

**Untersuchungen zur Wirkung des *Ginkgo biloba*-Extraktes EGb 761
auf die Proteinaggregation in der Huntington-Krankheit**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Mainz, 2014

von

Marcel-Michael Stark
geb. am 06.09.1977 in Saarbrücken

Dekan:

1.Berichterstatter:

2.Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	10
1.1 Ginkgo biloba.....	10
1.1.1 Ginkgo als Heilpflanze.....	10
1.1.2 Ginkgo biloba-Extrakte.....	11
1.1.2.1 Zusammensetzung der Ginkgo biloba-Extrakte.....	12
1.1.2.2 Terpenlaktone.....	13
1.1.2.3 Flavonoide und Flavonglykoside	14
1.1.2.4 Weitere Inhaltsstoffe der Ginkgo biloba-Extrakte.....	15
1.1.3 Pharmakologische Wirkungen der Ginkgo biloba-Extrakte.....	15
1.1.4 Medizinische Verwendung der Ginkgo biloba-Extrakte.....	18
1.2 Proteindegradationsmechanismen.....	20
1.2.1 Allgemeine Proteindegradation.....	20
1.2.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	20
1.2.2.1 Ubiquitin.....	20
1.2.2.2 Der 26S-Proteasomkomplex.....	21
1.2.2.3 Der 19S-Komplex.....	22
1.2.2.4 Der 20S-Komplex.....	23
1.2.2.5 Proteindegradation durch das UPS.....	24
1.2.2.6 Erkennungsmotive proteasomaler Substratproteine.....	26
1.2.3 Autophagie.....	27
1.2.3.1 Degradationsprozess durch Makroautophagie.....	28
1.3 Die neurodegenerative Huntington-Krankheit.....	30
1.3.1 Gemeinsamkeiten zwischen neurodegenerativen Erkrankungen.....	30
1.3.2 Die Huntington-Krankheit (Chorea Huntington).....	31
1.3.2.1 Das huntingtin-Gen und Huntingtin-Protein.....	31
1.3.2.2 Zelluläre Dysfunktionen in der HD.....	32
1.3.2.3 Degradation von Huntingtin-Proteinen.....	33
1.3.2.4 Bildung von Huntingtin-Proteinoligomeren und Proteinaggregation.....	35
1.3.2.5 Therapieansätze in der HD.....	36
1.4 Ziel der Arbeit.....	38

2 Material und Methode.....	40
2.1 Materialien.....	40
2.1.1 Zell- und Tiermodelle.....	40
2.1.2 Geräte.....	40
2.1.3 Verwendete Chemikalien	42
2.1.4 Materialien, Lösungen und Puffer.....	42
2.1.4.1 Lösungen und Puffer der Proteinbiochemie.....	42
2.1.4.2 Lösungen und Puffer der Molekularbiologie.....	44
2.1.4.3 Lösungen und Puffer der Zellkultur.....	44
2.1.4.4 Lösungen und Puffer der Nematodenzucht.....	45
2.1.4.5 Verwendete Antikörper.....	46
2.2 Methoden.....	47
2.2.1 Zellkulturmethoden.....	47
2.2.1.1 Kultivierung klonaler Zelllinien (HEK293, d2GFP-HEK).....	47
2.2.1.2 Kultivierung von humanen Fibroblasten (IMR-90).....	47
2.2.1.3 Bestimmung der Lebenszellzahl.....	47
2.2.1.4 Bestimmung von Populationsverdopplungen (PD).....	48
2.2.1.5 Kryokonservierung von Zellen	48
2.2.1.6 Transiente Transfektionen.....	48
2.2.2 Proteinbiochemie.....	49
2.2.2.1 Herstellung von Proteinpräparaten	49
2.2.2.2 Quantifizierung des Proteingehaltes.....	49
2.2.2.3 Immunoblotting.....	50
2.2.2.3.1 Gelelektrophorese.....	50
2.2.2.3.2 Proteintransfer (Western-Blotting).....	50
2.2.2.3.3 Immundetektion der Proteine	50
2.2.2.3.4 Filterretardierungs-Test (Filter Retardation Assay).....	51
2.2.3 Mikroskopische Analyse der Zelllinien.....	52
2.2.4 Sulforhodamin B-Test (SRB-Test; SRB-Assay).....	52
2.2.5 Messung der d2GFP-Degradation (d2GFP-Degradationstest).....	53
2.2.6 Messungen der enzymatischen Proteasom-Aktivität (SUC-AMC-Test).....	54
2.2.7 Molekularbiologische Methoden.....	55
2.2.7.1 Enzyme und Kits für molekularbiologische Arbeiten.....	55
2.2.7.2 Herstellung der verwendeten Plasmide	55
2.2.7.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	56

2.2.7.4 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegel-Elektrophorese	57
2.2.7.5 Aufreinigung spezifischer PCR-Produkte.....	57
2.2.7.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	57
2.2.7.7 Restriktion des Zielvektors peGFP-N1.....	58
2.2.7.8 Rekombination mittels In-Fusion Reaktion.....	58
2.2.7.9 Klonierung der hergestellten Vektoren (htt_QX).....	59
2.2.7.9.1 Transformation kompetenter Bakterien.....	59
2.2.7.9.2 Aufreinigung der klonierten Plasmide.....	60
2.2.7.10 Quantitative-Real-Time-Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR).....	60
2.2.7.10.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen.....	61
2.2.7.10.2 Reverse Transkription (RT-PCR) der isolierten Gesamt-RNA	61
2.2.7.10.3 Quantitative-Real-Time-PCR (qPCR) der cDNA-Proben.....	61
2.2.8 Caenorhabditis elegans (C. elegans)-Methoden	63
2.2.8.1 Die verwendeten transgenen C. elegans-Stämme.....	63
2.2.8.2 Kultivierung von C. elegans	63
2.2.8.3 Herstellung von NGM-Platten mit bakteriellen Kulturen	64
2.2.8.4 Synchronisierung von C. elegans	64
2.2.8.5 Mikroskopische Analyse von C. elegans.....	64
2.2.8.5 Mikroskopische Analyse von C. elegans.....	64
2.2.8.6 Untersuchungen zur Beweglichkeit von C. elegans.....	65
2.2.8.7 Proteinpräparation und Immunoblotting von C. elegans	65
3. Ergebnisse.....	66
3.1 Untersuchungen zur Wirkung von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität. .66	
3.1.1. Charakterisierung der Proteasom-Aktivität anhand der Hydrolyse von SUC-AMC.....	66
3.1.2 Modulation der Proteasom-Aktivität durch EGb 761.....	68
3.1.3 Modulation des proteasomalen Proteinabbaus durch EGb 761.....	69
3.1.4 Erweiterte Analyse der EGb 761-Wirkung auf den proteasomalen Proteinabbau.....	71
3.1.5 EGb 761 erhöht die Transkription proteasomaler Gene.....	72
3.1.6 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung auf die Proteasom-Aktivität.....	73
3.2 Untersuchung der Wirkung von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD.....	74
3.2.1 EGb 761 erhöht die enzymatischen Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD...74	
3.2.2 Modulation der Proteindegradation durch EGb 761 in zellulären Modellen der HD	75
3.2.3 EGb 761 erhöht die Transkription proteasomaler Gene in zellulären Modellen der HD.....	77
3.2.4 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung auf die Proteasom-Aktivität in HD-Modellen...79	

3.3 Untersuchungen zur Wirkung von EGb 761 auf polyQ-Proteine.....	80
3.3.1 EGb 761 reduziert die Anzahl von polyQ-Proteinaggregaten.....	80
3.3.2 EGb 761 vermindert den Gehalt von aggregierten polyQ-Proteinen.....	82
3.3.3 EGb 761 reduziert den Gehalt an polyQ-Aggregaten ohne zytotoxische Wirkung.....	85
3.3.4 EGb 761 vermindert die Aggregation von polyQ-Proteinen mit Beginn der Behandlung...88	
3.3.5 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine und polyQ-Aggregate.....	90
3.4 Untersuchung der EGb 761-Wirkung auf den Abbau von polyQ-Proteinen	
.....	91
3.4.1 EGb 761 induziert den proteasomalen Abbau von kurzlebigen Proteinen, aber nicht von löslichen polyQ-Proteinen.....	91
3.4.2 EGb 761 induziert den proteasomalen Abbau von fehlgefalteten polyQ-Proteinen.....	95
3.4.3 EGb 761 erhöht die Effizienz der proteasomalen Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen	98
3.4.4 EGb 761 hat keine Wirkung auf den autophagosomalen Abbau von polyQ-Aggregaten. .100	
3.4.5 Zusammenfassung der EGb 761 -Wirkung auf den Abbau von polyQ-Proteinen.....	103
3.5 Untersuchungen zur Wirkung von EGb 761 auf polyQ-Proteine in pri-	
mären humanen Fibroblasten.....	104
3.5.1 EGb 761 reduziert die Anzahl von polyQ-Proteinaggregaten in jungen Fibroblasten.....	105
3.5.2 EGb 761 vermindert den Gehalt von aggregierten polyQ-Proteinen in jungen Fibroblasten	107
3.5.3 EGb 761 reduziert die Anzahl und den Gehalt von polyQ-Aggregaten in seneszenten Fibroblasten.....	112
3.5.4 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine in humanen Fibroblasten. 114	
3.6 Untersuchungen zur Wirkung von EGb 761 auf transgene C. elegans als in vivo-Model der HD.....	115
3.6.1 EGb 761 reduziert den Gehalt an aggregierten polyQ-Proteinen in transgenen C. elegans	116
3.6.2 EGb 761 vermindert die Aggregation von polyQ-Proteinen in transgenen C. elegans.....	118
3.6.3 EGb 761 verbessert pathologisch verminderte Bewegungen von transgenen C. elegans. .120	
3.6.4 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung auf in vivo-Modelle der HD.....	122
4 Diskussion.....	124
4.1 Modulation der Proteasom-Aktivität durch EGb 761.....	125
4.1.1 Behandlungen mit EGb 761 steigern die Proteasom-Aktivität in nativen Zellen.....	125

