 42).

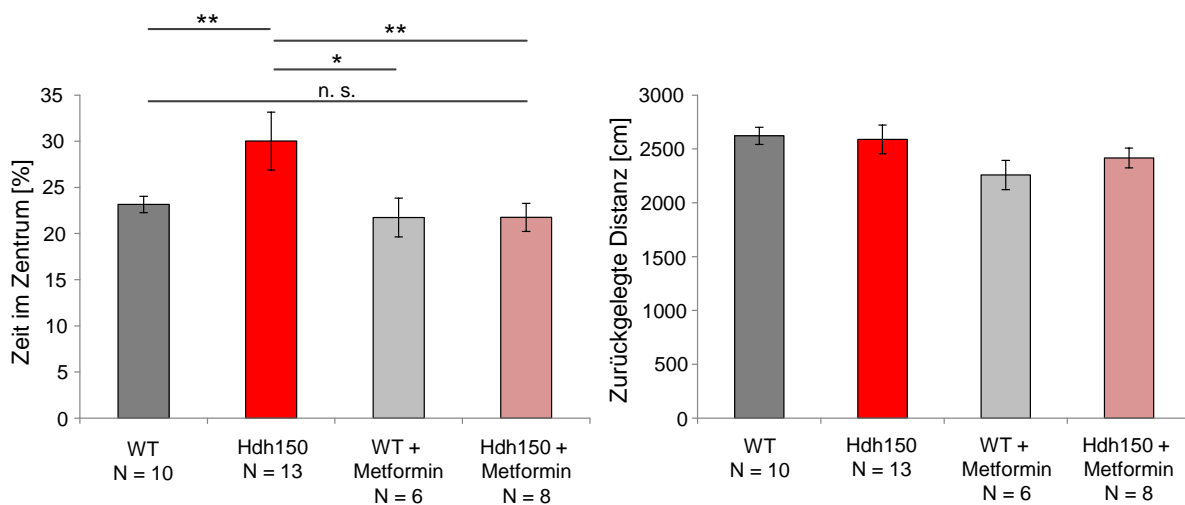


Abbildung 42: Ergebnisse des OF nach dreiwöchiger Metforminbehandlung im Trinkwasser. Die behandelten Hdh150-Tiere zeigten nun ein normales Angstverhalten und keinen signifikanten Unterschied mehr im Vergleich zu den WT-Tieren. Die zurückgelegte Gesamtdistanz blieb in allen vier Gruppen ohne signifikante Unterschiede (Zeit im Zentrum: WT vs. Hdh150 $p=0,001963$; Hdh150 vs. Hdh150+Metformin $p=0,002536$, Hdh150 vs. WT+Metformin $p=0,022$, WT vs. Hdh150+Metformin $p=0,828557$, Mann-Whitney-Test. Zurückgelegte Distanz: Unterschiede nicht signifikant für alle Gruppen, Mann-Whitney-Test, $N_{WT}=10$, $N_{Hdh150}=13$, $N_{WT+Metformin}=6$, $N_{Hdh150+Metformin}=8$).

3.4.4.2 Novel Object Recognition Task (NORT) - Metformin

Die behandelten WT-Tiere absolvierten den Test ähnlich wie die unbehandelten und wiesen einen Discrimination Index von ca. 0,4 auf. Die behandelten Hdh150-Mäuse zeigten hingegen deutlich mehr Interesse an dem neuen Objekt und damit einen

signifikant höheren Index als die unbehandelten Hdh150-Tiere (Discrimination Index $\approx 0,3$, Abbildung 43). Dieser Wert war nicht signifikant niedriger als die Werte der beiden WT-Gruppen. Auch in den behandelten Gruppen wies die Explorationszeit keinen signifikanten Unterschied auf.

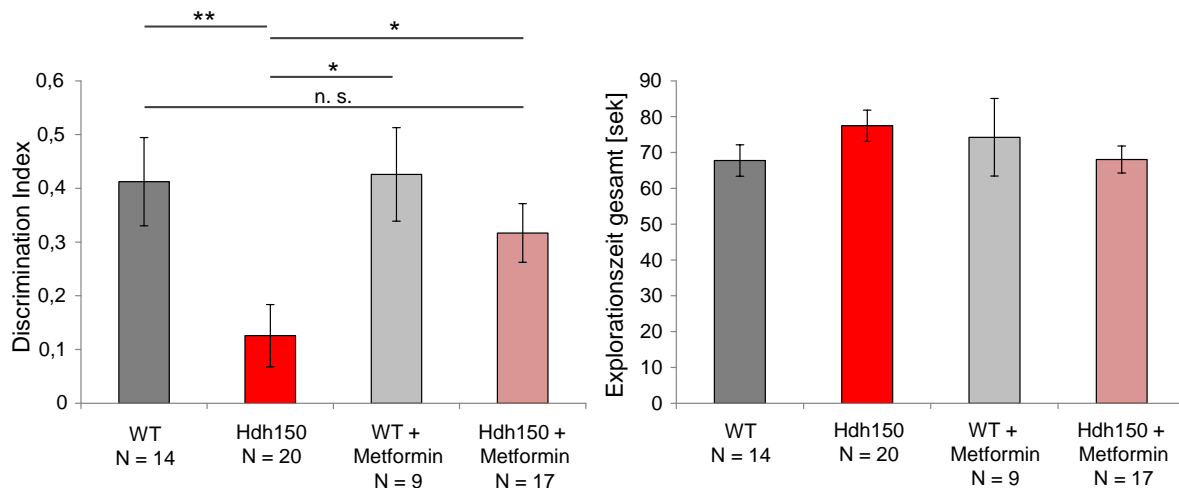


Abbildung 43: Ergebnisse des NORT nach dreiwöchiger Metforminbehandlung im Trinkwasser. Die behandelten Hdh150-Tiere zeigten ein signifikant verbessertes kognitives Verhalten und wiesen nun keinen signifikanten Unterschied mehr im Vergleich zu den WT-Tieren auf. Die gesamte Explorationszeit, bezogen auf beide Objekte, blieb dabei in allen vier Gruppen ohne signifikante Veränderung (Discrimination Index: WT vs. Hdh150 $p=0,003367$; Hdh150 vs. Hdh150+Metformin $p=0,014104$, Hdh150 vs. WT+Metformin $p=0,0113$, WT vs. Hdh150+Metformin $p=0,127763$, Mann-Whitney-Test. Explorationszeit gesamt: Unterschiede nicht signifikant für alle Gruppen, Mann-Whitney-Test, $N_{WT}=14$, $N_{Hdh150}=20$, $N_{WT+Metformin}=9$, $N_{Hdh150+Metformin}=17$).

4. Diskussion

4.1 Die MID1 Ubiquitin-Protein-Ligase in Zellproliferation und -migration

Die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase MID1 markiert die PP2A durch Polyubiquitinierung zur proteasomalen Degradierung (Trockenbacher et al., 2001). MID1 reguliert also die PP2A-Aktivität. PP2A wiederum reguliert Proliferation (Xie et al., 2015; Yang et al., 2016) und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Cadherin und β -Catenin (Gotz et al., 2000; Takahashi et al., 2006). Die dadurch stabilisierten Zellverbände müssen beim Vorgang der epithelial-mesenchymalen Transition durch reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen gelöst werden (Thiery, 2003), um eine Migration der Neuralleistenzellen gewährleisten zu können. Ist MID1 nun durch Mutation nicht in der Lage PP2A zu regulieren, akkumuliert PP2A und eine Expressionskontrolle solcher Adhäsionsmoleküle findet nicht statt. Das Migrationsverhalten sollte demnach durch Mutationen im *MID1*-Gen beeinflusst werden (Latta and Golding, 2012), was vor allem in der Embryogenese weitreichende Folgen haben kann.

Für eine korrekte Entwicklung und Schließung der ventralen Mittellinie müssen bestimmte mRNAs in daran beteiligten Zellen in bestimmten Zellkompartimenten lokalisiert sein, um eine Zellsymmetrie bzw. Zellpolarität herzustellen. Dabei findet kompartimentalisierte Proteintranslation statt (Bashirullah et al., 1998; Dreyfuss et al., 2002; Lasko, 1999; Mohr and Richter, 2001). Hierfür muss ein aktiver Transport von mRNAs entlang des Cytoskeletts und eine gezielte Translation in Ribonukleoproteinkomplexen an einem Zielort gewährleistet werden (Condeelis and Singer, 2005; Nakamura et al., 2004; Pokrywka and Stephenson, 1995; Webster et al., 1997). MID1, zusammen mit dem Elongationsfaktor 1 α (EF-1 α) und $\alpha 4$, der regulatorischen Untereinheit von PP2A, sind Teil eines solchen Ribonukleoproteinkomplexes, der beim Transport und der kontrollierten Translation eine entscheidende Rolle spielt (Aranda-Orgilles et al., 2008b). Patienten, die unter dem OS leiden, weisen einen Defekt der ventralen Mittellinie auf. Sind die oben

genannten Funktionen gestört, kann es zu den beim OS beobachteten Mittelliniendefekten kommen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Zellen mit Mutationen im *MID1*-Gen einen Migrationsdefekt zur Folge haben.

4.1.1 Der Einfluss der MID1 Ubiquitin-Protein-Ligase auf die Zellproliferation

MID1 könnte einen Einfluss auf die zelluläre Proliferation, Migration und Differenzierung haben. Deshalb, aber vor allem auch weil beim Beobachten von Migrationsverhalten potentiell auch Proliferation beobachtet wird und ein möglicher Proliferationsdefekt die Ergebnisse des Migrationsverhaltens beeinflussen könnte, wurde zunächst das Proliferationsverhalten untersucht. In den von einem OS-Patienten stammenden Fibroblasten 17/98 mit einer 4bp-Deletion im Exon 9 des *MID1*-Gens (c.1801_1804delCTCC) konnte kein Proliferationsdefekt gemessen werden. In transfizierten HeLa-Zellen mit spezifischen siRNAs, die eine Reduktion von *MID1* um 65% aufwiesen, konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu einer Kontrolle mit unspezifischer scr-siRNA gemessen werden. Auch bei transfizierten HeLa-Zellen mit einem cDNA-Konstrukt, die *MID1* etwa um den Faktor 2,5 überexprimierten, war kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle erkennbar.

Dass MID1 über die Regulierung von PP2A Einfluss auf die Proliferation nimmt, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Xie et al., 2015; Yang et al., 2016). Über eine PP2A-Inaktivierung wird eine Aktivierung von AKT und ERK erreicht, was zu einer vermehrten Zellproliferation führt. In den hier durchgeführten Experimenten scheint dies jedoch nicht der Fall zu sein. Es könnte aber auch durch die Expressionsveränderung von MID1, das Schwesterprotein MID2 eine kompensatorische Rolle spielen. MID2 ist ebenfalls eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase und wird z. T. in denselben Geweben exprimiert wie MID1 und assoziiert ebenso mit Mikrotubuli (Perry et al., 1999). Es besitzt auch ein N-terminales RBCC-Motiv, eine FNIII- und eine B30.2-Domäne (Meroni and Diez-Roux, 2005). Beide Proteine bilden Homo- und Heterodimere (Cainarca et al., 1999; Short et al., 2002) und stabilisieren und organisieren Mikrotubuliformierungen während der Schließung des Neuralrohrs

(Short et al., 2002; Suzuki et al., 2010).

Liegt durch eine 4bp-Deletion im *MID1*-Gen ein trunkiertes Protein vor, könnte MID2 eine regulatorische Funktion während der Proliferation übernehmen. Gleiches gilt, wenn die Expression von MID1 aufgrund eines KD um ca. 65% herunterreguliert wurde. Zudem wurde in diesem Fall noch zu etwa 35% funktionsfähiges MID1-Protein synthetisiert, was einen möglichen Proliferationsdefekt ebenso abschwächen würde. Im Falle der ÜE von *MID1* wäre es möglich, dass MID2 durch Heterodimerisierung eine potenzielle Überregulation von MID1 kompensieren könnte, so dass es auch hier zu keinem Proliferationsdefekt kommt.

Ein zusätzlicher *MID2*-KD in HeLa-Zellen könnte hierfür aufschlussreich sein, da eine potentiell kompensatorische Rolle durch MID2 dadurch abgeschwächt werden würde und ein potentieller Proliferationsdefekt durch KD oder ÜE von *MID1* deutlicher zu sehen wäre.

4.1.2 Der Einfluss der MID1 Ubiquitin-Protein-Ligase auf die Zellmigration

4.1.2.1 Funktionsverlust von MID1

In den Fibroblasten 17/98 konnte zwar ein schwach ausgeprägter Migrationsdefekt beobachtet werden, jedoch war dieser zu keinem Zeitpunkt signifikant. In der Literatur wurde dieselbe Fibroblastenzelllinie bereits beschrieben und es konnte aufgrund eines Funktionsverlustes von *MID1* ein Effekt auf mTOR über PP2A geschlussfolgert werden, genauer auf die Formation von mTOR und seinem Komplexpartner Raptor, die zusammen mit anderen Komplexpartnern den mTOR Complex 1 (mTORC1) bilden (Liu et al., 2011). In dieser Arbeit konnte ein morphologischer Unterschied zu den Kontrollfibroblasten 18/98 beobachtet werden, der sich im Wesentlichen auf eine Zusammenlagerung („Klumpenbildung“) der Zellen bezieht (Abbildung 16) Diese Auffälligkeit könnte durchaus mit der *MID1*-Mutation assoziiert sein. Möglich wäre eine durch den *MID1*-Funktionsverlust verursachte

Akkumulation von PP2A und der damit einhergehenden Expressionserhöhung von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin. Dadurch könnten sich mehrere Zellen zu einem „Klumpen“ zusammenlagern, was auch Einfluss auf die Migration haben könnte.

Auch ein Unterschied im Migrationsverhalten zwischen den Fibroblasten mit der 4bp-Deletion und einem *MID1*-KD ist nicht auszuschließen, da ein fehlerhaftes Protein völlig andere Auswirkungen als ein herunterreguliertes Protein haben kann. Beispielsweise ist durch den KD nur eine 65%ige Effektivität erreicht worden, was immerhin eine 35%ige normale Expression von *MID1* bedeutet. Bei dieser, wenn auch niedrigen Expression ist aber davon auszugehen, dass es sich um ein voll funktionsfähiges Protein handelt, wohingegen im Falle der Patientenfibroblasten alle translatierten Proteine den Defekt, bedingt durch die hemizygote 4bp-Deletion, tragen. Aus diesem Grund sind weitere Experimente sinnvoll. Beispielsweise wäre eine Transfektion eines *MID1*-cDNA-Konstruktes möglich, das die gleiche 4bp-Deletion trägt, wie die Fibroblastenzelllinie. Dadurch könnte man feststellen, ob ein trunkiertes Protein durch einen dominant-negativen Effekt, das endogene *MID1* in seiner Funktionsweise hemmt.