4.1.2 EGb 761 erhöht die pathologisch verminderte Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD.....	128
4.1.3 Zusammenfassung der Wirkung von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität.....	130
4.2 EGb 761 reduziert polyQ-Aggregate durch eine verbesserte Degradation	
.....	132
4.2.1 Behandlungen mit EGb 761 reduzieren die Menge an polyQ-Proteinaggregaten.....	132
4.2.2 EGb 761 bewirkt einen effizienteren Abbau fehlgefalteter polyQ-Proteine und reduziert hierdurch polyQ-Aggregate.....	135
4.2.3 Zusammenfassung der Wirkung von EGb 761 auf die Aggregation von polyQ-Proteinen.....	140
4.3 EGb 761 reduziert polyQ-Aggregate in erweiterten Modellen der HD in vitro und in vivo	142
4.3.1 EGb 761 vermindert den Gehalt an polyQ-Aggregaten in primären humanen Zellen.....	142
4.3.2 EGb 761 reduziert polyQ-Aggregate und verbessert pathologische Phänotypen in transgenen <i>C. elegans</i>	144
4.3.3 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung in erweiterten Modellen der HD in vitro und in vivo.....	146
4.4 Relevanz der Ergebnisse und Ausblick.....	149
5 Zusammenfassung.....	151
5 Summary.....	153
6 Literaturverzeichnis.....	155
7 Anhang.....	177
7.1 Abkürzungen.....	177
7.2 Vektorkarten und Sequenzen.....	182
7.3 Publikationen.....	189
7.4 Curriculum Vitae.....	190
7.5 Eidesstattliche Erklärung.....	191
7.6 Danksagung.....	192
Anmerkung zur statistische Auswertung	193

1 Einleitung

1.1 *Ginkgo biloba*

1.1.1 *Ginkgo* als Heilpflanze

Der Ginkgobaum ist ursprünglich in China beheimatet, wodurch sich auch der Name herleitet, *sankyo* oder *yin-kuo*, was soviel bedeutet wie Hügelaprikose oder Silberfrucht (McKenna et al., 2001). Der *Ginkgo biloba* L. gehört zur botanischen Familie der *Ginkgoaceae* und wurde von Engelbert Kaempfer im Jahre 1712 zum ersten Mal nach westlichem Muster beschrieben (Kaempfer and Muntschick, 1712) und gilt als „lebendes Fossil“ (Abb. 1.1), da er seit 150 Millionen Jahren in fast unveränderter Weise existiert (Gertz and Kiefer, 2004). Hierbei zeichnet sich die adulte Form des Ginkgo Baumes durch eine hohe Resistenz gegen Bakterien, Pilze und Viren aus und ist auch gegenüber Insektenbefall wenig anfällig (Major and Thomas, 1972).

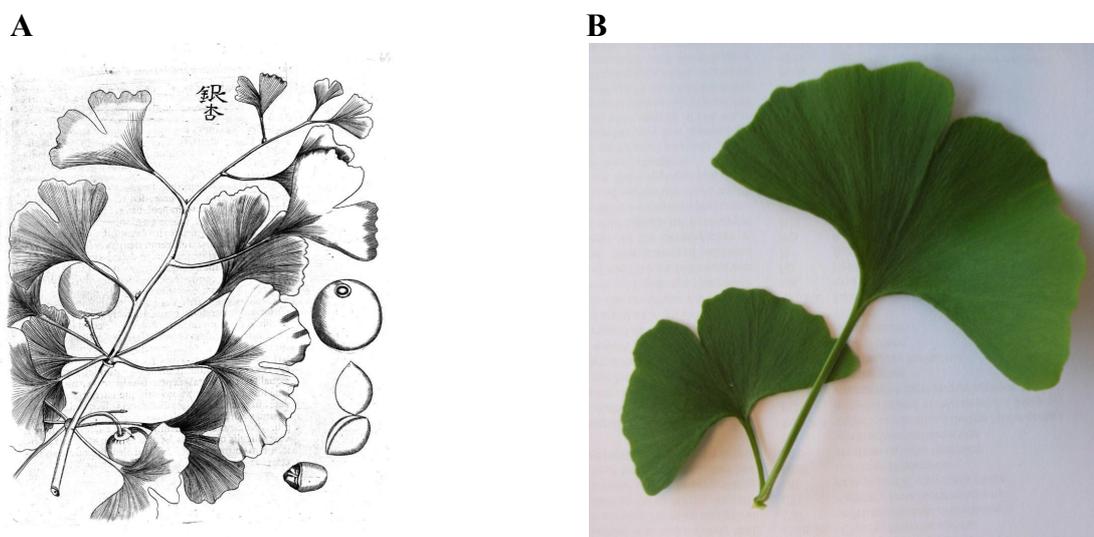


Abbildung 1.1: Blätter und Samen des *Ginkgo biloba*. (A) Zeichnungen der Blätter und Samen von Engelbert Kaempfer aus „Flora Japonica“ (1712). Das Bild wurde lizenzfrei von Wikipedia bezogen. (B) Die zweigeteilten Blätter im Detail aus dem Botanischen Garten der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Bilder wurden vom Autor der Arbeit selbst erstellt.

Auf Grund dieser Eigenschaften und der Form seiner Blätter, welche zweigeteilt sind, werden die Blätter und Nüsse des Ginkgos in der traditionellen chinesischen Medizin angewendet (Abb. 1.1).

So werden die Nüsse vornehmlich zur Behandlung von Atemwegserkrankungen (Asthma und Husten), Alkoholmissbrauch und Blasenentzündung angewendet (Mahadevan and Park, 2008). Die Blätter hingegen werden vor allem bei Herzerkrankungen, Lungenerkrankungen und Hautinfektionen eingesetzt (Mahadevan and Park, 2008).

1.1.2 *Ginkgo biloba*-Extrakte

In der konventionellen Phytotherapie gehören Phytopharmaka aus Blattextrakten des *Ginkgo biloba* zu den am besten untersuchten Substanzgemischen (van Beek and Montoro, 2009). Dieses Phytopharmakon besteht aus einem komplexen Gemisch verschiedener Pflanzeninhaltsstoffen, wobei die Inhaltsstoffe Terpenlaktone und Flavonglykoside als pharmazeutisch wirksamsten gelten. Weitere Inhaltsstoffe des Extraktes sind Benzenoide, Ginkgolsäuren, Steroide, Sesquiterpene, Carotinoide, Polyphenole, Alkylphenole, Fett- und Aminosäuren, sowie Kohlenhydrate. Ebenfalls findet man nicht-glykosidische Biflavone, Proanthocyanidine, Catechine und anorganische Salze (Tabelle 1) (van Beek and Montoro, 2009).

Tabelle 1: Verschiedene Inhaltsstoffe des standardisiertem *Ginkgo biloba*-Extrakt 761 (EGb 761) mit prozentualer Angabe. Nach van Beek und Montoro (2009).

Substanzklasse	%
Flavonglykoside	24,0
Terpenlaktone	6,0
Proanthocyanidine	7,0
Carbonsäuren	13,0
Catechine	2,0
Verschiedene Glykoside	20,0
Hochmolekulare Substanzen	4,0
Anorganische Substanzen	5,0
Wasser, gelöst	3,0
Weitere Substanzen	3,0
Unbekannte Substanzen	13,0
Alkylphenole	≤ 5 ppm

Durch die Anbaumethoden und Standorte der Pflanzen fluktuieren die Inhaltsstoffe des *Ginkgo biloba*-Extraktes in ihrer Konzentration, wodurch es essentiell wichtig ist, den Extrakt auf seine bioaktiven Inhaltsstoffe zu standardisieren (Luo and Smith, 2004). Hierzu unterlaufen die rohen, getrockneten Blätter zuerst einer Aceton-Wasser-Extraktion (Verhältnis 35 bis 67:1), worauf dann die Standardisierung des Extraktes auf den Terpenlaktone- und Flavonglykosid-Gehalt folgt (van Beek, 2002). Die standardisierten Blattextrakte, welche von den Firmen Beaufor-Ipsen Pharma (Paris, Frankreich) und Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals (Karlsruhe, Deutschland) entwickelt wurden, tragen die Bezeichnung *Ginkgo biloba*-Extrakt 761 bzw. EGb 761 und werden auf 24 % Flavonglykoside, 6 % Terpenlaktone, sowie unter 5 ppm Ginkgolsäuren standardisiert (Tabelle 1) (Luo and Smith, 2004).

Für die quantitative Analyse der Konzentration der verschiedenen Flavonglykoside werden zwei bzw. drei individuelle Flavonglykoside durch verschiedene Verfahren, wie die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. „High performance liquid chromatography“; HPLC), Diodenarray-Detektor-Messungen (DAD), Massenspektrometrie (MS) oder Lichtstreuungsdetektor-Messungen (ELSD, engl. Evaporative Light Scattering Detector) quantifiziert (van Beek and Montoro, 2009).

1.1.2.1 Zusammensetzung der *Ginkgo biloba*-Extrakte

Man kann *Ginkgo biloba*-Extrakte in zwei Kategorien aufteilen: Erstens sogenannte Vollextrakte, welche mit Alkohol hergestellt werden und somit alle Bestandteile in der alkoholischen Phase beinhalten. Zweitens standardisierte Extrakte, welche in einem mehrstufigen Verfahren auf die Terpenlaktone- und Flavonglykosid-Fraktion standardisiert werden. Während des Standardisierungsverfahren werden einige Inhaltsstoffe angereichert (Terpenlaktone und Flavonglykoside), während andere Bestandteile (Biflavone und Ginkgolsäuren) entfernt werden (Tabelle 1) (van Beek and Wintermans, 2001). Hierbei gelten die Terpenlaktone und Flavonglykoside als die pharmakologisch wirksamen Hauptbestandteile in *Ginkgo biloba* Blattextrakten (Luo and Smith, 2004).

1.1.2.2 Terpenlaktone

Die im *Ginkgo biloba*-Extrakt enthaltenen verschiedene Terpenlaktone, welche vor allem aus Ginkgoliden und Bilobalid bestehen und bisher nur in diesem Pflanzenextrakt nachgewiesen wurden (Abb. 1.2). Diese Terpenlaktone sind gut löslich in polaren organischen Lösungsmitteln wie Ethanol und Aceton, aber nur schlecht löslich in Wasser oder Diethylether (van Beek and Montoro, 2009).

Die Ginkgolide sind Diterpene, bestehend aus einem 5-Ring-Grundgerüst, mit drei Laktonringen, einem *spiro*-[4,4]-nonan-Kohlenstoffring, einem Tetrahydrofuran, sowie einer *tert*-Butylgruppe (Abb. 1.1.2.2) (Strømgaard and Nakanishi, 2004). Durch die Anzahl bzw. Anordnung von Hydroxylgruppen an den Positionen 1, 3 und 7 können die vier wichtigsten Ginkgolide (Ginkgolide A, B, C und J) klassifiziert werden (Abb. 1.2) (van Beek and Montoro, 2009). Hierbei kommen die Ginkgolide A, B und C zusammen auf eine Konzentration von ungefähr 3,1 % im *Ginkgo biloba*-Extrakt (Mahadevan and Park, 2008).

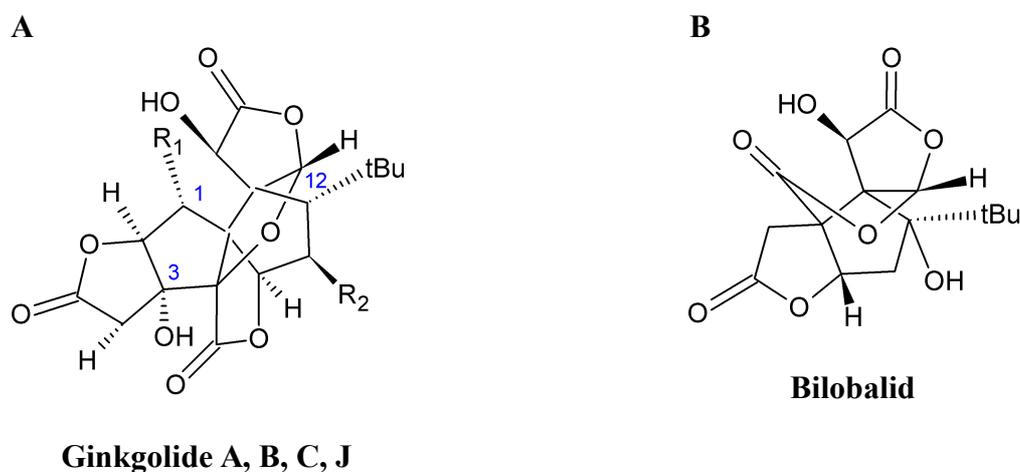


Abbildung 1.2: Strukturformeln der Terpenlaktone im *Ginkgo biloba*-Extrakt. (A) Dargestellt ist das Hauptgerüst der Ginkgolide. Durch Modifikation der Hydroxylgruppen an den Positionen 1, 3 und 7 kommt es zu Ginkgolid A ($R_1=R_2=H$), Ginkgolid B ($R_1=OH$, $R_2=H$), Ginkgolid C ($R_1=R_2=OH$) und Ginkgolid J ($R_1=H$, $R_2=OH$). (B) Dargestellt ist das im Extrakt vorkommende Bilbaloide. Nach van Beek und Montoro (2009).

Das im Extrakt vorkommende Bilobalid ist ein Sesquiterpen, mit einer vergleichbaren Struktur wie die Ginkgolide. Das Bilobalid besteht ebenfalls aus drei Laktonringen und der charakteristischen *tert*-Butylgruppe, aber mit nur einen Kohlenstoffringsystem (Abb. 1.2) (Strømgaard and Nakanishi, 2004). Die Bilobalide kommen in einer Konzentration von ca. 2,9 % im standardisierten Extrakt vor

(van Beek and Montoro, 2009) und sind im Gegensatz zu den Ginkgoliden chemisch weniger stabil, vor allem unter basischen Bedingungen (Fourtillan et al., 1995; Lang and Wai, 2003).

1.1.2.3 Flavonoide und Flavonglykoside

Die im *Ginkgo biloba*-Extrakt vorkommenden Flavonoide bestehen zum größten Teil aus glykosylierten Formen von Flavonole und Biflavone (Abb. 1.3), welche über Ethanol-Wasser-Gemische, Aceton-Wasser-Gemische oder Methanol extrahiert werden (van Beek, 2002). Die nicht-glykosylierten Formen (Aglykone) dieser Flavonoide kommen hingegen nur in geringen Anteilen vor (McKenna et al., 2001). Die häufigsten Aglykone der Flavonglykoside sind die Flavonole Quercetin, Isorhamnetin und Kaempferol, sowie die Biflavone Amentoflavon, Bilobetin, Sequojaflavon und Ginkgetin (Abb. 1.3) (van Beek, 2002). Die Bildung der Flavonglykoside verläuft über eine O-Glykolysierung der Flavonoide mit D-Glukose bzw. L-Rhamnose, wodurch Mono-, Di- und Triglykoside entstehen können.

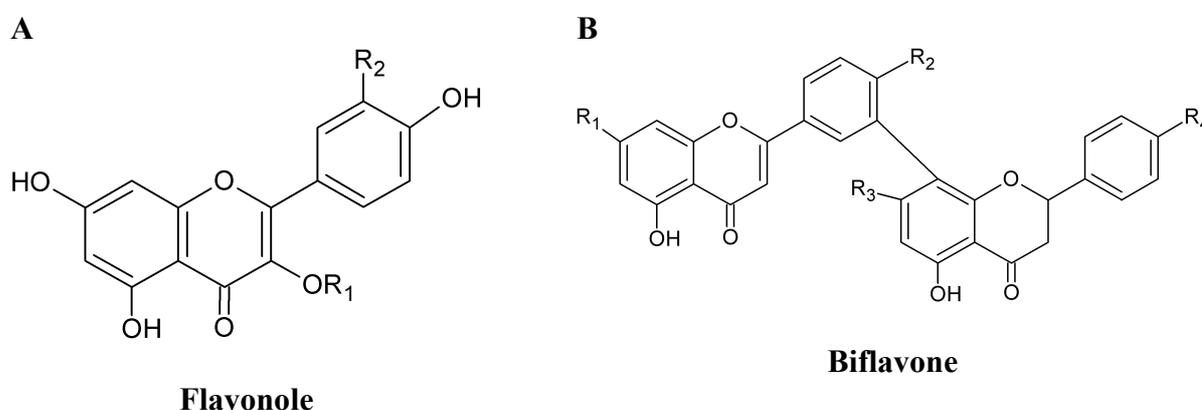


Abbildung 1.3: Strukturformeln der Flavonole und Biflavone im *Ginkgo biloba*-Extrakt. Die Flavonglykoside sind Flavonoide mit einer O-Glykosylierung an der dritten Position mit D-Glukose oder L-Rhamnose. **(A)** Dargestellt ist das Hauptgerüst der Flavonole. Durch Modifikation des Grundgerüsts kommt es zu Kaempferol (R₁=R₂=H), Quercetin (R₁=H; R₂=OH) und Isohamnetin (R₁=H R₂=OMe). **(B)** Dargestellt ist das Hauptgerüst der Biflavone. Durch Modifikation des Grundgerüsts kommt es zu Amentoflavon (R₁=R₂=R₃=R₄=OH), Bilobetin (R₁=R₃=R₄=OH; R₂=OMe), Sequojaflavon (R₁=OMe; R₂=R₃=R₄=OH) und Ginkgetin (R₁=R₂=OMe; R₃=R₄=OH). Nach van Beek und Montoro (2009).

Im Allgemeinen wirken diese Substanzen in der Zelle primär als Antioxidantien, Enzyminhibitoren und Kationchelatoren (DeFeudis, 2002), wohingegen für einige Biflavone auch fungizide

Wirkungen beschrieben wurden (Krauze-Baranowska and Wiwart, 2003). Die Glykosilierungsformen nehmen hierdurch entscheidenden Einfluss auf die Pharmakokinetik der Flavonglykoside, da mit steigender Anzahl der gekoppelte Glykoside die Resorption und somit die Konzentration im Blutplasma abnimmt (Goh and Barlow, 2004).

1.1.2.4 Weitere Inhaltsstoffe der *Ginkgo biloba*-Extrakte

In den standardisierten *Ginkgo biloba*-Extrakten kommen noch weitere Substanzen vor, welche auf Grund ihrer chemischen Struktur pharmakologische Wirkungen haben müssten, aber bisher nur teilweise oder gar nicht untersucht wurden (Tabelle 1) (van Beek and Montoro, 2009).

Zu den weiteren Inhaltsstoffen der Extrakte gehört das Isoflavonoid Genistein, welches als Glykosid oder als Aglykon vorkommt und zu der Substanzklasse der Phytoöstrogenen gehört (WANG et al., 2007). Weiterhin findet man verschiedene Alkyl- und Alkenylphenolcarbonsäuren, wie die Ginkgolsäure, Cardanol und Cardol (van Beek, 2002), sowie verschiedene Proanthocyanidine aus der Procyanidin- bzw. Prodelphinidin-Klasse (Stafford et al., 1986). Zudem befinden sich in den *Ginkgo biloba*-Extrakten verschiedene Carbonsäuren (D-Glucarsäure, Chinasäure, Shikimisäure), sowie einige Phenolcarbonsäuren (Protocatechusäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Kaffeesäure, Coumarinsäure, Ferulasäure, Chlorogensäure) (van Beek, 2002). Weitere interessante Einzelsubstanzen sind die Hydroxykynurensäure, Shikimisäure, Protocatechusäure, Vanillinsäure und Parahydroxybenzoesäure (van Beek, 2002).

Abschließend ist hier zu erwähnen, dass es zu den Proanthocyaniden, Polyprenolen, Carbonsäuren und nicht-flavon Glykosiden so gut wie keine wissenschaftlichen Studien bezüglich ihrer Pharmakologie existieren, obwohl diese bis zu 40 % des Gesamtextraktes ausmachen (Tabelle 1) (van Beek and Montoro, 2009).

1.1.3 Pharmakologische Wirkungen der *Ginkgo biloba*-Extrakte

Auf Grund der vielfältigen Inhaltsstoffe des *Ginkgo biloba*-Extraktes, kommt es zu mannigfaltigen Wirkungen auf verschiedenste zelluläre Signalwege, Proteine und Genexpressionen (Ramassamy, 2006).

Dementsprechend konnten sehr gute Wirkungen bei kardio- und zerebravaskulären Erkrankungen durch antioxidative Effekte erreicht werden, sowie eine Verbesserung der Blutzirkulation durch

Stimulation des „Endothelium derived relaxing factor“ (Pietri et al., 1997; Mahady, 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass die nur in den *Ginkgo biloba*-Extrakten vorkommenden Ginkgolide sehr selektive, potente Antagonisten des Plättchen-aktivierenden Faktors sind und hierdurch die Thrombozytenaggregation verringert wird (Koch, 2005). Weiterhin wurden auch Effekte auf verschiedene neuronale Rezeptoren beschrieben, welche in neurologischen Erkrankungen eventuelle neuroprotektive Wirkungen erzielen könnten (Ahlemeyer and Kriegelstein, 2003).

So gelten die Ginkgolide als Antagonisten des Glycin-Rezeptors (Jaracz et al., 2004; Kiewert et al., 2008), wohingegen die Bilobalide als Antagonisten von GABAA-Rezeptoren wirken können (Kiewert et al., 2007). Zudem konnte durch Applikation von EGb 761 eine Verringerung der Expression von peripheren Benzodiazepin-Rezeptoren erzielt werden (Amri et al., 1996).

Direkte neuroprotektive Wirkungen von *Ginkgo biloba*-Extrakten beruhen auf den sehr potenten antioxidativen Eigenschaften in der Reduzierung von freien Sauerstoffradikalen, Hydroxylradikale, Stickstoffoxide, Peroxy-Radikale und Hydrogen-Radikale (Maitra et al., 1995; Marcocci et al., 1994). So konnten Studien von Bastianetto und Kollegen in hippocampalen Zellen zeigen, dass EGb 761 eine schützende Wirkung als intrazelluläres Antioxidants gegen Stickstoffoxid-Radikale zeigt und somit die Apoptose der Zellen verhindert (Bastianetto et al., 2000).