In KD-Experimenten in HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein teilweiser Funktionsverlust von *MID1* keinen Migrationsdefekt verursacht. Hier wäre ein Doppel-KD in HeLa-Zellen von *MID1* und *MID2* sinnvoll, um sicher zu stellen, ob *MID2* den Verlust von *MID1* kompensieren kann. Auch *in vivo* konnte durch eine *in utero* Elektroporation von shRNA-Konstrukten in die ventrikuläre Zone des Neocortex von E13-Embryonen kein abnormales Migrationsverhalten nach 48h nachgewiesen werden. Zudem ist eine Beeinflussung der Differenzierung der RGCs durch die *in utero* Elektroporation unwahrscheinlich, da sonst mehr Zellen in der VZ verblieben wären. Dennoch ist eine Beteiligung von *Mid1* an der Migration von RGCs von der VZ zur CP nicht völlig auszuschließen.

Mid1 wird zwischen den embryonalen Stadien E14 bis zum adulten cerebralen Cortex exprimiert mit der höchsten *Mid1*-Proteinkonzentration zwischen Stadium E15

bis zum postnatalen Tag 3, wonach die Expression langsam abnimmt. *In-situ* Experimente zeigen zudem, dass die *Mid1*-mRNA in der VZ und SVZ im Stadium E15 reichlich vorhanden ist und sich bis zum Stadium E18 bis zur CP ausbreitet (Lu et al., 2013). Zusätzlich wird jedoch auch das strukturell sehr ähnliche Schwesterprotein Mid2 teilweise in den gleichen Geweben exprimiert und ist ebenfalls mit Mikrotubuli assoziiert (Buchner et al., 1999; Perry et al., 1999). Demnach könnte auch hier der Funktionsverlust von Mid1 durch Mid2 zumindest teilweise ausgeglichen werden.

Die Versuche zur *in utero* Elektroporation sollten deshalb ergänzt werden durch 1) eine Erhöhung der Versuchsanzahl, 2) eine Überprüfung der KD-Effizienz der shRNAs, 3) die Elektroporation eines *MID1*-ÜE-Konstruktes, bei dem zu erwarten wäre, dass eine schnellere Migration von der VZ zur CP stattfindet, da dies nicht durch Mid2 kompensiert werden kann und 4) einen Doppel-KD von *Mid1* und *Mid2*, indem zwei Konstrukte gleichzeitig elektroporiert werden.

4.1.2.2 Gain-of-function von überexprimiertem MID1

Der Verdacht einer potentiellen Migrationsbeschleunigung durch eine *in utero* Elektroporation eines ÜE-Konstrukts wird unterstützt durch die Ergebnisse der *MID1*-ÜE-Experimente *in vitro*. Eine *MID1*-ÜE in HeLa-Zellen führte nachweislich zu einem signifikant schnelleren Migrationsverhalten. Die übermäßige Expression von *MID1* könnte zu einer dauerhaften Unterregulierung von PP2A führen, was es den Zellen nicht mehr ermöglicht, ein normales Adhäsionsverhalten aufrechtzuerhalten. Die Konsequenz wäre das hier beobachtete übersteuerte Migrationsverhalten. Von einer vollständigen Kompensation durch MID2 ist in diesem Fall wohl nicht auszugehen, da ein klarer Migrationsdefekt vorliegt. Wie genau MID2 fehlendes oder überexprimiertes MID1 ganz oder teilweise kompensieren kann, sollte in weiterführenden Experimenten, wie sie weiter oben vorgeschlagen wurden, gezeigt werden.

4.2 Die MID1-Ubiquitin-Protein-Ligase bei der Translation von mutHTT

Nicht nur bei der embryonalen Entwicklungsstörung OS spielt MID1 eine Rolle, sondern auch bei der Translation von mRNAs mit elongierten CAG-repeats, wie es bei HD der Fall ist. Der Komplex aus $\alpha 4$, PP2A, S6K und MID1 bindet an das CAG-repeat-Motiv solcher mRNAs, wobei die Anzahl der Bindungen mit der CAG-repeat-Anzahl proportional steigt (Krauss et al., 2013). Zusätzlich senkt MID1 die PP2A-Aktivität, was eine erhöhte mTOR-Aktivität zur Folge hat (Liu et al., 2011; Trockenbacher et al., 2001). Dies führt über die Phosphorylierung von S6K zur Aktivierung von S6 und damit zur Einleitung der Translation der elongierten mRNAs.

In dieser Arbeit sollte der Ansatz vertieft werden, über eine Inhibierung des MID1/PP2A/mTOR-Komplexes, eine Reduktion von mutHtt-Expression zu erreichen. Hierfür waren *in vitro*- und *in vivo*-Experimente geplant. Zudem sollten sehr frühe Verhaltensauffälligkeiten im Hdh150-Mausmodell untersucht werden. Anschließend sollte ein inhibitorischer Effekt des Biguanids Metformin auf die mTOR-Aktivität und die Expression von mutHtt biochemisch nachgewiesen und zusätzlich potentielle Verhaltensauffälligkeiten normalisiert werden.

4.2.1 Das präsymptomatische Stadium in der Hdh150-Maus

HD wurde zunächst als neurodegenerative Erkrankung mit später Manifestation eingestuft. Allerdings geht den ersten klinischen Symptomen ein langanhaltendes präsymptomatisches Prodromalstadium voraus. In diesem Stadium können schwer charakterisierbare und sehr unspezifische Symptome auftreten, lange bevor typische HD-Symptome erkannt werden (Ross et al., 2014). Solche Symptome reichen von reduzierter Impulsivitätskontrolle, sozialem Rückzug und geringer Konversationsteilnahme bis hin zu einem Verfall von bisher klar etablierten kognitiven Fähigkeiten (Duff et al., 2007; Labuschagne et al., 2016; Ross et al., 2014; Stout et al., 2011). Zusätzlich wurden leichte Veränderungen der kortikalen Netzwerkstruktur und funktionalen Konnektivität in funktionalen MRT-Studien beobachtet (Harrington

et al., 2015; Wolf et al., 2012). Diese Netzwerkdysregulierungen könnten bereits auftreten bevor präklinische Symptome erkennbar werden, in einer Phase, sehr früh vor Krankheitsbeginn (engl.: very far from disease onset, VFDO, Abbildung 44). Dieses vormanifestierte Stadium beginnt beim Menschen etwa 15-20 Jahre vor den ersten motorischen Auffälligkeiten in Patienten und auch lange bevor mutHTT Aggregate und neuronale Degeneration detektierbar werden. In dieser Phase könnten neuronale Netzwerkveränderungen, die zu diesem Zeitpunkt noch kompensierbar sein könnten, zu den symptomatischen Veränderungen Jahre später führen.

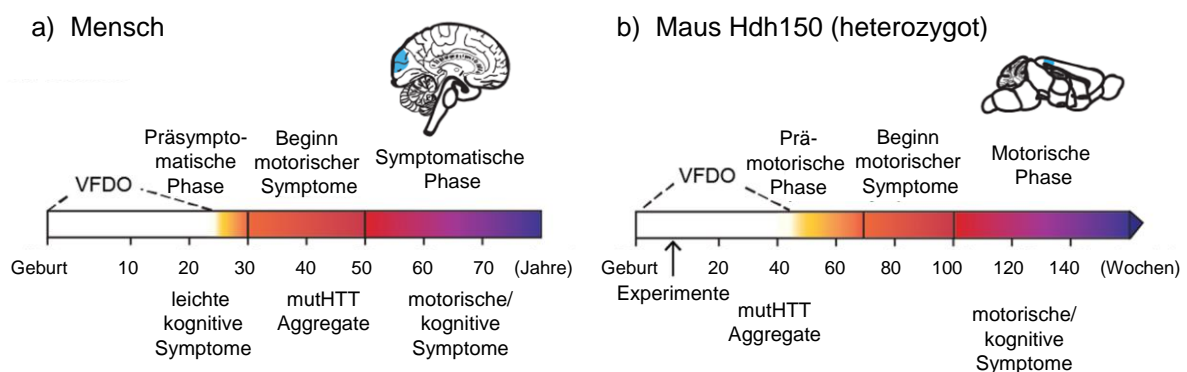


Abbildung 44: Das VFDO-Stadium von HD beim a) Mensch und b) Hdh150-Mausmodell.

Frühe neuronale Netzwerkveränderungen wurden unlängst auch schon im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit beschrieben (Busche et al., 2015; Busche and Konnerth, 2015; Iaccarino et al., 2016). Bezogen auf HD wird diese Hypothese gestützt durch die Beschreibung von HD-Biomarkern, um den Verlauf von HD nachzuvollziehen. So konnten in PET-Studien neben Veränderungen in postsynaptischen dopaminergen Rezeptoren, der Aktivität von Mikroglia oder im Gehirnstoffwechsel, vor allem Reduktionen in der Expression der Phosphodiesterase 10A (PDE10A) im Occipitallappen, welcher zum größten Teil vom visuellen Cortex eingenommen wird, identifiziert werden (Wilson et al., 2016). PDE10A reguliert intrazelluläre Signalkaskaden, indem es sekundäre Botenstoffe (second messenger) wie Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) zu AMP und GMP hydrolysiert und damit

neuronalen Fortbestand sichert. Diese Expressionsveränderung wurde bis zu 43 Jahre vor Krankheitsbeginn in Mutationsträgern beschrieben und stellt damit den bisher frühesten Biomarker für HD dar (zusammengefasst in (Wilson et al., 2017)).

Eine Beeinträchtigung des visuellen Arbeitsgedächtnisses, das mit den striatofrontalen Schleifen verknüpft ist, wurde in präsymptomatischen HD-Patienten bereits zuvor beschrieben (Tabrizi et al., 2009). Zudem wurde ein negativer Zusammenhang zwischen der räumlich-visuellen Aufmerksamkeit (genauer: der „visuellen Suche“, bei der Symbole gesucht und gefunden werden müssen) und dem Krankheitsverlauf in diagnostizierten Individuen im präsymptomatischen Stadium beschrieben (Labuschagne et al., 2016). Weiterhin wurden in einer koordinatenbasierten Metaanalyse Atrophien im Occipitallappen von prodromalen Mutationsträgern beobachtet (Dogan et al., 2013). Daraus entstand der Verdacht, dass der visuelle Cortex eventuell bereits im Frühstadium der Erkrankung beeinträchtigt wird.

In Mausmodellen waren zu späteren Zeitpunkten bereits Defizite bei der visuellen Diskriminierung beschrieben (Farrar et al., 2014). Zusätzlich wurde in 12 Monate alten YAC128-Mäusen beschrieben, dass die Anzahl der Projektionen vom visuellen Cortex zum Striatum um 72% reduziert waren im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Tieren (Kim et al., 2016). Eine noch unveröffentlichte Studie konnte in dem hier verwendeten Hdh150-Mausmodell cortikale Hyperaktivitäten im Alter von 10-17 Wochen messen (Arnoux et al., 2018). Diese könnten das frühe Resultat von striatalen Verlusten der inhibitorischen Projektionen zum Thalamus und Cortex sein.

Die durchgeführten Verhaltensexperimente im Alter von 12 Wochen dienten dazu, sehr milde präklinische Verhaltensauffälligkeiten zu detektieren, die in dem hier verwendeten Hdh150-Mausmodell zu diesem frühen Stadium der Krankheit bisher noch nicht beschrieben worden waren (Brooks et al., 2012). Diese Auffälligkeiten sollten dann genutzt werden, um die Wirksamkeit einer Metformintherapie im Anfangsstadium von HD zu testen.

Der VD und die SI-Tests ergaben in der untersuchten frühen Phase der Krankheit in den Hdh150-Mäusen keinen erkennbaren Verhaltensphänotyp. Lediglich eine leichte Hyperkompetenz konnte beim VD (Kombination 1) und beim 3-Teile-Kammer-SI beobachtet werden. Beim VD (Kombination 1) starteten die Hdh150-Mäuse mit deutlich mehr Trials pro Tag als die WT-Tiere, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied. Im 3-Teile-Kammer-SI hielten sich die Hdh150-Mäuse etwas länger im Bereich des Interaktionskäfigs auf als die WT-Tiere, jedoch auch hier ohne signifikante Unterschiede. Dies deutete bereits auf eine leichte Verhaltensauffälligkeit hin, denn in verschiedenen HD-Mausmodellen wurden bereits Hyperaktivitäten in frühen Phasen der Erkrankung festgestellt (Borlongan et al., 1995; Dougherty et al., 2014; Luesse et al., 2001; Reddy et al., 1998). Da in dieser Arbeit jedoch keine signifikanten Unterschiede im VD und SI beobachtet werden konnten, konnten sie nicht für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Reduziertes Angstverhalten und gestörte soziale Interaktion wurden bereits in anderen Tiermodellen für HD beschrieben ((Nguyen et al., 2006; Wood and Morton, 2015), zusammengefasst in (Pouladi et al., 2013)), insbesondere im R6/2-Modell (File et al., 1998). Bei der R6/2-Maus handelt es sich um das erste transgene Mausmodell, das ein Fragment des humanen Exon 1 des *HTT*-Gens unter der Kontrolle des humanen *HTT*-Promotors trägt (Mangiarini et al., 1996). Die Phänotypen hierbei sind äußerst aggressiv, so dass die ersten Nlls bereits einen Tag nach der Geburt im Striatum auftreten (Stack et al., 2005) und im CA1 des Hippocampus im Alter von drei Wochen (Murphy et al., 2000). Motorische Verhaltensauffälligkeiten treten bereits im Alter von fünf Wochen (Carter et al., 1999), und neuronaler Zellverlust im Alter von 12-13 Wochen (Stack et al., 2005) auf.

Das EPM ist wie der OF ein Versuch, bei dem das angstgesteuerte Verhalten der Tiere getestet werden kann. Von ängstlichen Mäusen wird erwartet, dass sie sich eher in den geschlossenen Armen des Maze aufhalten, die von hohen, schützenden Wänden umgeben sind. Mäusen, bei denen die Neugier die Angst überwiegt, halten sich bevorzugt in den offenen Armen auf, um die Umgebung zu erkunden. Ebenso

verhält es sich beim OF. Ängstliche Mäuse bevorzugen einen Gang entlang der Wand, um so wenigstens von einer Seite geschützt zu sein. Weniger ängstliche, neugierige Mäuse laufen öfter durch das definierte Zentrum, weg von den schützenden Wänden der Versuchsbox.

Im EPM zeigten die Hdh150-Mäuse im Alter von 12 Wochen zunächst nur ein tendenziell reduziertes Angstverhalten. Sie hielten sich zwar durchschnittlich länger in den offenen Armen auf, dies ergab allerdings keinen signifikanten Unterschied zu den WT-Tieren, was jedoch ebenso ein Hinweis auf die weiter oben beschriebene Hyperaktivität sein könnte. Im OF zeigte sich schließlich ein signifikant reduziertes Angstverhalten, indem sich die Hdh150-Tiere signifikant länger im Zentrum der Versuchsbox aufhielten. Die im OF gemessene Laufdistanz, die insgesamt zurückgelegt wurde, war in beiden Gruppen gleich. Das zeigt, dass der unterschiedlich lange Aufenthalt im Zentrum der Versuchsbox nicht von einem potentiellen Bewegungs- oder Motivationsphänotyp beeinflusst wird.

HD steht in Zusammenhang mit LTP-Defiziten (Usdin et al., 1999) und LTP-Defizite in der Amygdala werden mit reduziertem Angstverhalten assoziiert (Bauer et al., 2002; Fendt and Schmid, 2002; Rodrigues et al., 2002; Rodrigues et al., 2001). Die Amygdala erhält Projektionen vom Hippocampus und präfrontalem Cortex, Regionen, die ebenso in der Literatur in Zusammenhang mit Angst beschrieben sind (de Carvalho et al., 2010; Etkin and Wager, 2007; Francati et al., 2007; Quirk and Mueller, 2008). Vor allem der Hippocampus spielt bei der Etablierung von LTP eine große Rolle (siehe Kapitel 1.1.3), sodass möglicherweise bereits leichte Defizite in diesem Bereich Einfluss auf die Funktion der Amygdala nehmen könnten und so die hier beobachteten Verhaltensauffälligkeiten hervorrufen können. Gleichzeitig projiziert die Amygdala zum ventralen Striatum, so dass hier eventuelle Dysfunktionen Auswirkungen auf die striatofrontalen Schleifen haben könnten (Eddy et al., 2011).

Zudem zeigten Mäuse, die heterozygot für eine BDNF-Deletion waren, abnormales Angstverhalten. Die BDNF-Expression wird teilweise durch wtHTT, nicht jedoch durch

mutHTT reguliert (Zuccato et al., 2001). Abnormales Angstverhalten konnte teilweise wiederhergestellt werden durch Expression von BDNF im Hippocampus (Liu et al., 2004). Weitere Untersuchungen speziell in der Amygdala könnten hier interessante und aufschlussreiche Erkenntnisse liefern.

Der NORT konnte ebenfalls einen sehr klaren Phänotyp zeigen, bei dem sich die Hdh150-Mäuse im Vergleich zu den WT-Tieren scheinbar schlechter an ein bekanntes Objekt erinnern konnten. Die gleich große summierte Explorationszeit beider Objekte bedeutet, dass die Neugier und die Motivation, sich mit den Objekten zu beschäftigen, in beiden Gruppen gleich groß waren. Die bei der Gedächtniskonsolidierung und beim NORT angesprochenen Gehirnregionen sind vor allem präfrontaler Cortex, entorhinaler Cortex und Hippocampus (Akirav and Maroun, 2006; Buckmaster et al., 2004; Clark et al., 2000), alles Areale, die in der Pathologie von HD eine wesentliche Rolle spielen.

Da alle bisher bekannten Verhaltensauffälligkeiten und physiologischen Auswirkungen in den Hdh150-Mäusen erst ab einem Alter von 40 Wochen bekannt sind, wurde die VFDO-Phase von HD in dieser Arbeit auf die ersten 40 Lebenswochen bis kurz vor Eintreten der ersten motorischen Auffälligkeiten eingegrenzt (Abbildung 44). Das reduzierte Angstverhalten sowie die verschlechterte Gedächtniskonsolidierung im Alter von 12 Wochen liegen somit im Bereich der VFDO-Phase und können daher als präklinische Verhaltensauffälligkeiten gewertet werden.

4.2.2 Metformin als frühzeitig zu verabreichende, chronische Therapie bei HD

Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass RNAi-Strategien, wie beispielsweise Antisense-Oligonukleotide, die die Genexpression von *HTT* um 40% oder mehr herunterregulieren, ausreichend sind, um HD-assoziierte Phänotypen abzuschwächen (Consortium, 2017; Harper et al., 2005; Keiser et al., 2016; Stanek et al., 2014). Zudem hat eine postnatale Reduktion von endogenem HTT keine

detektierbaren Nebeneffekte und je früher diese Reduktion stattfindet, desto effektiver sind die Auswirkungen auf phänotypische Verhaltensauffälligkeiten. Überdies kann sogar eine temporäre Reduktion von mutHTT langwierige positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf nehmen, sogar noch Monate nach der Behandlung (Kordasiewicz et al., 2012; Lu and Yang, 2012). Trotz hoher Effektivität ist der therapeutische Nutzen solcher Techniken stark begrenzt. Das Problem solcher Ansätze liegt in der Anwendung. RNA-interferierende Oligonukleotide müssen in den Liquor cerebrospinalis, also die Zerebrospinalflüssigkeit injiziert werden, um wirksam zu werden. Dies ist für Patienten ein kräftezehrendes, aber auch für Ärzte ein mühsames Unterfangen, da der Wirkstoff wiederholt intrathekal injiziert werden muss. Bisher sind noch keine Langzeiterfolge bzw. –risiken bekannt und auch die bisher behandelten Patientenzahlen sind noch sehr gering.

Wie in Kapitel 1.3 bereits erwähnt, steht HD in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Diabetes mellitus auch mit einem höheren Risiko für kognitive Dysfunktionen und Demenz behaftet sind (Stewart and Liolitsa, 1999; Zilliox et al., 2016). Eine neurodegenerative Erkrankung wie HD würde von daher erwartungsgemäß einen eher schlechteren Verlauf nehmen. Dieser Umstand führte jedoch dazu, dass es bereits HD-Patienten gibt, die durch die Entwicklung von Diabetes mellitus mit dem Biguanid Metformin behandelt wurden. Obwohl die Anzahl der mit Metformin behandelten HD-Patienten klein war, konnte in einer Studie bereits eine verbesserte kognitive Leistung mit der Einnahme von Metformin in HD-Patienten assoziiert werden (Hervas et al., 2017). Motorische Defizite konnten in dieser Studie durch Metformin nicht verbessert werden. Zudem argumentieren die Autoren, dass andere Medikamente bei den kognitiven Verbesserungen möglicherweise eine Rolle gespielt haben könnten und die Ergebnisse demnach nicht repräsentativ sind.

Metformin wird zwar vor allem bei Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt, hat aber auch positive Effekte bei anderen Krankheiten, wie beispielsweise dem polycystischen Ovarialsyndrom und, wie zumindest im Mausmodell gezeigt wurde, dem fragilen-X-

Syndrom (siehe Kapitel 1.5). Metformin reduziert den Blutzucker durch Hemmung der hepatischen Gluconeogenese (Kirpichnikov et al., 2002; Madiraju et al., 2014). Die genauen molekularen Wirkungsmechanismen von Metformin sind jedoch nur zum Teil verstanden. Mögliche Mechanismen, wie sie in der Literatur vorgeschlagen werden, beinhalten u. a. die Inhibierung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, die Aktivierung von AMPK und die Hemmung von mTOR (Chau-Van et al., 2007; Dowling et al., 2007; Foretz et al., 2014; Soliman et al., 2016; Vazquez-Martin et al., 2009). In primären cortikalen Neuronen aktiviert es PP2A durch die Hemmung der Bindung von PP2Ac zu MID1 und $\alpha 4$, die PP2A negativ regulieren (Kickstein et al., 2010). Da die Translation von elongierter *HTT*-mRNA über den MID1/PP2A/mTOR Proteinkomplex reguliert wird (Krauss et al., 2013), liegt die Vermutung nahe, dass Metformin diese Translation reduziert.

In Zusammenhang mit Metformin als protektiver Mechanismus in HD und auch anderen neurodegenerativen Erkrankungen taucht in der Literatur zusätzlich sehr oft die Autophagie auf (zusammengefasst in (Nixon, 2013)). Die Autophagie beschreibt einen Prozess, durch den Zellen in der Lage sind, ihre eigenen Zellbestandteile in den Lysosomen zu verdauen (De Duve and Wattiaux, 1966). Bei der Autophagie unterscheidet man drei verschiedene Gruppen oder Abbauformen: Bei der Mikroautophagie fungieren die Lysosomen direkt als Aufnahmeorgan, die durch Einstülpung die zu verdauenden Bestandteile „verschlingen“. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden Proteine mit einem KFERQ-ähnlichen Motiv selektiv an das Hitzeschockprotein Hsc70 gebunden. Dieser Proteinkomplex gelangt dann zum Lysosom, wo er erkannt und abgebaut wird. Bei der Makroautophagie umschließt zunächst das endoplasmatische Retikulum das abzubauen Protein oder Organell und formt dadurch das aus einer Doppelmembran bestehende Autophagosom. Dieses Vesikel gelangt dann zu einem Lysosom und sein Inhalt wird durch Membranfusion durch saure Hydrolasen abgebaut (zusammengefasst in (Kaushik et al., 2010)). Durch diesen Prozess können Neurone auch aggregierte Proteine abbauen und sich so zumindest teilweise vor deren neurotoxischen Eigenschaften schützen (Lamark and Johansen, 2012). Der Zusammenhang

zwischen Makroautophagie und Neurodegeneration wurde gezeigt, indem die Autophagiegene *autophagy protein 5* und *7* (*Atg5*, *Atg7*) in Mäusen ausgeknockt und erhöhte Neurodegeneration sowie Akkumulation von Inklusionen beobachtet wurden (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Die Aktivierung der Autophagie kann über Glucosemangel erfolgen, weil sich hierbei das Verhältnis von AMP zu ATP verändert. Daraufhin wird AMPK über die Serin/Threonin-Kinase liver kinase B1 (LKB1) phosphoryliert und aktiviert. AMPK phosphoryliert und aktiviert nun Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2), einen negativen Regulator von mTOR. Die Aktivierung von AMPK und Inhibierung von mTOR führt nun zu einer Aktivierung der Autophagie (Corradetti et al., 2004; Inoki et al., 2003; Meley et al., 2006; Shaw et al., 2004). Wie schon in Kapitel 1.5 erwähnt, reguliert Metformin die AMPK-Aktivierung und spielt somit eine Rolle bei der Aktivierung von Autophagie. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktivierung von PP2A durch Metformin unabhängig von der AMPK-Aktivierung sein muss. In einer Studie zum Thema Tau-Phosphorylierung wurde erfolgreich Metformin eingesetzt, um PP2A als Phosphatase gegen die Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen in primären Neuronen von transgenen Alzheimer-Mäusen einzusetzen (Kickstein et al., 2010). Dieser Effekt kann durch Okadasäure und Fostriecin, beides Serin-/Threonin-Phosphatase-Inhibitoren, vollständig geblockt werden. Zudem wurde in dieser Studie durch Metformin keine erhöhte Phosphorylierung des AMPK-Targets Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) induziert und AMPK selbst nur schwach aktiviert. Der AMPK-Aktivator 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-Ribofuranoside (AICAR) hatte keinen vergleichbaren Effekt auf Tau-Phosphorylierung. Es könnte jedoch sein, dass die AMPK-Aktivierung höhere Dosen Metformin benötigt, als der hier beschriebene Weg über den MID1/PP2A/mTOR-Proteinkomplex. Da es sich um lebende Tiere mit funktionsfähiger Bluthirnschranke handelt - beim präklinischen Hdh150-Mausmodell wird davon ebenfalls ausgegangen – ist davon auszugehen, dass die Bioverfügbarkeit im Hirn begrenzt ist, auch wenn Metformin diese prinzipiell überwinden kann (Tucker et al., 1981). Die These, dass Autophagie in dieser Arbeit keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt, wird von einer anderen Studie unterstützt, bei der zwar nicht Metformin, aber der mTOR-Inhibitor Rapamycin

eingesetzt wurde, um die Aggregation von Htt zu reduzieren. Interessanterweise funktionierte dies auch in autophagiedefizienten Zellen, in denen *atg5* ausgeknockt wurde (King et al., 2008). Der Effekt von Metformin über den MID1/PP2A/mTOR-Protein-Komplex zeigt demnach einen zusätzlichen positiven regulatorischen Mechanismus, neurodegenerativen Prozessen in frühen Stadien, wenn noch keine Aggregate vorhanden sind, sowie in späten Stadien, durch Reduzierung vorhandener Aggregate, entgegenzuwirken. Damit ist Metformin ein geeignetes Medikament zur chronischen Behandlung von HD und dürfte bei regelmäßiger Einnahme die Symptome zumindest hinauszögern. Weitere Studien zur exakten Dosierung sollten hierzu noch Erwägung finden.

4.2.2.1 Metformin reduziert die mTOR- Aktivität und die Expression von mutHTT

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Metformin auf primäre Neuronen gezeigt. Nach 24h Inkubation von 2,5 mM Metformin wurde in einer Westernblotanalyse nachgewiesen, dass die Phosphorylierung des mTOR-Targets S6 in primären Neuronen, die von WT- und Hdh150-Mäusen stammen, signifikant reduziert war, was indirekt den Einfluss auf die mTOR-Aktivität zeigt. Leider konnte die Analyse nicht auf die Htt-Expression angewandt werden, da trotz Wiederholungen des Experiments, die Auswertung der Htt-Banden im Westernblot nicht möglich war. Der Grund dafür konnte nicht ermittelt werden, jedoch erweist sich eine Westernblotanalyse für das Htt-Protein, vor allem aufgrund seines molekularen Gewichts und seiner schlechten Löslichkeit, im Allgemeinen als äußerst schwierig.

Auch die *in vivo* Injektion von einer aquatischen Lösung, die 10 mg/ml Metformin enthielt, in den visuellen Cortex von Hdh150-Mäusen konnte zeigen, dass Metformin die mTOR-Aktivität reduziert. Zusätzlich wurde hier auch eine signifikante Reduktion des Htt-Proteins beobachtet, was die Wirkungsweise im lebenden Organismus beweist. Die Injektion einer H₂O-Kontrolle zeigte keinen signifikanten Effekt. Da jedoch nicht von einer therapeutischen Anwendung im Sinne einer Injektion in Patientengehirne ausgegangen werden kann, wurde zusätzlich eine dreiwöchige

Behandlung im Trinkwasser bei WT- und Hdh150-Mäusen durchgeführt. Da in früheren Studien gezeigt wurde, dass Metformin die Bluthirnschranke überwindet (Jin et al., 2016), sollten die beobachteten Effekte auch bei oraler Applikation eintreten.

Das Trinkverhalten der Tiere wurde über die dreiwöchige Behandlungsdauer beispielhaft beobachtet und erbrachte keine Unterschiede zwischen Wasser mit 5 mg/ml Metformin und Wasser ohne Metformin. Die Dosis von 5 mg/ml wurde gewählt, da sie bereits in der Literatur mehrfach erwähnt und angewandt wurde, sowohl in Experimenten zu HD, als auch in anderem Kontext (Chen et al., 2009; Kickstein et al., 2010; Ma et al., 2007; Zhuang et al., 2017). Ma et al. konnten zeigen, dass eine Dosis von 2 mg/ml Metformin die Lebensdauer von männlichen Mäusen effektiver verlängert als eine Dosis von 5 mg/ml. Jedoch wurde in dieser Studie das R6/2-Mausmodell verwendet, ein sehr progressives HD-Mausmodell mit schnell einsetzenden Symptomen (Mangiarini et al., 1996). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass sich die Funktionalität der Bluthirnschranke in HD und vor allem im R6/2-Modell rasant verschlechtert (Di Pardo et al., 2017) und deshalb davon ausgegangen werden kann, dass diese bei Ma et al. bereits defekt war. In den hier durchgeführten Experimenten mit jungen Hdh150-Mäusen wurde jedoch davon ausgegangen, dass im VFDO-Stadium die Bluthirnschranke noch völlig intakt war, weshalb 5 mg/ml Metformin verwendet wurden.