Zudem konnten diese antioxidativen Eigenschaften von EGb 761 auch in vielen Studien mit Modellen der Alzheimer-Krankheit (AD) positive Effekte erzielen (Ramassamy et al., 2007). So konnte in neuronalen Zellen gezeigt werden, dass eine direkte Applikation von EGb 761 vor der beta-Amyloidpeptid(A β)-induzierten Produktion von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) schützt, die Formierung von neurotoxischen Abkömmlingen von A β -Fragmenten (ADDLs) hemmt und die Apoptose verhindert (Abb. 1.4) (Yao et al., 2001). Interessanterweise konnte in dieser Studie auch gezeigt werden, dass diese Effekte anscheinend unabhängig von den antioxidativen Eigenschaften waren (Yao et al., 2001).

Weiterhin konnte in Ratten eine verminderte A β -induzierte Membranoxidation durch EGb 761 erzielt werden, wodurch die guten antioxidativen Eigenschaften des Extraktes gezeigt wurden (Abb. 1.4) (Brunetti et al., 2006). Eine weitere Studie konnte belegen, dass es in Neuroblastoma Zellen durch eine EGb 761-Behandlung zu einer reduzierten Formation von A β -Fibrillen kommt, sowie zu einer Hemmung der Caspase-3 (Abb. 1.4), einem Schlüsselenzym der apoptotischen Zellsignalkaskade (Luo et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass Quercetin aus der Flavon-Fraktion die stärkste hemmende Wirkung auf die A β -Fibrillen Formation besitzt (Abb. 1.4) (Kim et al., 2005). Zusätzlich konnten in Neuroblastoma Zellen demonstriert werden, dass EGb 761 die

Aktivierung von A β -induzierten NF- κ B-, ERK1/2- und JNK-Signalwegen hemmt und im Gegenzug der neuroprotektive SIRT1-Signalweg aktiviert wird (Longpré et al., 2006).

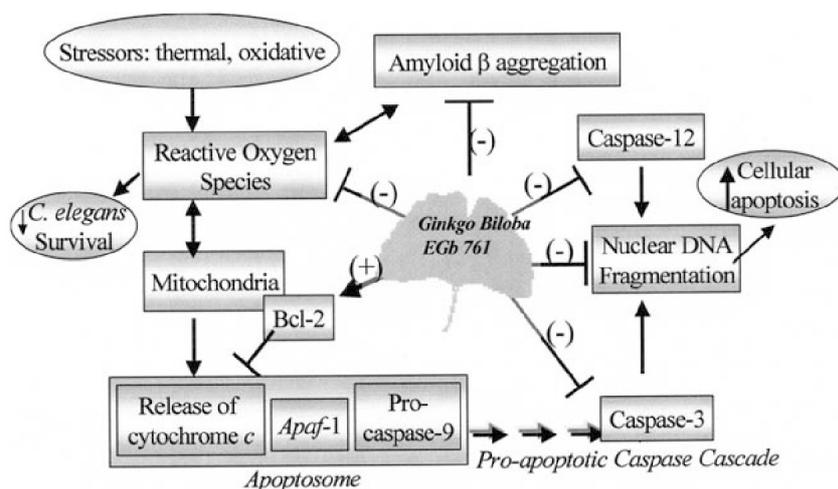


Abbildung 1.4: Übersicht über die pharmakologischen Effekte von EGb 76 in der Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit. Hierbei beruhen die positiven Wirkungen von EGb 76 vor allem auf der Reduzierung des oxidativen Stresses, einer verringerten Aggregation von A β und einer Hemmung von apoptotischen Signalwegen. Aus Smith und Luo (2004).

Zusammenfassend konnten somit multiple Wirkungen von EGb 76 in Modellen der AD beschrieben werden, welche hauptsächlich auf der Reduzierung des oxidativen Stresses, einer verringerten Aggregation von A β -Peptiden und einer reduzierten Aktivierung der A β -induzierten zytotoxischen Signalwege beruhen (Abb. 1.4) (DeFeudis and Drieu, 2000; Smith and Luo, 2004; Longpré et al., 2006).

Darüber hinaus konnten noch weitere indirekte, neuroprotektive Eigenschaften von EGb 76 festgestellt werden. So kommt es durch EGb 76 zur Induktion des „Nuclear-factor-erythroid-derived-like 2“-Proteins (NRF2), einem Transkriptionsfaktor für verschiedene zytoprotektive Gene mit einem „Antioxidant/Electrophilic Response Element“ (ARE) (Liu et al., 2007). Dementsprechend konnte durch Behandlung mit EGb 76 eine erhöhte Aktivierung von Phase-2-Genen und einer gesteigerten Expression der Heme Oxygenase 1 (HO-1) (Zhuang et al., 2002). Hierzu konnten die neuroprotektiven Eigenschaften von EGb 76 durch die Aktivierung der HO-1 bei ischämischen Gehirnverletzungen demonstriert werden (Saleem et al., 2008). Interessanterweise konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass die HO-1 nur durch den Gesamtextrakt induziert

wird und nicht durch die Bilobalide oder Ginkgolide (Saleem et al., 2008).

Abschließend konnten Studien von Bidon und Kollegen mittels DNA-Microarray-Analyse zeigen, dass es in Ratten durch eine dauerhafte Behandlung mit EGb 761 zu einer Modulation von mindestens 618 Genen kommt (Bidon et al., 2009). Dies zeigt, dass die Wirksamkeit von EGb 761 auf multiplen direkten Effekten und indirekten Modulation von Proteinen beruhen könnte (Mahadevan and Park, 2008).

1.1.4 Medizinische Verwendung der *Ginkgo biloba*-Extrakte

Zu den weltweit am häufigsten verkauften Phytopharmaka gehören verschiedenste Produkte aus *Ginkgo biloba*-Extrakten, mit geschätzten jährlichen Verkaufszahlen von ca. 1 Mrd. US-Dollar (DeKosky et al., 2008). Zudem wurden zwischen den Jahren 2006 und 2007, mehr als 1930 Publikationen und Patente zu *Ginkgo biloba*-Extrakten, wodurch dieser Pflanzenextrakt zu den am besten untersuchten Phytopharmaka gehört (van Beek and Montoro, 2009).

Die medizinische Verwendung von *Ginkgo biloba*-Extrakten begann in Deutschland ab 1960, mit ersten Verschreibungen Verbesserung der allgemeinen Blutzirkulation (van Beek and Montoro, 2009). Zur neueren Indikationen gehören Muskelschmerzen (*claudication intermittens*), Tinnitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, Depressionen und Abnahme der mentalen Vitalität (allgemeine Demenz, Konzentrationsstörungen) (Mahadevan and Park, 2008). Zur Behandlung dieser Erkrankungen existieren sehr unterschiedliche Angaben über die einzusetzenden Mengen von EGb 761 (Mahadevan and Park, 2008). Als adäquate Behandlung in kardiovaskuläre Erkrankungen wurde vorgeschlagen, drei bis viermal täglich 40 bis 60 mg bzw. 120 bis 240 mg über mehrere Wochen einzunehmen (Mahady, 2002). Im Allgemeinen ist die Einnahme von *Ginkgo biloba*-Produkten relativ risikoarm und nebenwirkungsfrei. Trotzdem kann es bei der Verwendung zu hämorrhagischen oder exzessiven Blutungen kommen, welche durch die antagonistische Wirkung auf den Plättchenaktivierender-Faktor hervorgerufen werden (Chan et al., 2007). Diese Nebenwirkungen konnten bisher jedoch nur im Tiermodell, unter Anwendung einer 100-fachen täglichen Dosis nachgewiesen werden (Koch, 2005). Von größerer Bedeutung ist allerdings die Indikationen von *Ginkgo biloba*-Extrakten in der Demenz der AD und gilt als alternative Therapie zur herkömmlichen Behandlung mit Memantin (Farlow et al., 2008). Auf Grund der zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien, in denen die positive Wirksamkeit von EGb 761 auf die pathophysiologischen Auswirkungen der AD nachgewiesen wurden (Ramassamy et al., 2007), kam

es auch zu einigen klinischen Studien über die Wirksamkeit von EGb 761 in der Demenz der AD (Mahadevan and Park, 2008). Diese durchgeführten klinischen Studien kamen aber zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen über die Wirkungen von EGb 761 auf die Demenz. So konnten in zwei groß angelegte Doppelblindstudien zur Progression der Demenz kein signifikanter Effekt bei Probanden mit einer EGb 761-Behandlung zur Kontrollgruppe festgestellt werden (DeKosky et al., 2008; Vellas et al., 2012). Im Gegensatz hierzu konnte eine klinische Studie, welche über einen Zeitraum von 20 Jahren durchgeführt wurde, positive Wirkungen von EGb 761 auf die altersbedingte Zunahme der Demenz feststellen (Amieva et al., 2013).

1.2 Proteindegradationsmechanismen

1.2.1 Allgemeine Proteindegradation

Die Degradation von Proteinen ist in der Zelle von essentieller Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostasis durch Rückgewinnung von Aminosäuren sowie in der Zellteilung, der Zelldifferenzierung, der Apoptose, verschiedener Signaltransduktionen, sowie in der Entfernung von schadhafte Proteinen und Organellen (Hershko and Ciechanover, 1998). Die intrazelluläre Proteolyse wird durch verschiedene Exo- und Endopeptidasen bewerkstelligt (Neurath, 1999). Diese Peptidasen können vereinzelt im Cytosol vorkommen (z.B. Caspasen und Sekretasen) oder in speziellen Mechanismen organisiert sein. Der wohl wichtigste Degradationsmechanismus der Zelle ist das Ubiquitin-Proteasom-System, welches zum Abbau Caspase-ähnliche, Trypsin-ähnliche und Chymotrypsin-ähnliche Peptidaseaktivität aufweist (Ciechanover, 2005). Von weiterer essentieller Bedeutung ist der Degradationsmechanismus über die Autophagie, in welchem der Proteinabbau durch lysosomale Cathepsine erfolgt (Korolchuk et al., 2009a). Interessanterweise kommt es mit zunehmendem Alter der Zelle und neurodegenerativen Erkrankungen zu verschiedenen Dysfunktionen in beiden Degradationsmechanismen (Koga et al., 2011; Lanucara et al., 2010).

1.2.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) spielt in der Proteindegradation, Proteinregulation (posttranslationale Modifikation), Proteinqualitätskontrolle, der Signaltransduktion, sowie der Kontrolle des Zellzyklus eine elementare Rolle (Ciechanover, 2005). In der Zelle werden rund 80 – 90 % der Polypeptide und Proteine über das UPS degradiert, wohin gegen der lysosomale Abbau nur rund 10 – 20 % der Proteine degradiert, wodurch die essentielle Funktion des UPS in der zellulären Homöostasis sichtbar wird (Lee and Goldberg, 1998). Zu diesem regulatorischen Degradationssystem gehören das Ubiquitin-Protein, verschiedene Ubiquitin-Enzyme und Ligasen, sowie das proteolytisch aktive 26S Proteasom (Burger and Seth, 2004).