Die nach drei Wochen durchgeführte Westernblotanalyse der Whole-Brain-Lysate bestätigte die Wirkung von Metformin auf die mTOR-Aktivität. Zudem zeigte sich ein bis dahin noch nicht signifikanter Trend zu einer Reduktion von mutHtt, der sich jedoch nach verlängerter Gabe von Metformin im Trinkwasser (elf Wochen) in eine signifikant niedrigere Expression des mutierten Allels im präfrontalen Cortex verglichen mit unbehandelten Hdh150-Mäusen entwickelte. Die regionale Detektion dieses Effekts nach elfwöchiger Behandlung könnte bedeuten, dass bereits nach drei Wochen der gleiche Effekt im präfrontalen Cortex zu erkennen gewesen wäre, dieser jedoch im Whole-Brain-Lysat nicht detektierbar war. Eine weitere Analyse von Lysaten des präfrontalen Cortex nach dreiwöchiger Behandlung könnte hierbei

aufschlussreich sein. Ebenso interessant zu sehen wäre, wie sich eine noch längere Behandlung auf die mTOR-Aktivität und die Expression von *mutHtt* in den verschiedenen Hirnarealen auswirkt. In der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung war dieser Effekt nicht oder nur extrem schwach zu erkennen. Von möglichen technischen Schwierigkeiten abgesehen, die aufgrund der hohen Standardfehler sehr wahrscheinlich sind, könnte der Effekt aber auch nicht zu erkennen sein, da der Htt-Antikörper sowohl wtHtt als auch mutHtt in der IHC detektiert und anders als im Westernblot beides nicht voneinander unterschieden werden kann. Somit fällt eine reduzierte *mutHtt*-Expression in der Färbung nur sehr schwach auf. Die im Westernblot detektierte Reduktion bezieht sich auf das Verhältnis von *mutHtt*/wtHtt.

4.2.2.2 Metformin normalisiert frühe Verhaltensauffälligkeiten im Hdh150-Mausmodell

In dieser Arbeit konnten sehr früh vor Krankheitsbeginn (VFDO) manifestierte Verhaltensauffälligkeiten in Hdh150-Mäusen detektiert werden, die das Angstverhalten und die Gedächtniskonsolidierung betreffen. Gleichzeitig konnte in Westernblotanalysen ein Effekt nach dreiwöchiger Applikation von Metformin auf die Translation von *mutHTT* und die Phosphorylierung des mTOR Targets S6 *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Metformin galt bereits vorher als vielversprechendes Medikament für eine Therapieentwicklung gegen HD. So konnte es Zellen vor der von *mutHTT* induzierten Toxizität schützen (Jin et al., 2016) und zusätzlich die Lebensspanne in dem sehr progressiven transgenen R6/2-Mausmodell von männlichen Mäusen verlängern sowie motorische Verhaltensauffälligkeiten verringern (Ma et al., 2007). Die Bedeutung von früh exprimiertem *mutHTT* konnte in einer Studie demonstriert werden, in der mit Hilfe von Tamoxifen in BACHD:CAG-Cre^{ERT2}-Mäusen am 21. postnatalen Tag das gefloxtete *mutHtt* Exon 1 mit 97 repeats entfernt und somit die Expression gestoppt wurde. Trotzdem zeigten diese Tiere Monate später ähnliche Symptome verglichen mit Tieren, die nicht mit Tamoxifen behandelt wurden und somit stets *mutHtt* exprimiert hatten (Molero et al., 2016).

Die Metforminbehandlung im Trinkwasser der WT- und Hdh150-Mäuse begann im Alter von neun Wochen. Jeden Tag wurden 5 mg/ml Metformin frisch ins Trinkwasser gegeben. Das Trinkverhalten wurde beispielhaft über drei Wochen beobachtet und erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit Metformin im Trinkwasser und der Gruppe mit purem Wasser.

Die präklinischen Verhaltensphänotypen der Hdh150-Tiere, die in dieser Arbeit festgestellt wurden, konnten nach dreiwöchiger Behandlung mit Metformin im Trinkwasser vollständig beseitigt werden. Das im OF beobachtete reduzierte Angstverhalten der Hdh150-Tiere erreichte nach der Behandlung einen Wert, der vergleichbar mit den behandelten und unbehandelten WT-Tieren war und sich signifikant von den unbehandelten Hdh150-Tieren unterschied.

Im NORT erreichten die behandelten Hdh150-Mäuse zwar nicht ganz den Discrimination Index der WT-Tiere, jedoch war kein signifikanter Unterschied mehr zu den behandelten und unbehandelten WT-, dafür jedoch zu den unbehandelten Hdh150-Mäusen erkennbar. Das bedeutet, dass eine dreiwöchige orale Applikation von 5 mg/ml Metformin im Trinkwasser ausreichend war, um die zuvor beschriebenen kognitiven Verhaltensauffälligkeiten des VFDO-Stadiums im NORT auf ein WT-Niveau zu normalisieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine chronische Metforminbehandlung *in vivo* im frühen VFDO-Stadium der Hdh150-Mäuse reduziertes Angstverhalten sowie Defizite in der Gedächtniskonsolidierung normalisiert.

Arnoux et al. konnten zeigen, dass cortikale Hyperaktivitäten, die in 12 Wochen alten Hdh150-Mäusen gemessen wurden, nach dreiwöchiger Metforminbehandlung ebenso vollständig normalisiert werden konnten (Arnoux et al., 2018). Die corticalen Hyperaktivitäten und die hier festgestellten Verhaltensauffälligkeiten im VFDO-Stadium könnten miteinander im Kontext stehen. Die Restabilisierung von Netzwerkdysregulationen durch Metformin kann hierbei wesentlich dazu beitragen, die molekulare Pathophysiologie oder weitere Schäden auf neuronaler Ebene zu

verhindern, wie es bereits auch schon im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit gezeigt wurde (Iaccarino et al., 2016; Keskin et al., 2017).

5. Literatur

Adams, K.A., Maida, J.M., Golden, J.A., and Riddle, R.D. (2000). The transcription factor *Lmx1b* maintains *Wnt1* expression within the isthmus organizer. *Development* 127, 1857-1867.

Adihetty, P., Iorio, L.M., Hennessy, T., Ho, D.J., Calingasan, N., Yang, W.X., Beal, F.M. (2010). Effect of chronic metformin treatment in a mouse model of Huntington's disease. *The FASEB Journal Vol. 24, No. 1_supplement*.

Akirav, I., and Maroun, M. (2006). Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex* 16, 1759-1765.

Albin, R.L., Young, A.B., and Penney, J.B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12, 366-375.

Alexander, G.E., Crutcher, M.D., and DeLong, M.R. (1990). Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res* 85, 119-146.

Alexopoulos, G.S. (2005). Depression in the elderly. *Lancet* 365, 1961-1970.

Allen, G.I., and Tsukahara, N. (1974). Cerebrocerebellar communication systems. *Physiol Rev* 54, 957-1006.

Altherr, M.R., Wasmuth, J.J., Seldin, M.F., Nadeau, J.H., Baehr, W., and Pittler, S.J. (1992). Chromosome mapping of the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in mouse and human: tight linkage to the Huntington disease region (4p16.3). *Genomics* 12, 750-754.

Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-1128.

Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591.

Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Barnes, G., Bates, G.P., Lin, C.S., Srinidhi, J., Baxendale, S., Hummerich, H., Lehrach, H., Altherr, M., *et al.* (1994). Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* 20, 27-38.

Andersen, P., Bliss, T.V., and Skrede, K.K. (1971). Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 13, 222-238.

Anderson, P.M., R; Amaral, D; Bliss, T; O'Keefe, J (2007). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.

Anderson, S.A., Qiu, M., Bulfone, A., Eisenstat, D.D., Meneses, J., Pedersen, R., and Rubenstein, J.L. (1997). Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19, 27-37.

Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Stanojevic, V., Hughes, D.B., Browne, S.E., Leech, C.A., Ferrante, R.J., Habener, J.F., Beal, M.F., and Thomas, M.K. (2002). Huntington's disease of the endocrine pancreas: insulin deficiency and diabetes mellitus due to impaired insulin gene expression. *Neurobiol Dis* 11, 410-424.

Aranda-Orgilles, B., Aigner, J., Kunath, M., Lurz, R., Schneider, R., and Schweiger, S. (2008a). Active transport of the ubiquitin ligase MID1 along the microtubules is regulated by protein phosphatase 2A. *PloS one* 3, e3507.

Aranda-Orgilles, B., Trockenbacher, A., Winter, J., Aigner, J., Kohler, A., Jastrzebska, E., Stahl, J., Muller, E.C., Otto, A., Wanker, E.E., *et al.* (2008b). The Opitz syndrome gene product MID1 assembles a microtubule-associated ribonucleoprotein complex. *Human genetics* 123, 163-176.

Arnoux, I., Willam, M., Griesche, N., Krummeich, J., Watari, H., Offermann, N., Weber, S., P., N.D., Chen, C., Monteiro, O., *et al.* (2018). Metformin reverses early cortical network dysfunction and behavior changes in Huntington's Disease. unpublished.

Auerbach, W., Hurlbert, M.S., Hilditch-Maguire, P., Wadghiri, Y.Z., Wheeler, V.C., Cohen, S.I., Joyner, A.L., MacDonald, M.E., and Turnbull, D.H. (2001). The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. *Hum Mol Genet* 10, 2515-2523.

Bähr, M.F., Michael; (2009). *Neurologisch-topische Diagnostik: Anatomie - Funktion - Klinik*. Thieme Verlag.

Barbeau, A. (1970). Parental ascent in the juvenile form of Huntington's chorea. *Lancet* 2, 937.

Barnes, G.T., Duyao, M.P., Ambrose, C.M., McNeil, S., Persichetti, F., Srinidhi, J., Gusella, J.F., and MacDonald, M.E. (1994). Mouse Huntington's disease gene homolog (*Hdh*). *Somat Cell Mol Genet* 20, 87-97.

Bashirullah, A., Cooperstock, R.L., and Lipshitz, H.D. (1998). RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* 67, 335-394.

Battaglia, A., Carey, J.C., and South, S.T. (1993). Wolf-Hirschhorn Syndrome. In GeneReviews((R)), M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA)).

Battaglia, A., Filippi, T., and Carey, J.C. (2008). Update on the clinical features and natural history of Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 148C, 246-251.

Bauer, E.P., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. (2002). NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22, 5239-5249.

Bennett, E.L., Diamond, M.C., Krech, D., and Rosenzweig, M.R. (1964). Chemical and Anatomical Plasticity Brain. *Science* 146, 610-619.

Bilsland, J.G., Wheeldon, A., Mead, A., Znamenskiy, P., Almond, S., Waters, K.A., Thakur, M., Beaumont, V., Bonnert, T.P., Heavens, R., *et al.* (2008). Behavioral and neurochemical alterations in mice deficient in anaplastic lymphoma kinase suggest therapeutic potential for psychiatric indications. *Neuropsychopharmacology* 33, 685-700.

Bjorkqvist, M., Fex, M., Renstrom, E., Wierup, N., Petersen, A., Gil, J., Bacos, K., Popovic, N., Li, J.Y., Sundler, F., *et al.* (2005). The R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease develops diabetes due to deficient beta-cell mass and exocytosis. *Hum Mol Genet* 14, 565-574.

Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.

Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., *et al.* (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell stem cell* 22, 589-599 e585.

Bork, P., Holm, L., and Sander, C. (1994). The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol* 242, 309-320.

Borlongan, C.V., Koutouzis, T.K., Freeman, T.B., Cahill, D.W., and Sanberg, P.R. (1995). Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease. *Brain Res* 697, 254-257.

Britt, J.P., Benaliouad, F., McDevitt, R.A., Stuber, G.D., Wise, R.A., and Bonci, A. (2012). Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron* 76, 790-803.

Brooks, S., Higgs, G., Jones, L., and Dunnett, S.B. (2012). Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in Hdh(CAG)150 Huntington's disease knock-in mice. *Brain Res Bull* 88, 182-188.

Brooks, S.P., Betteridge, H., Trueman, R.C., Jones, L., and Dunnett, S.B. (2006). Selective extra-dimensional set shifting deficit in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Brain Res Bull* 69, 452-457.

Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.

Buchner, G., Montini, E., Andolfi, G., Quaderi, N., Cainarca, S., Messali, S., Bassi, M.T., Ballabio, A., Meroni, G., and Franco, B. (1999). MID2, a homologue of the Opitz syndrome gene MID1: similarities in subcellular localization and differences in expression during development. *Hum Mol Genet* 8, 1397-1407.

Buckmaster, C.A., Eichenbaum, H., Amaral, D.G., Suzuki, W.A., and Rapp, P.R. (2004). Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in monkeys. *J Neurosci* 24, 9811-9825.

Burgess, N. (2008). Spatial cognition and the brain. *Ann N Y Acad Sci* 1124, 77-97.

Busche, M.A., Chen, X., Henning, H.A., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Sakmann, B., and Konnerth, A. (2012). Critical role of soluble amyloid-beta for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8740-8745.

Busche, M.A., Eichhoff, G., Adelsberger, H., Abramowski, D., Wiederhold, K.H., Haass, C., Staufenbiel, M., Konnerth, A., and Garaschuk, O. (2008). Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321, 1686-1689.

Busche, M.A., Kekus, M., Adelsberger, H., Noda, T., Forstl, H., Nelken, I., and Konnerth, A. (2015). Rescue of long-range circuit dysfunction in Alzheimer's disease models. *Nat Neurosci* 18, 1623-1630.

Busche, M.A., and Konnerth, A. (2015). Neuronal hyperactivity--A key defect in Alzheimer's disease? *Bioessays* 37, 624-632.

- Cainarca, S., Messali, S., Ballabio, A., and Meroni, G. (1999). Functional characterization of the Opitz syndrome gene product (midin): evidence for homodimerization and association with microtubules throughout the cell cycle. *Hum Mol Genet* *8*, 1387-1396.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., and Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci* *17*, 1022-1030.
- Cambroner, F., and Puelles, L. (2000). Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. *The Journal of comparative neurology* *427*, 522-545.
- Campbell, K. (2003). Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* *13*, 50-56.
- Campbell, K., Olsson, M., and Bjorklund, A. (1995). Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. *Neuron* *15*, 1259-1273.
- Campbell, N.R., JB (2006). *Biology*. Pearson Studium *6th Edition*, 1245-1246.
- Carter, R.J., Lione, L.A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G.P., Dunnett, S.B., and Morton, A.J. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* *19*, 3248-3257.
- Chau-Van, C., Gamba, M., Salvi, R., Gaillard, R.C., and Pralong, F.P. (2007). Metformin inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated kinase activation and prevents increases in neuropeptide Y expression in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology* *148*, 507-511.
- Chavez, R.S., and Heatherton, T.F. (2015). Multimodal frontostriatal connectivity underlies individual differences in self-esteem. *Soc Cogn Affect Neurosci* *10*, 364-370.
- Chen, Y., Zhou, K., Wang, R., Liu, Y., Kwak, Y.D., Ma, T., Thompson, R.C., Zhao, Y., Smith, L., Gasparini, L., *et al.* (2009). Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 3907-3912.
- Chudasama, Y., and Robbins, T.W. (2006). Functions of frontostriatal systems in cognition: comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans. *Biol Psychol* *73*, 19-38.
- Clabough, E.B. (2013). Huntington's disease: the past, present, and future search for disease modifiers. *Yale J Biol Med* *86*, 217-233.

Clark, R.E., Zola, S.M., and Squire, L.R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 20, 8853-8860.

Collingridge, G.L., Kehl, S.J., and McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 334, 33-46.

Condeelis, J., and Singer, R.H. (2005). How and why does beta-actin mRNA target? *Biol Cell* 97, 97-110.

Consortium, H.D.i. (2017). Developmental alterations in Huntington's disease neural cells and pharmacological rescue in cells and mice. *Nat Neurosci* 20, 648-660.

Cooke, S.F., and Bliss, T.V. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129, 1659-1673.

Cordero, J.F., and Holmes, L.B. (1978). Phenotypic overlap of the BBB and G syndromes. *Am J Med Genet* 2, 145-152.

Corradetti, M.N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R.A., and Guan, K.L. (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes & development* 18, 1533-1538.

Corrales, J.D., Blaess, S., Mahoney, E.M., and Joyner, A.L. (2006). The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development* 133, 1811-1821.

Crossley, P.H., Martinez, S., and Martin, G.R. (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380, 66-68.

Davies, S.N., and Collingridge, G.L. (1989). Role of excitatory amino acid receptors in synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampus. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 236, 373-384.

Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., and Bates, G.P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537-548.

de Carvalho, M.R., Rozenhal, M., and Nardi, A.E. (2010). The fear circuitry in panic disorder and its modulation by cognitive-behaviour therapy interventions. *World J Biol Psychiatry* 11, 188-198.

De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28, 435-492.

Deacon, T.W., Pakzaban, P., and Isacson, O. (1994). The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain Res* 668, 211-219.

Dehay, C., and Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nature reviews Neuroscience* 8, 438-450.

Demir, U., Koehler, A., Schneider, R., Schweiger, S., and Klocker, H. (2014). Metformin anti-tumor effect via disruption of the MID1 translational regulator complex and AR downregulation in prostate cancer cells. *BMC Cancer* 14, 52.

Deniau, J.M., and Chevalier, G. (1992). The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: distribution of projection neurons. *Neuroscience* 46, 361-377.

Di Pardo, A., Amico, E., Scalabri, F., Pepe, G., Castaldo, S., Elifani, F., Capocci, L., De Sanctis, C., Commerci, L., Pompeo, F., *et al.* (2017). Impairment of blood-brain barrier is an early event in R6/2 mouse model of Huntington Disease. *Scientific reports* 7, 41316.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A., *et al.* (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14, 1075-1081.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.

Dogan, I., Eickhoff, S.B., Schulz, J.B., Shah, N.J., Laird, A.R., Fox, P.T., and Reetz, K. (2013). Consistent neurodegeneration and its association with clinical progression in Huntington's disease: a coordinate-based meta-analysis. *Neuro-degenerative diseases* 12, 23-35.

Dougherty, S.E., Hollimon, J.J., McMeekin, L.J., Bohannon, A.S., West, A.B., Lesort, M., Hablitz, J.J., and Cowell, R.M. (2014). Hyperactivity and cortical disinhibition in mice with restricted expression of mutant huntingtin to parvalbumin-positive cells. *Neurobiol Dis* 62, 160-171.

Doughty, M.L., Lohof, A., Campana, A., Delhaye-Bouchaud, N., and Mariani, J. (1998). Neurotrophin-3 promotes cerebellar granule cell exit from the EGL. *The European journal of neuroscience* 10, 3007-3011.

Dowling, R.J., Zakikhani, M., Fantus, I.G., Pollak, M., and Sonenberg, N. (2007). Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer research* 67, 10804-10812.

Dreyfuss, G., Kim, V.N., and Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 195-205.

Duff, K., Paulsen, J.S., Beglinger, L.J., Langbehn, D.R., Stout, J.C., and Predict, H.D.I.o.t.H.S.G. (2007). Psychiatric symptoms in Huntington's disease before diagnosis: the predict-HD study. *Biol Psychiatry* 62, 1341-1346.

Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., Folstein, S., Ross, C., Franz, M., Abbott, M., *et al.* (1993). Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* 4, 387-392.

Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., *et al.* (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269, 407-410.

Dvorak-Carbone, H., and Schuman, E.M. (1999). Long-term depression of temporoammonic-CA1 hippocampal synaptic transmission. *J Neurophysiol* 81, 1036-1044.

Eddy, C.M., Mitchell, I.J., Beck, S.R., Cavanna, A.E., and Rickards, H.E. (2011). Altered subjective fear responses in Huntington's disease. *Parkinsonism & related disorders* 17, 386-389.

Ekstrom, A.D., Kahana, M.J., Caplan, J.B., Fields, T.A., Isham, E.A., Newman, E.L., and Fried, I. (2003). Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature* 425, 184-188.

El-Falougy, H., and Benuska, J. (2006). History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratisl Lek Listy* 107, 103-106.

Elenbaas, B., Dobbstein, M., Roth, J., Shenk, T., and Levine, A.J. (1996). The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Mol Med* 2, 439-451.

Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 215, 244-254.

Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31, 47-59.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.

- Etkin, A., and Wager, T.D. (2007). Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am J Psychiatry* *164*, 1476-1488.
- Evans, A.E., Kelly, C.M., Precious, S.V., and Rosser, A.E. (2012). Molecular regulation of striatal development: a review. *Anat Res Int* *2012*, 106529.
- Evarts, E.V., and Thach, W.T. (1969). Motor mechanisms of the CNS: cerebrocerebellar interrelations. *Annu Rev Physiol* *31*, 451-498.
- Farrar, A.M., Murphy, C.A., Paterson, N.E., Oakeshott, S., He, D., Alosio, W., McConnell, K., Menalled, L.B., Ramboz, S., Park, L.C., *et al.* (2014). Cognitive deficits in transgenic and knock-in HTT mice parallel those in Huntington's disease. *J Huntingtons Dis* *3*, 145-158.
- Farrer, L.A. (1985). Diabetes mellitus in Huntington disease. *Clin Genet* *27*, 62-67.
- Feigin, A., Leenders, K.L., Moeller, J.R., Missimer, J., Kuenig, G., Spetsieris, P., Antonini, A., and Eidelberg, D. (2001). Metabolic network abnormalities in early Huntington's disease: an [(18)F]FDG PET study. *J Nucl Med* *42*, 1591-1595.
- Feigin, A., Tang, C., Ma, Y., Mattis, P., Zgaljardic, D., Guttman, M., Paulsen, J.S., Dhawan, V., and Eidelberg, D. (2007). Thalamic metabolism and symptom onset in preclinical Huntington's disease. *Brain* *130*, 2858-2867.
- Fendt, M., and Schmid, S. (2002). Metabotropic glutamate receptors are involved in amygdaloid plasticity. *The European journal of neuroscience* *15*, 1535-1541.
- Fernandez, A.S., Pieau, C., Reperant, J., Boncinelli, E., and Wassef, M. (1998). Expression of the *Emx-1* and *Dlx-1* homeobox genes define three molecularly distinct domains in the telencephalon of mouse, chick, turtle and frog embryos: implications for the evolution of telencephalic subdivisions in amniotes. *Development* *125*, 2099-2111.
- File, S.E., Mahal, A., Mangiarini, L., and Bates, G.P. (1998). Striking changes in anxiety in Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res* *805*, 234-240.
- Florio, M., and Huttner, W.B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development* *141*, 2182-2194.
- Fontanella, B., Russolillo, G., and Meroni, G. (2008). MID1 mutations in patients with X-linked Opitz G/BBB syndrome. *Hum Mutat* *29*, 584-594.
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., and Viollet, B. (2014). Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* *20*, 953-966.

Francati, V., Vermetten, E., and Bremner, J.D. (2007). Functional neuroimaging studies in posttraumatic stress disorder: review of current methods and findings. *Depress Anxiety* 24, 202-218.

French, D., and Edsall, J.T. (1945). The Reactions of Formaldehyde with Amino Acids and Proteins. *Adv Protein Chem* 2, 277-335.

French, S.J., and Totterdell, S. (2002). Hippocampal and prefrontal cortical inputs monosynaptically converge with individual projection neurons of the nucleus accumbens. *The Journal of comparative neurology* 446, 151-165.

Gantois, I., Khoutorsky, A., Popic, J., Aguilar-Valles, A., Freemantle, E., Cao, R., Sharma, V., Pooters, T., Nagpal, A., Skalecka, A., *et al.* (2017). Metformin ameliorates core deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat Med* 23, 674-677.

Gerfen, C.R., Staines, W.A., Arbuthnott, G.W., and Fibiger, H.C. (1982). Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *The Journal of comparative neurology* 207, 283-303.

Gerfen, C.R., and Surmeier, D.J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34, 441-466.

Gerrow, K., and Triller, A. (2010). Synaptic stability and plasticity in a floating world. *Curr Opin Neurobiol* 20, 631-639.

Gimenez-Amaya, J.M. (1991). The association cortex and the basal ganglia: a neuroanatomical view upon their relationship based on hodological studies. *J Hirnforsch* 32, 501-510.

Gotz, J., Probst, A., Ehler, E., Hemmings, B., and Kues, W. (1998). Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12370-12375.

Gotz, J., Probst, A., Mistl, C., Nitsch, R.M., and Ehler, E. (2000). Distinct role of protein phosphatase 2A subunit Calpha in the regulation of E-cadherin and beta-catenin during development. *Mech Dev* 93, 83-93.

Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature reviews Neuroscience* 8, 481-488.

Granata, A., and Quaderi, N.A. (2003). The Opitz syndrome gene MID1 is essential for establishing asymmetric gene expression in Hensen's node. *Dev Biol* 258, 397-405.

Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 27, 113-159.

Group, T.H.s.D.C.R. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971-983.

Group, U.P.D.S.U. (1998). Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352, 854-865.

Grunwald, T., Lehnertz, K., Heinze, H.J., Helmstaedter, C., and Elger, C.E. (1998). Verbal novelty detection within the human hippocampus proper. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3193-3197.

Gruss, P., and Walther, C. (1992). Pax in development. *Cell* 69, 719-722.

Guimaraes, H.C., Levy, R., Teixeira, A.L., Beato, R.G., and Caramelli, P. (2008). Neurobiology of apathy in Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr* 66, 436-443.

Gusella, J.F., Tanzi, R.E., Bader, P.I., Phelan, M.C., Stevenson, R., Hayden, M.R., Hofman, K.J., Faryniarz, A.G., and Gibbons, K. (1985). Deletion of Huntington's disease-linked G8 (D4S10) locus in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature* 318, 75-78.

Gutekunst, C.A., Levey, A.I., Heilman, C.J., Whaley, W.L., Yi, H., Nash, N.R., Rees, H.D., Madden, J.J., and Hersch, S.M. (1995). Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8710-8714.

Hackam, A.S., Singaraja, R., Wellington, C.L., Metzler, M., McCutcheon, K., Zhang, T., Kalchman, M., and Hayden, M.R. (1998). The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *J Cell Biol* 141, 1097-1105.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., *et al.* (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889.

Harper, S.Q., Staber, P.D., He, X., Eliason, S.L., Martins, I.H., Mao, Q., Yang, L., Kotin, R.M., Paulson, H.L., and Davidson, B.L. (2005). RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5820-5825.

Harrington, D.L., Rubinov, M., Durgerian, S., Mourany, L., Reece, C., Koenig, K., Bullmore, E., Long, J.D., Paulsen, J.S., Group, P.-H.i.o.t.H.S., *et al.* (2015). Network topology and functional connectivity disturbances precede the onset of Huntington's disease. *Brain* 138, 2332-2346.

Helander, K.G. (1994). Kinetic-Studies of Formaldehyde Binding in Tissue. *Biotech Histochem* 69, 177-179.

Helmstaedter, C., Grunwald, T., Lehnertz, K., Gleissner, U., and Elger, C.E. (1997). Differential involvement of left temporolateral and temporomesial structures in verbal declarative learning and memory: evidence from temporal lobe epilepsy. *Brain Cogn* 35, 110-131.

Heng, M.Y., Tallaksen-Greene, S.J., Detloff, P.J., and Albin, R.L. (2007). Longitudinal evaluation of the Hdh(CAG)150 knock-in murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* 27, 8989-8998.

Hervas, D., Fornes-Ferrer, V., Gomez-Escribano, A.P., Sequedo, M.D., Peiro, C., Millan, J.M., and Vazquez-Manrique, R.P. (2017). Metformin intake associates with better cognitive function in patients with Huntington's disease. *PLoS one* 12, e0179283.

Hevner, R.F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A.M., Campagnoni, A.T., and Rubenstein, J.L. (2001). *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29, 353-366.

Hirschhorn, K., Cooper, H.L., and Firschein, I.L. (1965). Deletion of short arms of chromosome 4-5 in a child with defects of midline fusion. *Humangenetik* 1, 479-482.

Hodgson, J.G., Agopyan, N., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D.J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., *et al.* (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 23, 181-192.

Hoffner, G., Kahlem, P., and Djian, P. (2002). Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. *J Cell Sci* 115, 941-948.

Hoogeveen, A.T., Willemsen, R., Meyer, N., de Rooij, K.E., Roos, R.A., van Ommen, G.J., and Galjaard, H. (1993). Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet* 2, 2069-2073.

Hou, L., Antion, M.D., Hu, D., Spencer, C.M., Paylor, R., and Klann, E. (2006). Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron* 51, 441-454.

Hughes, J.R. (1958). Post-tetanic potentiation. *Physiol Rev* 38, 91-113.

Huntington, G. (2003). On chorea. George Huntington, M.D. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15, 109-112.

Hurlbert, M.S., Zhou, W., Wasmeier, C., Kaddis, F.G., Hutton, J.C., and Freed, C.R. (1999). Mice transgenic for an expanded CAG repeat in the Huntington's disease gene develop diabetes. *Diabetes* 48, 649-651.

Iaccarino, H.F., Singer, A.C., Martorell, A.J., Rudenko, A., Gao, F., Gillingham, T.Z., Mathys, H., Seo, J., Kritskiy, O., Abdurrob, F., *et al.* (2016). Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. *Nature* **540**, 230-235.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590.

Ishii, K., Kubo, K.I., and Nakajima, K. (2016). Reelin and Neuropsychiatric Disorders. *Front Cell Neurosci* **10**, 229.

Jain, M., Armstrong, R.J., Barker, R.A., and Rosser, A.E. (2001). Cellular and molecular aspects of striatal development. *Brain Res Bull* **55**, 533-540.