1.2.2.1 Ubiquitin

Das Ubiquitin-Protein ist ein ubiquitär exprimiertes und stark konserviertes Protein, bestehend aus 76 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 8,5 kDa (Lund et al., 1985). Das Protein bildet eine

globuläre Struktur mit den C-terminalen, funktionelle Aminosäuren Glycin (G76), Lysine 48 (K48) und Lysin 63 (K63) (Abb. 1.5 A) (Hershko and Ciechanover, 1998). Das C-terminale G76 dient zur kovalenten Bindung von Zielproteinen, wohingegen K48 und K63 zur Bildung der Polyubiquitinkette benötigt werden (Abb. 1.5 A) (Johnson et al., 1992). Die Proteinbindungen erfolgen über reversible Verknüpfungen mittels verschiedener Ubiquitin-Ligasen (Abb. 1.5 B), welche sowohl die zu degradierenden Zielproteine erkennen, als auch für die Verknüpfung der Polyubiquitinkette verantwortlich sind (Johnson et al., 1992). Dieser Vorgang verläuft nach einer hierarchisch geordnete Reaktionskette und endet in der proteolytischen Degradation der polyubiquitylierten Zielproteine im 26S Proteasomkomplex (Sorokin et al., 2009).

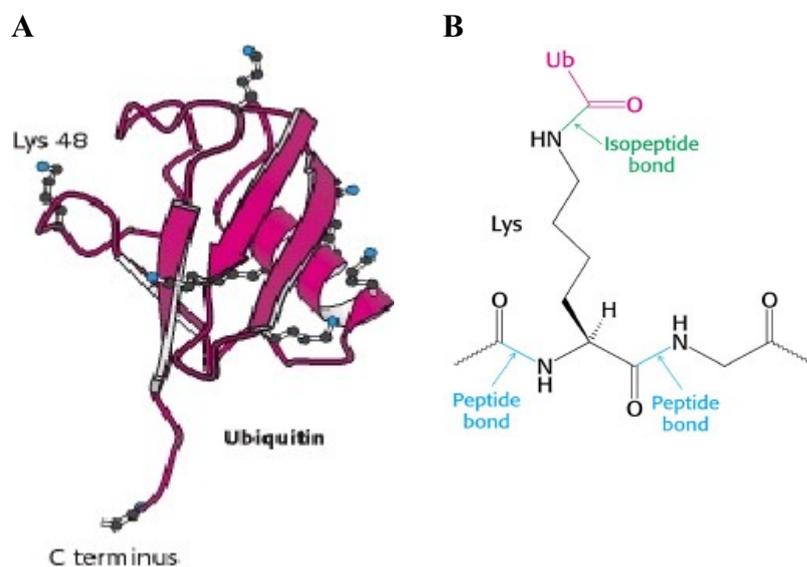


Abbildung 1.5: Verschied. Strukturen von Ubiquitin.

(A) Dargestellt ist die globuläre Proteinstruktur mit den wichtigsten funktionellen Aminosäuren G76, K48 und K63. (B) Strukturformel der Isopeptid-Bindung zwischen Ubiquitin und dem Zielprotein. Aus Berg et al. (2002).

1.2.2.2 Der 26S-Proteasomkomplex

Das 26S-Proteasom ist eine proteolytisch aktive Struktur mit einer molekularen Größe von 2,4 MDa und wird aus einem katalytischen sowie zwei regulatorischen Komplexen gebildet.

Der katalytische Komplex ist das 20S-Proteasom, welches eine Hohlzylinderstruktur mit proteolytisch aktiven Zentren bildet. An den Enden der 20S-Einheit befinden sich jeweils ein regulatorischer Komplex, dem 19S-Proteasom, der eine Art Deckel bildet (Abb. 1.6). Der 19S-Komplex bindet ubiquitinierte Substratproteine, prozessiert ihre Entfaltung zur nativen

Proteinstruktur und transportiert diese in den proteolytischen 20S-Komplex (Baumeister et al., 1997; Kisselev and Goldberg, 2001). Die meisten Substrate des UPS sind polyubiquitiniert, aber auch nicht-ubiquitinierte Substratproteine können direkt vom 20S-Proteasomkomplex degradiert werden (Jariel-Encontre et al., 2008).

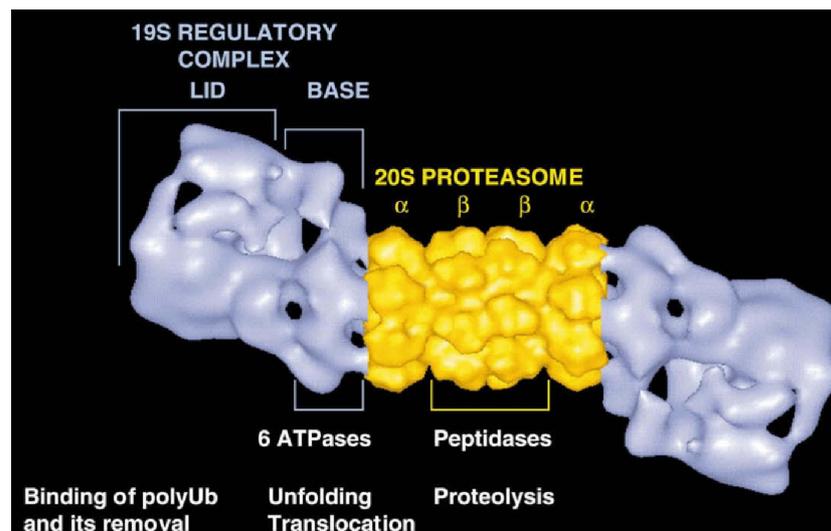


Abbildung 1.6: Computer-generiertes Bild der Struktur des 26S-Proteasomkomplexes. Dargestellt sind die regulatorischen 19S-Komplex (engl. „Regulatory Complex“), bestehend aus „Lid“ und „Base“. Diese enthalten ATPasen, welche ubiquitinierte Substratproteine binden und entfalten. Weiterhin ist der proteolytische 20S-Komplex dargestellt, bestehend aus jeweils zwei α -Ringen und zwei β -Ringen. Aus Kisselev und Goldberg (2001).

1.2.2.3 Der 19S-Komplex

Die proteasomalen 19S-Komplexe sind an Öffnungen des 20S-Hohlzylinders lokalisiert und bilden somit eine Art Deckel (engl. „cap“), welcher den Zugang zum 20S-Komplex reguliert (Abb. 1.6) (Baumeister et al., 1997; Glickman et al., 1999). Der 19S-Komplex besteht aus der „Base-“ und „Lid-“Einheit, welche die proteasomale Degradation von polyubiquitinierten Proteinen durch verschiedene Funktionen regulieren: die selektive Bindung und Erkennung der Substratproteine, das Abspalten der Polyubiquitinkette vom Substrat durch Isopeptidasen, die ATPase-abhängige Entfaltung der Substratproteine (Wolf and Hilt, 2004).

Die Base-Einheit besteht aus sechs ATPase-Untereinheiten (Rpt1 – Rpt6; engl. „Regulatory Particle Triphosphatases“), welche eine hexamere Ringstruktur bilden und die Verbindung zum 20S-Komplex herstellen (Abb. 1.7 A) (Lam et al., 2002). Diese Rpt-Untereinheiten dienen zur Erkennung von Polyubiquitinketten, dem Öffnen des 20S-Komplexes und der Entfaltung der zu

degradierenden Proteine (Wolf and Hilt, 2004). Auf diesem Ring aus Rpt-Untereinheiten liegen vier Nicht-ATPase-Untereinheiten (Rpn1, Rpn2, Rpn10 und Rpn 13; engl. „Regulatory Particle non-ATPase“), welche die Base-Einheit mit der Lid-Einheit verbinden und auch zur Erkennung polyubiquitinierte Substrate dienen (Abb. 1.7 A) (Rosenzweig et al., 2008; Saeki et al., 2002). Schließlich folgt die Lid-Einheit, welche aus neun Rpn-Untereinheiten (Rpn3, Rpn5 - Rpn9, Rpn11, Rpn12 und Rpn13) besteht und vornehmlich der Entfernung der Polyubiquitinkette vom Substrat dient (Abb. 1.7 A) (Lasker et al., 2012; Sharon et al., 2006).

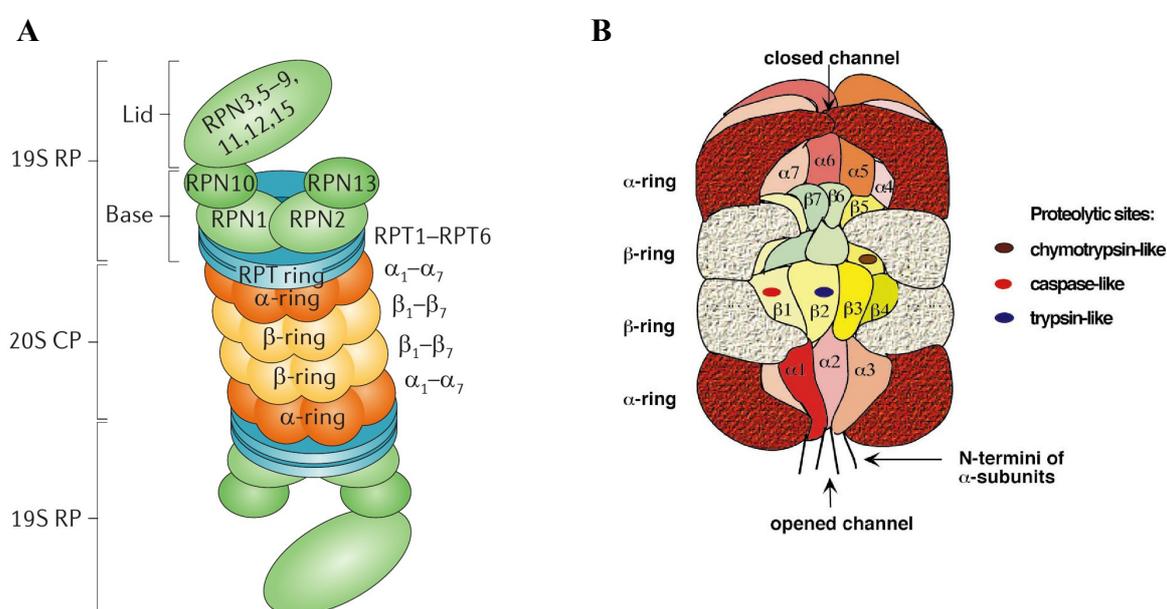


Abbildung 1.7: Struktur des 26S-Proteasomkomplexes. (A) Dargestellt sind die regulatorischen 19S-Komplexe (19S RP), bestehend aus „Lid“ und „Base“, welche die Degradation polyubiquitinerter Proteinen regulieren. Die „Base-“ und „Lid-“Einheiten bestehen aus verschiedenen Rpt-Untereinheiten (engl. „Regulatory Particle Triphosphatases“) und Rpn-Untereinheiten (engl. „Regulatory Particle non-ATPase“). Der proteolytische 20S-Komplex (20S CP) besteht aus jeweils zwei α-Ringen und zwei β-Ringen, zusammengesetzt aus jeweils sieben verschiedenen Proteinen (α₁-α₇, β₁-β₇). Aus Weissman et al. (2011). (B) Einzelne Darstellung des proteolytischen 20S-Komplexes. In den inneren Ringen sind die proteolytischen Untereinheiten β₁-(Caspase-ähnliche), β₂-(Trypsin-ähnliche) und β₅-(Chymotrypsin-ähnliche) lokalisiert. In den äußeren Ringen befinden sich die α-Untereinheiten, welche die Komplexöffnung und Substratbindung regulieren. Aus Kisselev und Goldberg (2001).

1.2.2.4 Der 20S-Komplex

Der proteasomale 20S-Komplex bildet einen hohlen Zylinder mit multikatalytischen Proteasen und einer Breite von 53 Å im mittleren Strukturbereich bzw. 13 Å an der Strukturöffnung (Abb. 1.6). Hierbei werden im 20S-Komplex sowohl vorher ubiquitinierte Substrate als auch nicht-ubiquitinierte

Substrate proteolytisch degradiert (Jariel-Encontre et al., 2008).

Die Zylinderstruktur des 20S-Komplexes wird aus vier Ringen gebildet, bestehend aus jeweils zwei α -Ringen und zwei β -Ringen, welche ihrerseits aus jeweils sieben verschiedenen Untereinheiten ($\alpha 1$ bis $\alpha 7$, bzw. $\beta 1$ bis $\beta 7$) zusammengesetzt sind (Abb. 1.7 A) (Groll et al., 1997; Zwickl et al., 2001). Die beiden inneren Ringe bestehen aus β -Untereinheiten und besitzen an der Innenwand proteolytische Aktivität. Hierbei wird der $\beta 1$ -Untereinheit eine Caspase-ähnliche Aktivität, der $\beta 2$ -Untereinheit eine Trypsin-ähnliche Aktivität und der $\beta 5$ -Untereinheit eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität zugeordnet (Abb. 1.7 B) (Kisselev and Goldberg, 2001; Rivett, 1989). Hierbei erfüllt die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität in der proteasomalen Degradation eine elementare Starterfunktion, indem es durch eine nukleophile Reaktion des Serin 195 mit dem Carboxylende des Proteinsubstrates zur Bindung des Substrates an die Peptidase kommt (Kisselev and Goldberg, 2001). Die äußeren Ringe des 20S-Komplexes bestehen aus α -Untereinheiten und dienen der Erkennung der Substrate, als auch dem Transport der entfalten Proteine zu den inneren Ringen (Löwe et al., 1995). Hierzu dient der N-Terminus der α -Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ der Interaktion bzw. Erkennung der Substrate, wohingegen die α -Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ für das Öffnen bzw. Schließen des Komplexes verantwortlich sind (Abb. 1.7 B) (Kisselev and Goldberg, 2001).

1.2.2.5 Proteindegradation durch das UPS

Durch das komplexe Zusammenspiel der Komponenten des UPS und der hohen Diversität der E2-Enzyme (ca. 30 - 40 verschiedene Formen), sowie E3-Ligasen (einige Hundert Formen) wird eine hohe Spezifität und Effektivität des UPS erreicht (Weissman et al., 2011). Vor allem durch die große Diversität der E3-Ubiquitin-Ligasen kommt es zur Erkennung verschiedenster Proteine mit einer gewissen Halbwertszeit, fehlerhaft gefalteten Proteindomänen oder oxidativen Beschädigungen der Peptidkette. Hierbei werden die Zielproteine polyubiquitiniert und können somit vom 26S-Proteasomkomplex erkannt und degradiert werden (Glass and Gerner, 1987). Im Folgenden wird die Enzym-Kaskade der Ubiquitinierung genauer beschrieben (Berg et al., 2002).

Zuerst kommt es zur ATP-abhängige Aktivierung von Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) unter Ausbildung eines Adenylat-Zwischenprodukts. Unter Abspaltung des Adenylats kommt es zur Verknüpfung der carboxyterminale Gruppe des Ubiquitins über eine Thioester-Bindung an das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) (Haas et al., 1982). Diese Aktivierung

ermöglicht die Bindung von Ubiquitin an die Sulfhydrylgruppe des Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2), wodurch das aktivierte Ubiquitin vom E2-Enzym übernommen und weiter transportiert wird. Die Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) erkennt und bindet die Zielproteine des proteasomalen Abbaus und katalysiert die Übertragung von Ubiquitin auf das gebundenen Protein unter Ausbildung einer Isopeptid-Bindung (Hershko et al., 1986; Sorokin et al., 2009). Diese Isopeptid-Bindung erfolgt zwischen dem ϵ -Aminorest eines Lysins des Zielproteins und dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins (G76) (van Nocker and Vierstra, 1993). In der Regel werden mehrere Ubiquitin-Moleküle an ein abzubauenendes Protein gebunden, wodurch es zur Bildung einer Polyubiquitinkette kommt. Diese Verknüpfungen erfolgt durch eine Isopeptidbindung zwischen dem Lysinrest (K48) des schon gebundenen Ubiquitins und der C-terminalen Carboxygruppe eines anderen Ubiquitin-Moleküls (Chen and Pickart, 1990; van Nocker and Vierstra, 1993).

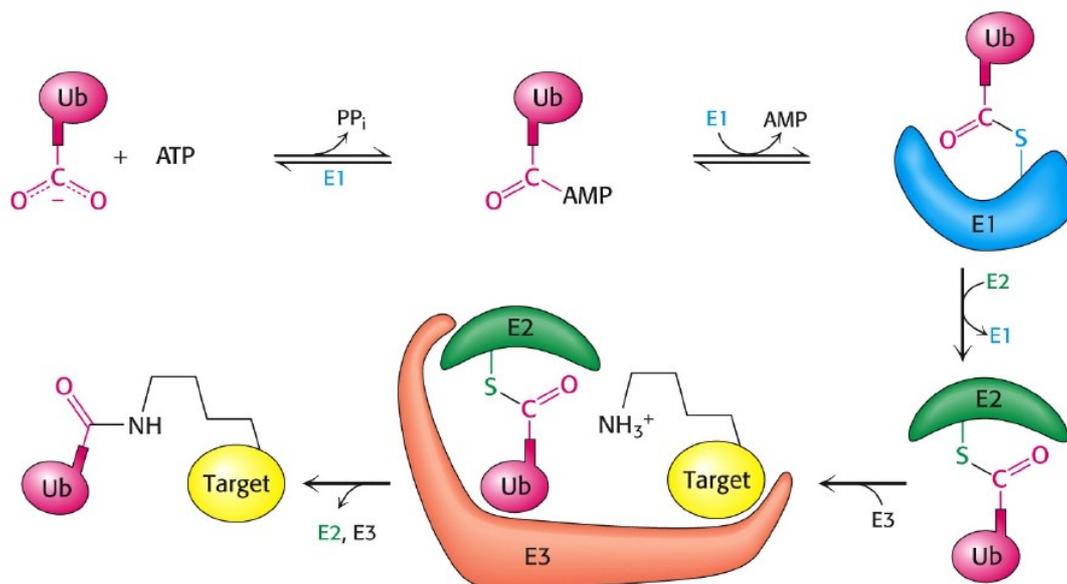


Abbildung 1.8: Darstellung der Enzym-Kaskade zur Ubiquitinierung von Proteinen. Zuerst erfolgt die Aktivierung von Ubiquitin unter Ausbildung Thioester-Bindung mit dem E1-Enzym. Darauf wird das Ubiquitin mit dem E2-Enzym konjugiert und schließlich über die E3-Ligase auf das Zielprotein transferiert. Aus Berg et al. (2002).

Das mit einer Polyubiquitinketten versehene Zielprotein wird nun vom 19S-Proteasomkomplex erkannt und gebunden. Daraufhin wird die Polyubiquitinkette abgespalten, das Zielprotein entfaltet und die native Polypeptidkette im 20S-Proteasomkomplex proteolytisch in kleine Peptidfragmente

gespalten (Hershko and Ciechanover, 1998). Die abgespaltene Polyubiquitinkette kann nun durch Ubiquitin-Peptidasen (engl. „Deubiquitinating enzymes“; DUBs) wieder in Monomere Ubiquitin-Moleküle gespalten werden, wodurch es zu einem „Ubiquitin-Recycling“ kommt. Zudem können aber auch einzelne Ubiquitin-Moleküle oder ganze Polyubiquitinketten mit dem Zielprotein degradiert werden (Weissman et al., 2011). Abschließend sollten hier noch die Ubiquitin-ähnlichen Proteine SUMO (engl. „Small ubiquitin-like modifier“) und NEDD (engl. „Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated“) erwähnt werden. Diese Proteine können die proteasomale Degradation von einigen Proteinen entscheidend regulieren, in dem sie um die Proteinbindung mit Ubiquitin konkurrieren (Nagy and Dikic, 2010).

1.2.2.6 Erkennungsmotive proteasomaler Substratproteine

Die Erkennung der meisten proteasomalen Substratproteine geschieht über destabilisierende Abbausequenzen, welche erst posttranslational zum Vorschein kommen. Diese Sequenzmotive werden von E3-Enzymen erkannt und führen dann zur Ubiquitinierung dieser proteasomalen Substrate. Die Abbausequenzen liegen meist N-terminal (engl. „N-End rule“) und bestimmen die Halbwertszeit der Proteine in der Zelle (Mogk et al., 2007). So bestimmt die Aminosäureabfolge Met, Gly, Ala, Ser, Thr, Val eine Halbwertszeit von ungefähr 120 Minuten, die Abfolge Gln, Pro eine Halbwertszeit von ungefähr 10 Minuten. Proteine, welche nicht der Ubiquitinierung unterliegen, aber vom 20S-Proteasom abgebaut werden, tragen häufig eine PEST-Sequenz (Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T)) (Menéndez-Benito et al., 2005; Mogk et al., 2007).