Jeong, S.J., Kim, M., Chang, K.A., Kim, H.S., Park, C.H., and Suh, Y.H. (2006). Huntingtin is localized in the nucleus during preimplantation embryo development in mice. *Int J Dev Neurosci* **24**, 81-85.

Jin, J., Gu, H., Anders, N.M., Ren, T., Jiang, M., Tao, M., Peng, Q., Rudek, M.A., and Duan, W. (2016). Metformin Protects Cells from Mutant Huntingtin Toxicity Through Activation of AMPK and Modulation of Mitochondrial Dynamics. *Neuromolecular Med* **18**, 581-592.

Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549-552.

Joyner, A.L., and Martin, G.R. (1987). En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the *Drosophila* engrailed gene: expression during embryogenesis. *Genes & development* **1**, 29-38.

Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420-1428.

Kasugai, Y., Swinny, J.D., Roberts, J.D., Dalezios, Y., Fukazawa, Y., Sieghart, W., Shigemoto, R., and Somogyi, P. (2010). Quantitative localisation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptor subunits on hippocampal pyramidal cells by freeze-fracture replica immunolabelling. *The European journal of neuroscience* **32**, 1868-1888.

Kaushik, S., Singh, R., and Cuervo, A.M. (2010). Autophagic pathways and metabolic stress. *Diabetes Obes Metab* **12 Suppl 2**, 4-14.

Keiser, M.S., Kordasiewicz, H.B., and McBride, J.L. (2016). Gene suppression strategies for dominantly inherited neurodegenerative diseases: lessons from Huntington's disease and spinocerebellar ataxia. *Hum Mol Genet* **25**, R53-64.

- Keskin, A.D., Kekus, M., Adelsberger, H., Neumann, U., Shimshek, D.R., Song, B., Zott, B., Peng, T., Forstl, H., Staufenbiel, M., *et al.* (2017). BACE inhibition-dependent repair of Alzheimer's pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 8631-8636.
- Kickstein, E., Krauss, S., Thornhill, P., Rutschow, D., Zeller, R., Sharkey, J., Williamson, R., Fuchs, M., Kohler, A., Glossmann, H., *et al.* (2010). Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 21830-21835.
- Kim, D., Jeon, J., Cheong, E., Kim, D.J., Ryu, H., Seo, H., and Kim, Y.K. (2016). Neuroanatomical Visualization of the Impaired Striatal Connectivity in Huntington's Disease Mouse Model. *Mol Neurobiol* *53*, 2276-2286.
- King, M.A., Hands, S., Hafiz, F., Mizushima, N., Tolkovsky, A.M., and Wyttenbach, A. (2008). Rapamycin inhibits polyglutamine aggregation independently of autophagy by reducing protein synthesis. *Mol Pharmacol* *73*, 1052-1063.
- Kinoshita, K., Nemoto, T., Nabeshima, K., Kondoh, H., Niwa, H., and Yanagida, M. (1996). The regulatory subunits of fission yeast protein phosphatase 2A (PP2A) affect cell morphogenesis, cell wall synthesis and cytokinesis. *Genes Cells* *1*, 29-45.
- Kirpichnikov, D., McFarlane, S.I., and Sowers, J.R. (2002). Metformin: an update. *Annals of internal medicine* *137*, 25-33.
- Klement, I.A., Skinner, P.J., Kaytor, M.D., Yi, H., Hersch, S.M., Clark, H.B., Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. (1998). Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* *95*, 41-53.
- Kloppel, S., Stonnington, C.M., Petrovic, P., Mobbs, D., Tuscher, O., Craufurd, D., Tabrizi, S.J., and Frackowiak, R.S. (2010). Irritability in pre-clinical Huntington's disease. *Neuropsychologia* *48*, 549-557.
- Knowles, W.D. (1992). Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin Neurophysiol* *9*, 252-263.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., *et al.* (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* *441*, 880-884.
- Kordasiewicz, H.B., Stanek, L.M., Wancewicz, E.V., Mazur, C., McAlonis, M.M., Pytel, K.A., Artates, J.W., Weiss, A., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S., *et al.* (2012). Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron* *74*, 1031-1044.

Krauss, S., Griesche, N., Jastrzebska, E., Chen, C., Rutschow, D., Achmuller, C., Dorn, S., Boesch, S.M., Lalowski, M., Wanker, E., *et al.* (2013). Translation of HTT mRNA with expanded CAG repeats is regulated by the MID1-PP2A protein complex. *Nature communications* 4, 1511.

Kruszka, P., Li, D., Harr, M.H., Wilson, N.R., Swarr, D., McCormick, E.M., Chiavacci, R.M., Li, M., Martinez, A.F., Hart, R.A., *et al.* (2015). Mutations in SPECC1L, encoding sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1-like, are found in some cases of autosomal dominant Opitz G/BBB syndrome. *J Med Genet* 52, 104-110.

Kumar, A., Singh, A., and Ekavali (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep* 67, 195-203.

Kunzle, H. (1975). Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*. *Brain Res* 88, 195-209.

La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E., and Fischbeck, K.H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352, 77-79.

Labuschagne, I., Cassidy, A.M., Scahill, R.I., Johnson, E.B., Rees, E., O'Regan, A., Queller, S., Frost, C., Leavitt, B.R., Durr, A., *et al.* (2016). Visuospatial Processing Deficits Linked to Posterior Brain Regions in Premanifest and Early Stage Huntington's Disease. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS* 22, 595-608.

Lamark, T., and Johansen, T. (2012). Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int J Cell Biol* 2012, 736905.

Lancioni, A., Pizzo, M., Fontanella, B., Ferrentino, R., Napolitano, L.M., De Leonibus, E., and Meroni, G. (2010). Lack of Mid1, the mouse ortholog of the Opitz syndrome gene, causes abnormal development of the anterior cerebellar vermis. *J Neurosci* 30, 2880-2887.

Langston, R.F., and Wood, E.R. (2010). Associative recognition and the hippocampus: differential effects of hippocampal lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. *Hippocampus* 20, 1139-1153.

Lasko, P. (1999). RNA sorting in *Drosophila* oocytes and embryos. *FASEB J* 13, 421-433.

Latta, E.J., and Golding, J.P. (2012). Regulation of PP2A activity by Mid1 controls cranial neural crest speed and gangliogenesis. *Mech Dev* 128, 560-576.

Lee, S.M., Danielian, P.S., Fritsch, B., and McMahon, A.P. (1997). Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development* 124, 959-969.

Levri, K.M., Slaymaker, E., Last, A., Yeh, J., Ference, J., D'Amico, F., and Wilson, S.A. (2005). Metformin as treatment for overweight and obese adults: a systematic review. *Annals of family medicine* 3, 457-461.

Lin, C.H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W.M., Cearley, J.A., Jackson, W.S., Crouse, A.B., Ren, S., Li, X.J., Albin, R.L., and Detloff, P.J. (2001). Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10, 137-144.

Liu, E., Knutzen, C.A., Krauss, S., Schweiger, S., and Chiang, G.G. (2011). Control of mTORC1 signaling by the Opitz syndrome protein MID1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8680-8685.

Liu, I.Y., Lyons, W.E., Mamounas, L.A., and Thompson, R.F. (2004). Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *J Neurosci* 24, 7958-7963.

Liu, J., Prickett, T.D., Elliott, E., Meroni, G., and Brautigan, D.L. (2001). Phosphorylation and microtubule association of the Opitz syndrome protein mid-1 is regulated by protein phosphatase 2A via binding to the regulatory subunit alpha 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6650-6655.

Lord, J.M., Flight, I.H., and Norman, R.J. (2003). Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 327, 951-953.

Lovering, R., Hanson, I.M., Borden, K.L., Martin, S., O'Reilly, N.J., Evan, G.I., Rahman, D., Pappin, D.J., Trowsdale, J., and Freemont, P.S. (1993). Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2112-2116.

Lu, T., Chen, R., Cox, T.C., Moldrich, R.X., Kurniawan, N., Tan, G., Perry, J.K., Ashworth, A., Bartlett, P.F., Xu, L., *et al.* (2013). X-linked microtubule-associated protein, Mid1, regulates axon development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 19131-19136.

Lu, X.H., and Yang, X.W. (2012). "Huntingtin holiday": progress toward an antisense therapy for Huntington's disease. *Neuron* 74, 964-966.

Luesse, H.G., Schiefer, J., Spruenken, A., Puls, C., Block, F., and Kosinski, C.M. (2001). Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: behavioral testing and impact of diabetes mellitus. *Behav Brain Res* 126, 185-195.

Lunkes, A., and Mandel, J.L. (1998). A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 7, 1355-1361.

Luskin, M.B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189.

Lynch, G., Kramar, E.A., Rex, C.S., Jia, Y., Chappas, D., Gall, C.M., and Simmons, D.A. (2007). Brain-derived neurotrophic factor restores synaptic plasticity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 27, 4424-4434.

Ma, T.C., Buescher, J.L., Oatis, B., Funk, J.A., Nash, A.J., Carrier, R.L., and Hoyt, K.R. (2007). Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci Lett* 411, 98-103.

Mac, L.P. (1949). Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom Med* 11, 338-353.

Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., *et al.* (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510, 542-546.

Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., *et al.* (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506.

Marin, F., and Puelles, L. (1995). Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *The European journal of neuroscience* 7, 1714-1738.

Marshall, J., White, K., Weaver, M., Flury Wetherill, L., Hui, S., Stout, J.C., Johnson, S.A., Beristain, X., Gray, J., Wojcieszek, J., *et al.* (2007). Specific psychiatric manifestations among preclinical Huntington disease mutation carriers. *Arch Neurol* 64, 116-121.

Martinez, S., Andreu, A., Mecklenburg, N., and Echevarria, D. (2013). Cellular and molecular basis of cerebellar development. *Front Neuroanat* 7, 18.

McKeown, C., Read, A.P., Dodge, A., Stecko, O., Mercer, A., and Harris, R. (1987). Wolf-Hirschhorn locus is distal to D4S10 on short arm of chromosome 4. *J Med Genet* 24, 410-412.

Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T., Codogno, P., and Meijer, A.J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 281, 34870-34879.

Meroni, G., and Diez-Roux, G. (2005). TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 27, 1147-1157.

Meyer, G. (2007). Genetic Control of Neuronal Migrations in Human Cortical Development (Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology). New York, NY:Springer.

Micic, D., Cvijovic, G., Trajkovic, V., Duntas, L.H., and Polovina, S. (2011). Metformin: its emerging role in oncology. *Hormones (Athens)* 10, 5-15.

Milner, B. (1972). Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin Neurosurg* 19, 421-446.

Mohr, E., and Richter, D. (2001). Messenger RNA on the move: implications for cell polarity. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 669-679.

Molero, A.E., Arteaga-Bracho, E.E., Chen, C.H., Gulinello, M., Winchester, M.L., Pichamoorthy, N., Gokhan, S., Khodakhah, K., and Mehler, M.F. (2016). Selective expression of mutant huntingtin during development recapitulates characteristic features of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 5736-5741.

Montoya, A., Price, B.H., Menear, M., and Lepage, M. (2006). Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 31, 21-29.

Morea, V., Bidollari, E., Colotti, G., Fiorillo, A., Rosati, J., De Filippis, L., Squitieri, F., and Ilari, A. (2017). Glucose transportation in the brain and its impairment in Huntington disease: one more shade of the energetic metabolism failure? *Amino Acids* 49, 1147-1157.

Moscovitch, M., Rosenbaum, R.S., Gilboa, A., Addis, D.R., Westmacott, R., Grady, C., McAndrews, M.P., Levine, B., Black, S., Winocur, G., *et al.* (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat* 207, 35-66.

Murphy, K.P., Carter, R.J., Lione, L.A., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G.P., Dunnett, S.B., and Morton, A.J. (2000). Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 20, 5115-5123.

Myers, R.H., Leavitt, J., Farrer, L.A., Jagadeesh, J., Mcfarlane, H., Mastromauro, C.A., Mark, R.J., and Gusella, J.F. (1989). Homozygote for Huntington Disease. *Am J Hum Genet* 45, 615-618.

Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. (2004). *Drosophila* cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Dev Cell* 6, 69-78.

Nanahoshi, M., Tsujishita, Y., Tokunaga, C., Inui, S., Sakaguchi, N., Hara, K., and Yonezawa, K. (1999). Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases. *FEBS Lett* 446, 108-112.

Nance, M.A., and Myers, R.H. (2001). Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7, 153-157.

Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., and Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81, 811-823.

Nasir, J., Lin, B., Bucan, M., Koizumi, T., Nadeau, J.H., and Hayden, M.R. (1994). The murine homologues of the Huntington disease gene (*Hdh*) and the alpha-adducin gene (*Add1*) map to mouse chromosome 5 within a region of conserved synteny with human chromosome 4p16.3. *Genomics* 22, 198-201.

Nguyen, H.P., Kobbe, P., Rahne, H., Worpel, T., Jager, B., Stephan, M., Pabst, R., Holzmann, C., Riess, O., Korr, H., *et al.* (2006). Behavioral abnormalities precede neuropathological markers in rats transgenic for Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 15, 3177-3194.

Nixon, R.A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 19, 983-997.

Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., and Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714-720.

Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7, 136-144.

Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., and Kriegstein, A.R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* 508, 28-44.

Nusse, R., and Varmus, H.E. (1992). Wnt genes. *Cell* 69, 1073-1087.

Nyberg, L. (2005). Any novelty in hippocampal formation and memory? *Curr Opin Neurol* 18, 424-428.

Olsson, M., Bjorklund, A., and Campbell, K. (1998). Early specification of striatal projection neurons and interneuronal subtypes in the lateral and medial ganglionic eminence. *Neuroscience* *84*, 867-876.

Opitz J., F.J., Gutenberger J., Pellet J. (1969a). The G-syndrome of multiple congenital anomalies. *Birth Defects: Original Article Series* *1969*;2, 95–101.

Opitz J., S.R., Smith D. (1969b). The BBB syndrome: Familial telecanthus with associated congenital anomalies. *Birth Defects: Original Article Series* *1969*;2, 86–94.

Parent, A., and Cicchetti, F. (1998). The current model of basal ganglia organization under scrutiny. *Mov Disord* *13*, 199-202.

Paulsen, J.S., Magnotta, V.A., Mikos, A.E., Paulson, H.L., Penziner, E., Andreasen, N.C., and Nopoulos, P.C. (2006). Brain structure in preclinical Huntington's disease. *Biol Psychiatry* *59*, 57-63.

Perry, J., Short, K.M., Romer, J.T., Swift, S., Cox, T.C., and Ashworth, A. (1999). FXY2/MID2, a gene related to the X-linked Opitz syndrome gene FXY/MID1, maps to Xq22 and encodes a FNIII domain-containing protein that associates with microtubules. *Genomics* *62*, 385-394.

Petersen, A., and Bjorkqvist, M. (2006). Hypothalamic-endocrine aspects in Huntington's disease. *The European journal of neuroscience* *24*, 961-967.