Weiterhin können aber auch Proteine mit Fehlfaltungen in ihren Domänen durch das UPS abgebaut werden. Hierbei spielt das UPS eine entscheidene Rolle in der „Qualitätssicherung“ der hergestellten Proteine und trägt somit zur Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostasis bzw. Proteinqualitätskontrolle (PQC) bei. Diese Proteinefehlfaltungen können durch Mutationen oder posttranslationale Beschädigungen, wie Oxidation oder Isomerisierungen entstehen und führen meist zu zellulären Dysfunktionen und Erkrankungen (Kisselev and Goldberg, 2001). Diese abnormal gefalteten Proteine werden von einem System aus molekularen Chaperonen, sogenannten Hitzeschock-Proteinen (HSP), erkannt und gebunden, wodurch eine normale Faltung des Proteins erzielt werden kann (Chen et al., 2011). Kommt es durch die Bindung der Chaperone nicht mehr zu einer korrekten Faltung der fehlgefalteten Proteine, werden diese Proteine über das UPS degradiert

um die Aggregation und Fehlfunktionen dieser Proteine zu verhindern (Chen et al., 2011). Hierbei erfüllt das HSP70/HSP90-System eine entscheidende Schlüsselfunktion im Abbau von beschädigten und fehlgefalteten Proteinen (Pratt et al., 2010). So führt die Inhibition von HSP90 (engl. „Heat shock protein 90“) zur Induktion von molekularen Chaperonen des Typs HSP70 (engl. „Heat shock protein 70“), wodurch es zu einer direkten proteasomalen Degradation von HSP90-Klientproteinen über das UPS kommt (Theodoraki and Caplan, 2012). Hierbei kommt es zur Interaktion zwischen verschiedenen E3-Ubiquitin-Ligasen wie CHIP (engl. „Carboxyl-terminus of Hsp70 Interacting Protein“) oder Parkin und HSP70, wodurch das Zielprotein polyubiquitiniert und abgebaut wird. Im Gegensatz hierzu führt eine Bindung von HSP90 zur Stabilisierung der Zielproteine und verhindern den HSP70-induzierten Abbau (Pratt et al., 2010).

1.2.3 Autophagie

Eine weitere hoch konservierte und ubiquitär vorkommende Form der Proteindegradation, sowie der Degradation von Organellen und cytosolischen Proteinaggregaten, ist der Mechanismus der Autophagie (Mizushima and Komatsu, 2011).

Dieser Mechanismus kann durch vielerlei Einflüsse induziert werden wie durch Nährstoffmangel, oxidativen Stress, Hitzeschock und Akkumulation defekter, abnormaler Proteine (Yang and Klionsky, 2010). Hierbei werden Proteine und Organellen von einer Doppelmembran umschlossen, wodurch ein Autophagosom entsteht, welches schließlich mit Lysosomen fusioniert und der autophagosomale Inhalt degradiert wird (Katunuma and Kominami, 1985). Die Autophagie kann in verschiedene Formen unterteilt werden: Makroautophagie, Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (engl. „Chaperone mediated autophagy“; CMA) (Abb. 1.9) (Mizushima and Komatsu, 2011). Bei der CMA kommt es zu einem selektiven Proteinabbau, bei welchem die Zielproteine eine typische Erkennungssequenz Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) aufweisen. Diese Sequenz wird von einem Proteinkomplex, bestehend aus HSC70 (engl. „Heat shock cognate 71 kDa protein“), HSP40 (engl. „Heat shock protein 40“), HSP90 (engl. „Heat shock protein 90“), HIP (engl. „HSC70-interacting protein“), HOP (engl. „Hsc70/Hsp90-organizing protein“) und BAG1 (engl. „BCL2-associated athanogene 1“) erkannt und durch LAMP-2A (engl. „lysosomal membrane-associated protein 2a“) ins Lysosom transportiert (Abb. 1.9) (Myeku and Figueiredo-Pereira, 2011). Im Gegensatz hierzu dient die Makroautophagie meist zur selektiven Entfernung von Organellen wie Mitochondrien (Mitophagie) und Peroxisomen (Pexophagie), aber auch zur

Entfernung von Lipiden, Zuckern und RNA (Abb. 1.9) (Mizushima and Komatsu, 2011). In der Mikroautophagie werden die abzubauenen Strukturen hingegen direkt vom Lysosom umschlossen und abgebaut (Abb. 1.9) (Ding, 2010).

1.2.3.1 Degradationsprozess durch Makroautophagie

Der Mechanismus der Makroautophagie (ab hier nur noch vereinfacht als Autophagie bezeichnet) wird durch mehrere komplexe, zelluläre Interaktionen gesteuert, die mit einer zentralen Funktion von verschiedenen Proteinen des Typs „Autophagie-verwandte-Gene“ (autophagy-related gene, ATG) eine zentrale Rolle spielen (Abb. 1.9) (Yang and Klionsky, 2010). Folglich kann man den Mechanismus der Autophagie in drei Phasen unterteilen: Erstens die Initiationphase, in welcher verschiedene Signale zu einer mTOR (mammalian target of Rapamycin)-abhängigen Bildung der präautophagosomalen Struktur (PAS) führen (He and Klionsky, 2009). Hierbei spielt die Serin/Threoninkinase mTOR eine regulatorische Rolle, da mTOR durch verschiedene zelluläre Signale inhibiert werden kann und es somit zur Initiation der Autophagie kommt. Diese Initiation führt zur Dephosphorylierung von ATG-Proteinen, welche für die Bildung der präautophagosomalen Struktur (PAS) und der Phagophore zuständig sind (Abb. 1.9). Weiterhin kann die Rekrutierung von ATG-Proteinen durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Vps34 reguliert werden (Mizushima and Komatsu, 2011).

Im zweiten Schritt werden für die Vergrößerung der Phagophore zum Autophagosom zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme benötigt. Das erste System ist das ATG12-ATG5-ATG16L-System, welches an der äußeren Membran der Phagophore lokalisiert ist und vor der Bildung des Autophagosoms abgespalten wird (Abb. 1.9). Das zweite System bildet einen Komplex aus Phosphatidylethanolamin (PE) und LC3 (engl. „Microtubule-associated protein 1 light chain 3“)-Proteinen (Abb. 1.9) (Filimonenko et al., 2010; Fujita et al., 2008). Hierbei katalysiert die Cysteinprotease ATG4 die Umwandlung von pro-LC3 zu LC3-I, welches dann durch ATG7- und ATG3-Enzyme an PE konjugiert wird. Der entstandene PE-LC3-II-Komplex ist nun stabil mit der inneren und äußeren Autophagosomenmembran assoziiert (Abb. 1.9) (Ding, 2010).

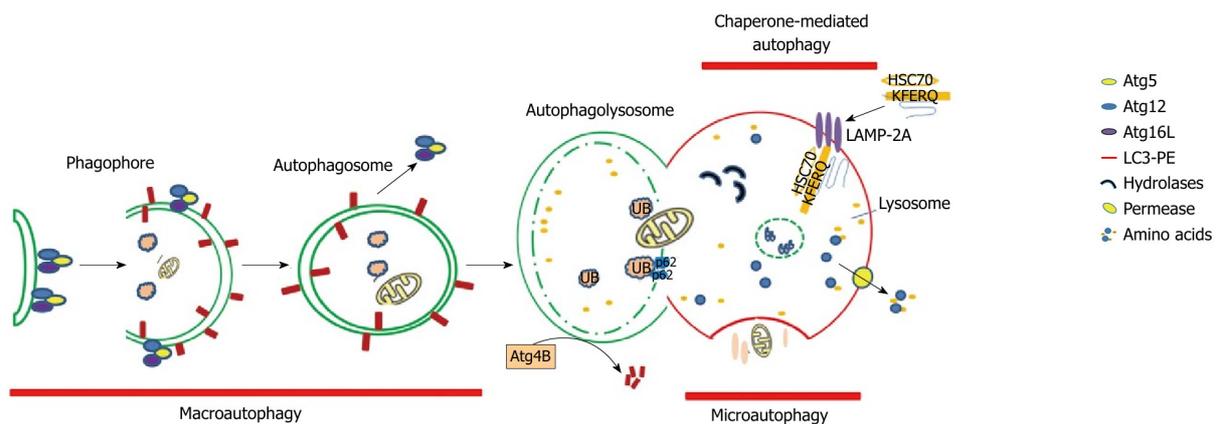


Abbildung 1.9: Darstellung der verschiedenen Degradationsprozess der Autophagie und der Zusammenhang zwischen der Makro-, Mikro- und der Chaperon-vermittelte-Autophagie (CMA). Im Speziellen sind die Abläufe und die beteiligten Proteine der Makroautophagie gezeigt. In der Initiationphase kommt es zu einer mTOR-abhängigen Bildung der präautophagosomalen Struktur. Die Vergrößerung der Phagophore erfolgt über den ATG-Komplex und PE-LC3-Komplex, sowie der Bildung des Autophagosoms unter Abspaltung des ATG-Komplexes. Durch abschließende Fusion mit Lysosomen entsteht das Autophagolysosoms, in welchem es zur Degradation des autophagosomalen Inhaltes kommt. Aus Ding et al. (2010).

Im dritten Schritt fusioniert das reife Autophagosoms erst mit Endosomen zum Amphisom, um durch anschließende Fusion mit Lysosomen das Autophagolysosoms zu bilden (Abb. 1.9) (Ding, 2010). Hierbei wird nun der PE-LC3-II-Komplex an der äußeren Membran durch ATG4-Enzyme abgespalten, während der PE-LC3-II-Komplex an der inneren Membran im Autophagolysosom degradiert wird (Abb. 1.9) (Mizushima and Yoshimori, 2007; Sou et al., 2006). Dieser Prozess kann genutzt werden, um über die Bestimmung des Gehaltes an LC3-II-Proteinen, Auskünfte über den Status der Autophagie zu erhalten (Mizushima and Yoshimori, 2007). Abschließend erfolgt im Autophagolysosom die Degradation des autophagosomalen Inhaltes durch saure Hydrolyse mittels lysosomaler Cathepsine (Abb. 1.9) (Ding, 2010; Ueno and Takahashi, 2009).

1.3 Die neurodegenerative Huntington-Krankheit

1.3.1 Gemeinsamkeiten zwischen neurodegenerativen Erkrankungen

Die meisten neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Krankheit (AD), die Parkinson-Krankheit (PD) oder die Huntington-Krankheit (HD), sind durch einen fortschreitenden Verlust von Neuronen in verschiedenen Nervengeweben gekennzeichnet, wodurch es zu pathologischen Funktionsstörungen der Kognition, Motorik und Sensorik kommt (Mattson and Magnus, 2006). Diese Erkrankungen können erblich bedingt auftreten oder von sporadischer Natur sein, wobei die Wahrscheinlichkeit für eine sporadische Erkrankung mit fortschreitenden Lebensalter stark ansteigt (Kourtis and Tavernarakis, 2011). Als Gründe für das sporadische, altersabhängige Vorkommen gelten die Zunahmen von oxidativem Stress, gestörter Energiehomöostasis, Akkumulation von geschädigten Proteinen und DNA, sowie einer verminderten Proteindegradation in den betroffenen Neuronen (Lanucara et al., 2010; Halliwell, 2002). Durch den zunehmenden oxidativen Stress kommt es zu Modifikationen von Proteinen, wie Carbonylierung, Nitrierung, Phosphorylierung, sowie zu kovalenten Bindungen mit Lipidperoxidationsprodukten, wie 4-Hydroxynonenal. Schließlich können diese Modifikationen, zusammen mit der im Alter verminderten Proteindegradation, zum Funktionsverlust und Aggregation verschiedener Proteine führen (Halliwell, 2002; Mattson and Magnus, 2006).