Pfeffer, P.L., Bouchard, M., and Busslinger, M. (2000). Pax2 and homeodomain proteins cooperatively regulate a 435 bp enhancer of the mouse Pax5 gene at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* *127*, 1017-1028.

Pfirrmann, T., Jandt, E., Ranft, S., Lokapally, A., Neuhaus, H., Perron, M., and Hollemann, T. (2016). Hedgehog-dependent E3-ligase Midline1 regulates ubiquitin-mediated proteasomal degradation of Pax6 during visual system development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 10103-10108.

Podolsky, S., Leopold, N.A., and Sax, D.S. (1972). Increased frequency of diabetes mellitus in patients with Huntington's chorea. *Lancet* *1*, 1356-1358.

Pokrywka, N.J., and Stephenson, E.C. (1995). Microtubules are a general component of mRNA localization systems in *Drosophila* oocytes. *Dev Biol* *167*, 363-370.

Pouladi, M.A., Morton, A.J., and Hayden, M.R. (2013). Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nature reviews Neuroscience* *14*, 708-721.

Pratt, A.J., and MacRae, I.J. (2009). The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *The Journal of biological chemistry* *284*, 17897-17901.

Price, T.J., Rashid, M.H., Millecamps, M., Sanoja, R., Entrena, J.M., and Cervero, F. (2007). Decreased nociceptive sensitization in mice lacking the fragile X mental retardation protein: role of mGluR1/5 and mTOR. *J Neurosci* 27, 13958-13967.

Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., and Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 27, 1083-1091.

Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S., and Rubenstein, J.L. (2000). Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *The Journal of comparative neurology* 424, 409-438.

Putcha, D., Brickhouse, M., O'Keefe, K., Sullivan, C., Rentz, D., Marshall, G., Dickerson, B., and Sperling, R. (2011). Hippocampal hyperactivation associated with cortical thinning in Alzheimer's disease signature regions in non-demented elderly adults. *J Neurosci* 31, 17680-17688.

Qin, Z.H., Wang, Y., Kegel, K.B., Kazantsev, A., Apostol, B.L., Thompson, L.M., Yoder, J., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2003). Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum Mol Genet* 12, 3231-3244.

Quaderi, N.A., Schweiger, S., Gaudenz, K., Franco, B., Rugarli, E.I., Berger, W., Feldman, G.J., Volta, M., Andolfi, G., Gilgenkrantz, S., *et al.* (1997). Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet* 17, 285-291.

Quirk, G.J., and Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33, 56-72.

Rakic, P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *The Journal of comparative neurology* 141, 283-312.

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *The Journal of comparative neurology* 145, 61-83.

Rakic, P. (2002). Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nature reviews Neuroscience* 3, 65-71.

Rebola, N., Srikumar, B.N., and Mulle, C. (2010). Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol* 588, 93-99.

Reddy, P.H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike-Buchanan, L., Whetsell, W.O., Jr., Miller, G., and Tagle, D.A. (1998). Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat Genet* 20, 198-202.

Reiner, A., Albin, R.L., Anderson, K.D., D'Amato, C.J., Penney, J.B., and Young, A.B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5733-5737.

Reiner, A., Dragatsis, I., Zeitlin, S., and Goldowitz, D. (2003). Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival. *Mol Neurobiol* 28, 259-276.

Ribai, P., Nguyen, K., Hahn-Barma, V., Gourfinkel-An, I., Vidailhet, M., Legout, A., Dode, C., Brice, A., and Durr, A. (2007). Psychiatric and cognitive difficulties as indicators of juvenile huntington disease onset in 29 patients. *Arch Neurol* 64, 813-819.

Richfield, E.K., and Herkenham, M. (1994). Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann Neurol* 36, 577-584.

Ridley, R.M., Frith, C.D., Crow, T.J., and Conneally, P.M. (1988). Anticipation in Huntington's disease is inherited through the male line but may originate in the female. *J Med Genet* 25, 589-595.

Riley, J.D., Moore, S., Cramer, S.C., and Lin, J.J. (2011). Caudate atrophy and impaired frontostriatal connections are linked to executive dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 21, 80-87.

Robin, N.H., Feldman, G.J., Aronson, A.L., Mitchell, H.F., Weksberg, R., Leonard, C.O., Burton, B.K., Josephson, K.D., Laxova, R., Aleck, K.A., *et al.* (1995). Opitz syndrome is genetically heterogeneous, with one locus on Xp22, and a second locus on 22q11.2. *Nat Genet* 11, 459-461.

Rodrigues, S.M., Bauer, E.P., Farb, C.R., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. (2002). The group I metabotropic glutamate receptor mGluR5 is required for fear memory formation and long-term potentiation in the lateral amygdala. *J Neurosci* 22, 5219-5229.

Rodrigues, S.M., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. (2001). Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 21, 6889-6896.

Rosas, H.D., Koroshetz, W.J., Chen, Y.I., Skeuse, C., Vangel, M., Cudkowicz, M.E., Caplan, K., Marek, K., Seidman, L.J., Makris, N., *et al.* (2003). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology* 60, 1615-1620.

Ross, C.A., Aylward, E.H., Wild, E.J., Langbehn, D.R., Long, J.D., Warner, J.H., Scahill, R.I., Leavitt, B.R., Stout, J.C., Paulsen, J.S., *et al.* (2014). Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nat Rev Neurol* 10, 204-216.

Rusz, J., Saft, C., Schlegel, U., Hoffman, R., and Skodda, S. (2014). Phonatory dysfunction as a preclinical symptom of Huntington disease. *PloS one* 9, e113412.

Saleh, N., Moutereau, S., Durr, A., Krystkowiak, P., Azulay, J.P., Tranchant, C., Broussolle, E., Morin, F., Bachoud-Levi, A.C., and Maison, P. (2009). Neuroendocrine disturbances in Huntington's disease. *PloS one* 4, e4962.

Sambrook, J., Russell, D.W., and Sambrook, J. (2006). *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., *et al.* (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740-744.

Sapp, E., Ge, P., Aizawa, H., Bird, E., Penney, J., Young, A.B., Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (1995). Evidence for a preferential loss of enkephalin immunoreactivity in the external globus pallidus in low grade Huntington's disease using high resolution image analysis. *Neuroscience* 64, 397-404.

Sathasivam, K., Hobbs, C., Turmaine, M., Mangiarini, L., Mahal, A., Bertaux, F., Wanker, E.E., Doherty, P., Davies, S.W., and Bates, G.P. (1999). Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. *Hum Mol Genet* 8, 813-822.

Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., and Greenberg, M.E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95, 55-66.

Schonberg, T., Daw, N.D., Joel, D., and O'Doherty, J.P. (2007). Reinforcement learning signals in the human striatum distinguish learners from nonlearners during reward-based decision making. *J Neurosci* 27, 12860-12867.

Schweiger, S., Dorn, S., Fuchs, M., Kohler, A., Matthes, F., Muller, E.C., Wanker, E., Schneider, R., and Krauss, S. (2014). The E3 ubiquitin ligase MID1 catalyzes ubiquitination and cleavage of Fu. *The Journal of biological chemistry* 289, 31805-31817.

Schweiger, S., Foerster, J., Lehmann, T., Suckow, V., Muller, Y.A., Walter, G., Davies, T., Porter, H., van Bokhoven, H., Lunt, P.W., *et al.* (1999). The Opitz syndrome gene product, MID1, associates with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2794-2799.

Schweiger, S., and Schneider, R. (2003). The MID1/PP2A complex: a key to the pathogenesis of Opitz BBB/G syndrome. *Bioessays* 25, 356-366.

Seifarth, C., Schehler, B., and Schneider, H.J. (2013). Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 121, 27-31.

Sengupta, S., Peterson, T.R., and Sabatini, D.M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular cell* 40, 310-322.

Seo, M., Lee, E., and Averbeck, B.B. (2012). Action selection and action value in frontal-striatal circuits. *Neuron* 74, 947-960.

Sharma, A., Hoeffler, C.A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S.M., Klann, E., and Zukin, R.S. (2010). Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *J Neurosci* 30, 694-702.

Sharp, A.H., Loev, S.J., Schilling, G., Li, S.H., Li, X.J., Bao, J., Wagster, M.V., Kotzok, J.A., Steiner, J.P., Lo, A., *et al.* (1995). Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 14, 1065-1074.

Shaw, R.J., Bardeesy, N., Manning, B.D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 6, 91-99.

Shi, S.R., Key, M.E., and Kalra, K.L. (1991). Antigen Retrieval in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues - an Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave-Oven Heating of Tissue-Sections. *J Histochem Cytochem* 39, 741-748.

Short, K.M., Hopwood, B., Yi, Z., and Cox, T.C. (2002). MID1 and MID2 homo- and heterodimerise to tether the rapamycin-sensitive PP2A regulatory subunit, alpha 4, to microtubules: implications for the clinical variability of X-linked Opitz GBBB syndrome and other developmental disorders. *BMC cell biology* 3, 1.

Sidhu, H., Dansie, L.E., Hickmott, P.W., Ethell, D.W., and Ethell, I.M. (2014). Genetic removal of matrix metalloproteinase 9 rescues the symptoms of fragile X syndrome in a mouse model. *J Neurosci* **34**, 9867-9879.

Simmons, D.A., Rex, C.S., Palmer, L., Pandyarajan, V., Fedulov, V., Gall, C.M., and Lynch, G. (2009). Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4906-4911.

Soares, H.P., Ni, Y., Kisfalvi, K., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (2013). Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells. *PloS one* **8**, e57289.

Soliman, G.A., Steenson, S.M., and Eteko, A.H. (2016). Effects of Metformin and a Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ATP-Competitive Inhibitor on Targeted Metabolomics in Pancreatic Cancer Cell Line. *Metabolomics (Los Angel)* **6**.

Sorrells, S.F., Paredes, M.F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., *et al.* (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* **555**, 377-381.

Stack, E.C., Kubitius, J.K., Smith, K., Cormier, K., Del Signore, S.J., Guelin, E., Ryu, H., Hersch, S.M., and Ferrante, R.J. (2005). Chronology of behavioral symptoms and neuropathological sequela in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *The Journal of comparative neurology* **490**, 354-370.

Stanek, L.M., Sardi, S.P., Mastis, B., Richards, A.R., Treleaven, C.M., Taksir, T., Misra, K., Cheng, S.H., and Shihabuddin, L.S. (2014). Silencing mutant huntingtin by adeno-associated virus-mediated RNA interference ameliorates disease manifestations in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* **25**, 461-474.

Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E., and Thompson, L.M. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6763-6768.

Stewart, R., and Liolitsa, D. (1999). Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **16**, 93-112.

Stout, J.C., Paulsen, J.S., Queller, S., Solomon, A.C., Whitlock, K.B., Campbell, J.C., Carlozzi, N., Duff, K., Beglinger, L.J., Langbehn, D.R., *et al.* (2011). Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology* **25**, 1-14.

Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G., and Gerich, J.E. (1995). Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 333, 550-554.

Sturrock, A., and Leavitt, B.R. (2010). The clinical and genetic features of Huntington disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 23, 243-259.

Sturrock, R.R. (1980). A comparative quantitative and morphological study of ageing in the mouse neostriatum, indusium griseum and anterior commissure. *Neuropathol Appl Neurobiol* 6, 51-68.

Suhr, S.T., Senut, M.C., Whitelegge, J.P., Faull, K.F., Cuizon, D.B., and Gage, F.H. (2001). Identities of sequestered proteins in aggregates from cells with induced polyglutamine expression. *J Cell Biol* 153, 283-294.

Sun, X., Fu, Y., Pan, Y., and Lu, B. (2017). Conformation-dependent recognition of mutant HTT (huntingtin) proteins by selective autophagy. *Autophagy* 13, 2111-2112.

Suzuki, M., Hara, Y., Takagi, C., Yamamoto, T.S., and Ueno, N. (2010). MID1 and MID2 are required for *Xenopus* neural tube closure through the regulation of microtubule organization. *Development* 137, 2329-2339.

Tabrizi, S.J., Langbehn, D.R., Leavitt, B.R., Roos, R.A., Durr, A., Craufurd, D., Kennard, C., Hicks, S.L., Fox, N.C., Scahill, R.I., *et al.* (2009). Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *The Lancet Neurology* 8, 791-801.

Takahashi, K., Nakajima, E., and Suzuki, K. (2006). Involvement of protein phosphatase 2A in the maintenance of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion through recruitment of IQGAP1. *J Cell Physiol* 206, 814-820.

Takarae, Y., Minshew, N.J., Luna, B., and Sweeney, J.A. (2007). Atypical involvement of frontostriatal systems during sensorimotor control in autism. *Psychiatry Res* 156, 117-127.

Tallaksen-Greene, S.J., Crouse, A.B., Hunter, J.M., Detloff, P.J., and Albin, R.L. (2005). Neuronal intranuclear inclusions and neuropil aggregates in HdhCAG(150) knockin mice. *Neuroscience* 131, 843-852.

Teede, H., Deeks, A., and Moran, L. (2010). Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC medicine* 8, 41.

Tekin, S., and Cummings, J.L. (2002). Frontal-subcortical neuronal circuits and clinical neuropsychiatry: an update. *J Psychosom Res* 53, 647-654.

Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15, 740-746.

Tranebjaerg, L., Petersen, A., Hove, K., Rehder, H., and Mikkelsen, M. (1984). Clinical and cytogenetic studies in a large (4;8) translocation family with pre- and postnatal Wolf syndrome. *Ann Genet* 27, 224-229.

Trockenbacher, A., Suckow, V., Foerster, J., Winter, J., Krauss, S., Ropers, H.H., Schneider, R., and Schweiger, S. (2001). MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet* 29, 287-294.

Tucker, G.T., Casey, C., Phillips, P.J., Connor, H., Ward, J.D., and Woods, H.F. (1981). Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *British journal of clinical pharmacology* 12, 235-246.

Usdin, M.T., Shelbourne, P.F., Myers, R.M., and Madison, D.V. (1999). Impaired synaptic plasticity in mice carrying the Huntington's disease mutation. *Hum Mol Genet* 8, 839-846.

Vago, D.R., and Kesner, R.P. (2008). Disruption of the direct perforant path input to the CA1 subregion of the dorsal hippocampus interferes with spatial working memory and novelty detection. *Behav Brain Res* 189, 273-283.

Van Hoesen, G.W., Yeterian, E.H., and Lavizzo-Mourey, R. (1981). Widespread corticostriate projections from temporal cortex of the rhesus monkey. *The Journal of comparative neurology* 199, 205-219.

Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., and Menendez, J.A. (2009). The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. *Cell cycle* 8, 88-96.

Walker, F.O. (2007). Huntington's disease. *Lancet* 369, 218-228.

Wall, N.R., De La Parra, M., Callaway, E.M., and Kreitzer, A.C. (2013). Differential innervation of direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron* 79, 347-360.

Webster, P.J., Liang, L., Berg, C.A., Lasko, P., and Macdonald, P.M. (1997). Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes & development* 11, 2510-2521.

Wexler, N.S., Young, A.B., Tanzi, R.E., Travers, H., Starosta-Rubinstein, S., Penney, J.B., Snodgrass, S.R., Shoulson, I., Gomez, F., Ramos Arroyo, M.A., *et al.* (1987). Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 326, 194-197.

- Wieczorek, D., Krause, M., Majewski, F., Albrecht, B., Horn, D., Riess, O., and Gillissen-Kaesbach, G. (2000). Effect of the size of the deletion and clinical manifestation in Wolf-Hirschhorn syndrome: analysis of 13 patients with a de novo deletion. *Eur J Hum Genet* 8, 519-526.
- Wilson, H., De Micco, R., Niccolini, F., and Politis, M. (2017). Molecular Imaging Markers to Track Huntington's Disease Pathology. *Frontiers in neurology* 8, 11.
- Wilson, H., Niccolini, F., Haider, S., Marques, T.R., Pagano, G., Coello, C., Natesan, S., Kapur, S., Rabiner, E.A., Gunn, R.N., *et al.* (2016). Loss of extra-striatal phosphodiesterase 10A expression in early premanifest Huntington's disease gene carriers. *Journal of the neurological sciences* 368, 243-248.
- Winter, J., Kunath, M., Roepcke, S., Krause, S., Schneider, R., and Schweiger, S. (2007). Alternative polyadenylation signals and promoters act in concert to control tissue-specific expression of the Opitz Syndrome gene MID1. *BMC molecular biology* 8, 105.
- Winter, J., Lehmann, T., Krauss, S., Trockenbacher, A., Kijas, Z., Foerster, J., Suckow, V., Yaspo, M.L., Kulozik, A., Kalscheuer, V., *et al.* (2004). Regulation of the MID1 protein function is fine-tuned by a complex pattern of alternative splicing. *Human genetics* 114, 541-552.
- Witter, M.P., Naber, P.A., van Haefen, T., Machielsen, W.C., Rombouts, S.A., Barkhof, F., Scheltens, P., and Lopes da Silva, F.H. (2000). Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus* 10, 398-410.
- Wolf, R.C., Sambataro, F., Vasic, N., Wolf, N.D., Thomann, P.A., Saft, C., Landwehrmeyer, G.B., and Orth, M. (2012). Default-mode network changes in preclinical Huntington's disease. *Experimental neurology* 237, 191-198.
- Wolf, U., Reinwein, H., Porsch, R., Schroter, R., and Baitsch, H. (1965). [Deficiency on the short arms of a chromosome No. 4]. *Humangenetik* 1, 397-413.
- Wood, N.I., and Morton, A.J. (2015). Social Behaviour is Impaired in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* 4, 61-73.
- Wright, T.J., Ricke, D.O., Denison, K., Abmayr, S., Cotter, P.D., Hirschhorn, K., Keinanen, M., McDonald-McGinn, D., Somer, M., Spinner, N., *et al.* (1997). A transcript map of the newly defined 165 kb Wolf-Hirschhorn syndrome critical region. *Hum Mol Genet* 6, 317-324.
- Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X.L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M., and Baer, R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet* 14, 430-440.

- Wu, M.S., Johnston, P., Sheu, W.H., Hollenbeck, C.B., Jeng, C.Y., Goldfine, I.D., Chen, Y.D., and Reaven, G.M. (1990). Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. *Diabetes Care* 13, 1-8.
- Wurst, W., and Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nature reviews Neuroscience* 2, 99-108.
- Xie, F., Bao, X., Yu, J., Chen, W., Wang, L., Zhang, Z., and Xu, Q. (2015). Disruption and inactivation of the PP2A complex promotes the proliferation and angiogenesis of hemangioma endothelial cells through activating AKT and ERK. *Oncotarget* 6, 25660-25676.
- Xu, J., Liu, Z., and Ornitz, D.M. (2000). Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development* 127, 1833-1843.
- Yamamoto, A., Lucas, J.J., and Hen, R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101, 57-66.
- Yang, D., Okamura, H., Morimoto, H., Teramachi, J., and Haneji, T. (2016). Protein phosphatase 2A Calpha regulates proliferation, migration, and metastasis of osteosarcoma cells. *Lab Invest* 96, 1050-1062.
- Yu, Z.X., Li, S.H., Evans, J., Pillarisetti, A., Li, H., and Li, X.J. (2003). Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *J Neurosci* 23, 2193-2202.
- Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., and Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 11, 155-163.
- Zhuang, S., Jian, Y., and Sun, Y. (2017). Metformin Inhibits N-Methyl-N-Nitrosourea Induced Gastric Tumorigenesis in db/db Mice. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 125, 392-399.
- Zilliox, L.A., Chadrasekaran, K., Kwan, J.Y., and Russell, J.W. (2016). Diabetes and Cognitive Impairment. *Current diabetes reports* 16, 87.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R., *et al.* (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293, 493-498.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Neocortex während der Embryonalentwicklung	15
Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung der striatofrontalen Schleife	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung des <i>MID1</i> -Gens und MID1-Proteins	25
Abbildung 4: Modell der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von MID1 und deren Wirkung auf PP2A.....	26
Abbildung 5: Schematische Darstellung des ÜE-Inserts.....	51
Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung eines for- und rev-Oligonukleotids nach Annealing.....	54
Abbildung 7: Anzeigoptionen für den Touchscreen	70
Abbildung 8: Setup für den VD, links der Touchscreen, rechts der Futterspender.	71
Abbildung 9: Schematische Darstellung und zeitlicher Ablauf der sequentiellen Exposition	72
Abbildung 10: Schematische Darstellung der 3-Teile Kammer.	73
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Elevated Plus Maze	74
Abbildung 12: Schematische Darstellung des OF	75
Abbildung 13: Beispielhafte Auswahl der eingesetzten Objekte.	77
Abbildung 14: Schematische Darstellung und zeitlicher Ablauf des NORT.....	77
Abbildung 15: Ergebnisse des Proliferationsassays von Fibroblasten.....	80
Abbildung 16: Morphologische Unterschiede der 17/98- und 18/98-Fibroblastenzelllinien	81
Abbildung 17: Ergebnisse des Migrationsassays von Kontroll- (18/98) und Patientenfibroblasten....	81
Abbildung 18: Ergebnisse des Proliferationsassays von Kontrolle und <i>MID1</i> -KD in HeLa-Zellen.....	83

Abbildung 19: Ergebnisse des Migrationsassays von Kontrolle und <i>MID1</i> -KD.....	84
Abbildung 20: Ergebnisse des Proliferationsassays von Kontrolle und <i>MID1</i> -ÜE.....	86
Abbildung 21: Ergebnisse des Migrationsassays von Kontrolle und <i>MID1</i> -ÜE.....	87
Abbildung 22: Ergebnisse der <i>in utero</i> Elektroporation (IUE) von Kontrolle und <i>MID1</i> -KD	89
Abbildung 23: Darstellung der Gewichtsabnahme aller Mäuse nach 24h Futterentzug	91
Abbildung 24: Habituationstraining für den VD	92
Abbildung 25: Touchtraining für den VD.....	93
Abbildung 26: Ergebnisse des VD (Kombination 1)	94
Abbildung 27: Ergebnisse des VD (Kombination 2)	95
Abbildung 28: Gewichtsverlauf über die gesamte Dauer des VD	96
Abbildung 29: Schematische Darstellung beider SI-Tests	97
Abbildung 30: Ergebnisse der beiden SI-Tests	98
Abbildung 31: Ergebnisse des EPM.....	99
Abbildung 32: Ergebnisse des OF.....	100
Abbildung 33: Ergebnisse des NORT.....	101
Abbildung 34: Quantifizierung der Phosphorylierung des mTOR-Targets S6.....	102
Abbildung 35: Ergebnisse der Westernblotanalyse von cortikalem Gewebe nach Injektion	104
Abbildung 36: Trinkverhalten von Mäusen mit und ohne 5 mg/ml Metformin	106
Abbildung 37: Ergebnisse der Westernblotanalyse von Whole-Brain-Lysaten	107
Abbildung 38: Ergebnisse der Westernblotanalyse von Hippocampus-Lysaten.....	108
Abbildung 39: Ergebnisse der Westernblotanalyse von Striatum-Lysaten	109

Abbildung 40: Ergebnisse der Westernblotanalyse von Lysaten des präfrontalen Cortex	110
Abbildung 41: Ergebnisse der IHC von Schnitten des präfrontalen Cortex	111
Abbildung 42: Ergebnisse des OF nach dreiwöchiger Metforminbehandlung	112
Abbildung 43: Ergebnisse des NORT nach dreiwöchiger Metforminbehandlung	113
Abbildung 44: Das VFDO-Stadium von HD.....	120

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und ihre Hersteller	43
Tabelle 2: Chemikalien/Reagenzien und ihre Hersteller	43
Tabelle 3: Puffer und Lösungen und ihre Zusammensetzung	45
Tabelle 4: Gele und ihre Zusammensetzung	45
Tabelle 5: Kits und ihre Hersteller	46
Tabelle 6: Primersequenzen	46
Tabelle 7: Plasmide und ihre Hersteller/Herkunft	47
Tabelle 8: Bakterien und ihre Hersteller	47
Tabelle 9: Enzyme und ihre Hersteller	47
Tabelle 10: Antikörper und ihre Hersteller	48
Tabelle 11: Marker und ihre Hersteller	48
Tabelle 12: Medien und ihre Hersteller/Zusammensetzung	49
Tabelle 13: Zelllinien und ihre Herkunft	49
Tabelle 14: siRNAs und ihre Hersteller	49
Tabelle 15: shRNAs und ihre Sequenzen	50
Tabelle 16: EDV-Programme und ihre Entwickler	50
Tabelle 17: Restriktionsansatz für den Verdau	52
Tabelle 18: Ligationsansatz für das ÜE-Konstrukt	52
Tabelle 19: Ligationsansatz für das KD-Konstrukt	55

Tabelle 20: Mastermix für Genotypisierungs-PCR 60

Tabelle 21: Thermocyclerprogramm „HTT“ für die Genotypisierungs-PCR 60

6.3 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1
A	Adenin
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BMP	Bone morphogenic protein
C	Cytosin
C-terminal	Carboxyterminal
CA	Cornu Ammonis (Ammonshorn)
CP	Cortikalplatte
CTG	Cell Titer Glow
cAMP / AMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat / Adenosinmonophosphat
cGMP / GMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat / Guanosinmonophosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy nukleosidtriphosphat
EPM	Elevated Plus Maze
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
EtOH	Ethanol
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
Fgf8	Fibroblast growth factor 8
Fgf17	Fibroblast growth factor 17
FNIII	Fibronektin-Typ-III-Domäne
Fu	Fused
FXS	fragiles-X-Syndrom
G	Guanin
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
GPL	Globus pallidus lateralis
GPM	Globus pallidus medialis
h	Stunde
HD	Huntington's Disease (Huntington Erkrankung)
Hdh	Huntington's disease gene homolog
HTT	Huntingtin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IZ	Intermediäre Zone
Kb	Kilobase
KD	Knockdown
KO	Knockout
l	Liter
LGE	lateral ganglionic eminences
M	Molarität einer Lösung [mol/l]
MGE	medial ganglionic eminences
min	Minuten
MID1	Midline-1
MID2	Midline-2
ml	Milliliter
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
MRT	Magnetresonanztomographie
MSN	Medium Spiny Neuron

µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)
mRNA	messenger Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
mTOR	mechanistic target of rapamycin
mTORC1	mTOR Complex 1
MZ	Marginalzone
N-Terminal	Aminoterminal
NII	neuronal intranukleäre Inklusionen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NORT	Novel Object recognition Task
OF	Open Field
OS	Opitz BBB/G Syndrom
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
p	phosphoryliert
pH	potentia Hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PBS	phosphate buffered saline
PDE10A	Phosphodiesterase 10A
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
raptor	regulatory-associated protein of mTOR
RGC	Radial Glia Cell
RING	really interesting new gene
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S6	Ribosomal protein S6
S6K	Ribosomal S6 Kinase
SDS	sodium dodecyl sulfate
Sek	Sekunden
Shh	Sonic hedgehog
shRNA	Short hairpin RNA
SI	Social Interaction
siRNA	small interfering RNA
SVZ	Subventrikuläre Zone
SZ	Subplate-Zone
T	Thymin
Temed	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TT	Touch Training
ÜE	Überexpression
UTR	untranslated region
VZ	Ventrikuläre Zone
WHS	Wolf-Hirschhorn-Syndrom
WT / wt	Wildtyp / wildtypisch

6.4 Publikationen und Kongressteilnahmen

Willam M., Radyushkin K., Winter J., Krauß S., Langston R., Schacht T., Methner A., Schweiger S. „Metformin as a potential candidate in HD therapy“. 26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik. Graz, 15. – 17.04.2015 (Poster).

Willam M., Radyushkin K., Winter J., Krauß S., Langston R., Monteiro O., Chen C., Schacht T., Methner A., Schweiger S. „Old friends on new paths: metformin as an early phase treatment in Huntington’s Disease?“. 27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik. Lübeck, 16. – 18.03.2016 (Poster).

Willam M., Radyushkin K., Winter J., Krauß S., Langston R., Monteiro O., Chen C., Schacht T., Methner A., Schweiger S. „Metformin rescues early cognitive symptoms in the HdhCAG150 mouse model and is therefore a promising candidate for treatment of HD patients“. 28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik. Bochum, 29. – 31.03.2017 (Poster). Gewinner des Posterpreises 2017.

Willam M., Radyushkin K., Winter J., Krauß S., Langston R., Monteiro O., Chen C., Schacht T., Methner A., Schweiger S. „Metformin rescues early cognitive symptoms in the HdhCAG150 mouse model and is therefore a promising candidate for treatment of HD patients“. 50. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik. Kopenhagen, 27. – 30.05.2017 (Poster).

Willam M., Krummeich J., Arnoux A., Griesche N., Watari H., Offermann N., Weber S., Narayan Dey P., Chen C., Monteiro O., Buettner S., Meyer K., Bano D, Radyushkin K., Langston R., Lambert J.J., Wanker E., Methner A., Stroh A., Schweiger S., Krauss S. „Metformin reduces protein load and improves disease phenotype in early Huntington’s Disease“. Society for Neuroscience. Washington DC, 11.-15.11.2017 (Vortrag).

Willam M., Schmied A., Schüle M., Käseberg S., Winter J., Strand S., Strand D., Schweiger S. „MID1 overexpression increases migration velocity“. 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik. Münster, 14. – 16.03.2018 (Poster).

Zur Publikation eingereicht:

Willam M., Arnoux A., Griesche N., Krummeich J., Watari H., Offermann N., Weber S., Narayan Dey P., Chen C., Monteiro O., Buettner S., Meyer K., Bano D, Radyushkin K., Langston R., Lambert J.J., Wanker E., Methner A., Stroh A., Schweiger S., Krauss S. „Metformin reverses early cortical network dysfunction and behavior changes in Huntington’s Disease.

6.5 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Michael Willam (geboren am 01.08.1984 in Rüsselsheim), die hier vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Zudem versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch an keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat.

Mir ist der Inhalt der Promotionsordnung bekannt.