Die eher selteneren Fällen der erblich bedingten Erkrankungen werden durch Mutationen in spezifischen Genen verursacht, wodurch es zu einem Eintreten der Erkrankungen schon in mittleren Lebensaltern kommt. So führen Mutationen im *Presenilin-1*-Gen und dem Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein=APP) zu einer AD in mittleren Lebensjahren, mit einer vermehrten Produktion der neurotoxischen Amyloid- β -Peptide (A β) (Mattson and Magnus, 2006). Auch im Falle der HD spielen Mutationen im *huntingtin*-Gen eine entscheidende Rolle in Penetranz der Erkrankung (MacDonald et al., 1993). Durch die zelluläre Proteolyse des Huntingtin-Proteins kommt es zur Entstehung von N-terminalen Proteinfragmente, welche je nach Stärke der Mutationen im codierenden Gen, zur Proteinaggregation neigen (Gafni et al., 2004; Wellington et al., 2002). Im Allgemeinen kommen Proteinaggregationen durch Mutationen oder Modifikationen zu Stande, welche zu Veränderungen der Primärstruktur führen, welche eine korrekte Faltung und Degradation der betroffenen Proteine erschweren (Dobson, 2004; Uversky, 2003). Schließlich kommt es zur Akkumulation der betroffenen Proteine zu amyloiden Fibrillen und einer Bildung von nicht mehr abbaubaren Proteinaggregaten (Chen et al., 2002).

1.3.2 Die Huntington-Krankheit (*Chorea Huntington*)

Die Huntington-Krankheit (*Chorea Huntington*) bzw. im Englischen „Huntington’s disease (HD)“, ist eine autosomale, dominant-vererbare neurodegenerative Erkrankung, welche vor allem durch progressive motorische Dysfunktionen, Demenz, sowie emotionalen Störungen gekennzeichnet ist (Kremer et al., 1994). Die Prävalenz beträgt weltweit 5 - 10 Krankheitsfälle auf 100.000 Einwohnern, mit einem Ausbruch der Erkrankung im Durchschnittsalter von 37 Jahren (Goldberg et al., 1993; Kremer et al., 1994).

1.3.2.1 Das *huntingtin*-Gen und Huntingtin-Protein

Der Locus des *huntingtin*-Gens (*IT15*) wurde 1983 entdeckt, wobei es erst eine Dekade später zur erfolgreichen Klonierung kam (HDCRG, 1993). Das Genprodukt von *IT15* ist das Huntingtin-Protein (Htt), einem hochkonservierten, cytoplasmatischen Protein, mit ubiquitärer Expression und einer Größe von 348 kDa (Abb. 1.10) (DiFiglia et al., 1995). Die molekulare Rolle des Htt-Proteins in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen ist bisher noch nicht vollständig geklärt (Ross and Tabrizi, 2011). Bislang ist bekannt, dass das Protein wichtige Funktionen bei der embryonalen Entwicklung und Neurogenese erfüllt (Imarisio et al., 2008). Ferner ist das Protein von essentieller Bedeutung für den zellulären Eisentransport, dem allgemeinen zellulären Vesikeltransport, in der Produktion und Transport des „Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)“, der neuronalen Transkription, der synaptischen Transmission, sowie in anti-apoptotischen Prozessen und weiteren zellulären Signalwegen (Ross and Tabrizi, 2011).

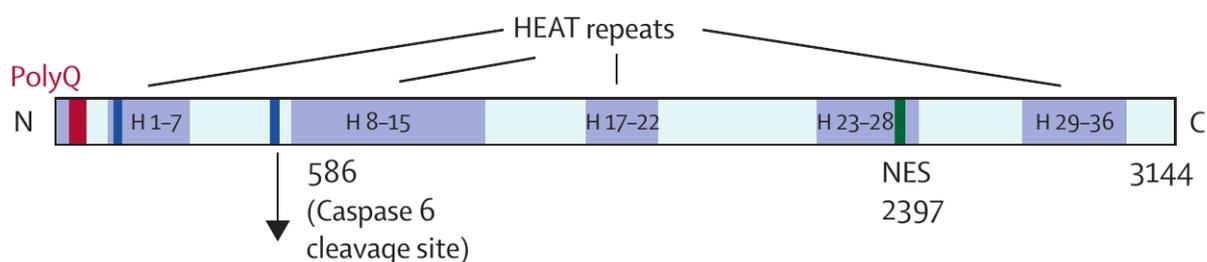


Abbildung 1.10: Darstellung des vollständigen Huntingtin (Htt)-Proteins. Htt-Protein mit verschiedenen Domänen von HEAT-Sequenzen (engl. „Huntingtin elongation factor, protein phosphatase and the yeast kinase TOR“). Durch Proteolyse des Htt-Proteins durch Caspase 6, entstehen N-terminale Proteinfragmente mit polyglutaminen Bereichen (polyQ). Hierbei führt das vollständige Htt-Protein oder die kleineren Polypeptide, je nach Stärke der Genmutationen, zur Proteinaggregation. Aus Ross und Tabrizi (2011).

Die Pathologie der HD wird durch Mutationen im *huntingtin*-Gens ausgelöst, in denen es im Gen zu aberranten CAG-Triplet-Wiederholungen im Exon 1 kommt, was zu vervielfältigten Wiederholungen der Aminosäure Glutamin (Q) im codierten Protein führt (Abb. 1.10) (Goldberg et al., 1993). Schließlich führt das vollständige Htt-Protein oder kleiner Polypeptide, welche durch Proteolyse von intrazellulären Caspasen (Caspase 6) entstehen, ab einer Länge von mehr als 40 Glutaminen zur Krankheit (Abb. 1.10) (Yamada et al., 2000).

Hierdurch kommt es in der HD zu einer ausgeprägten Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp, sowie einer Penetranz der Erkrankung in Abhängigkeit von der Länge der polyglutaminen Domäne des codierten Htt-Proteins (Gatchel and Zoghbi, 2005). Hieraus wurde geschlossen, dass das verlängerte Protein eine toxische Funktion erfüllt und die Toxizität stark von der Anzahl der Glutamine abhängt (Rosas et al., 2008). Weitere bekannte Erkrankungen mit CAG-Wiederholungen in mutierten Genen sind die Spinocerebelläre Ataxien (SCA) vom Typ 1-3, 6, 7 und 17, sowie die Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy (SBMA) (Palazzolo et al., 2007; Paulson et al., 1997).

1.3.2.2 Zelluläre Dysfunktionen in der HD

Durch die Mutationen im *huntingtin*-Gen kommt es zu einer pathologischen Verlängerung des Htt-Proteins, wodurch es zu unnatürlicher Faltung des Proteins und Konformationsänderungen gegenüber der nativen Konformationen kommt (Hackam et al., 1998). Diese Konformationsänderung des Htt-Proteins führt zu neuen Eigenschaften und neuen zellulären Interaktionen des mutanten Htt-Proteins (mHtt), welche die neuronale Homöostasis nachhaltig stören können (Abb. 1.11) (Ross and Tabrizi, 2011; Takahashi et al., 2010).

Bekannt sind Störungen der allgemeinen Gentranskription mit Umbau des Chromatins (Nucifora et al., 2001; Steffan et al., 2000), Verschlechterung im axonalen Transport (Caviston et al., 2007), mitochondrialen Störungen (Lin and Beal, 2006), veränderte Calcium-Homöostasis (Tang et al., 2005), erhöhter Verwundbarkeit der Neuronen gegenüber oxidativem Stress (Fukui and Moraes, 2007), Glutamat-Toxizität (Zeron et al., 2002), Caspase-Aktivierung (Hersch and Rosas, 2001), Induktion der pro-apoptischen Antwort (Hodges et al., 2006), sowie Dysfunktionen des proteasomalen Abbaus (Abb. 1.11) (Verhoef et al., 2002).

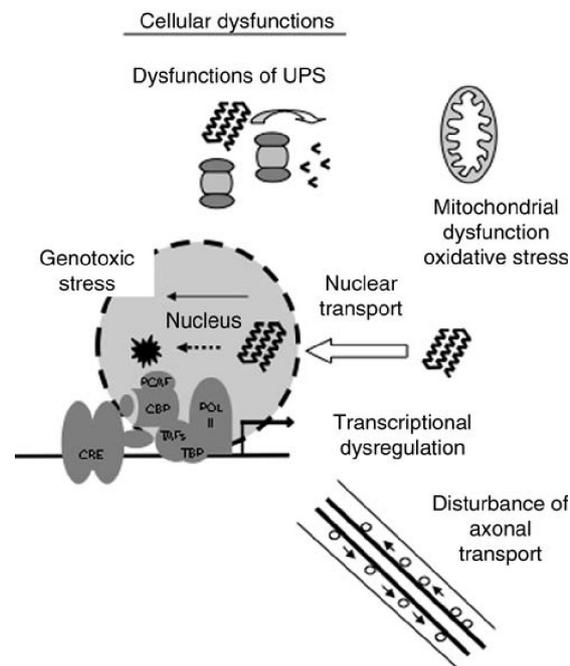


Abbildung 1.11: Darstellung einiger zellulärer Dysfunktionen, ausgelöst durch mutante Huntingtin-Proteine (mHtt). Hierbei kommt es zu Störungen der allgemeinen Gentranskription, Verschlechterung im axonalen Transport, mitochondrialen Störungen, sowie Dysfunktionen des proteasomalen Abbaus (UPS). Aus Takahashi et al. (2010).

Weiterhin kommt es durch die Konformationsänderungen im Protein zu einer pathologischen Transformation vom löslichen Monomer zum unlöslichen Oligomer, welche dann Proteinaggregate und sogenannte Einschlusskörperchen bilden (Muchowski, 2002; Shao and Diamond, 2007). Diese Einschlusskörperchen sind sowohl im Cytosol als auch im Nucleus lokalisiert und können im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. Diese bestehen aus amyloiden Fibrillen des mHtt-Proteins, molekularen Chaperonen, Ubiquitin und weiteren Proteinen des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) (Poirier et al., 2002). Hierdurch wurde vermutet, dass die gebildeten Proteinaggregate aus mHtt-Protein sehr widerstandsfähig gegen den Chaperon-vermittelten proteasomalen Abbau sind und den allgemeinen Proteinabbau über das UPS vermindern (Abb. 1.11) (Muchowski, 2002).

1.3.2.3 Degradation von Huntingtin-Proteinen

Die Bildung von Proteinaggregaten durch oligomerisierte polyglutaminreiche, N-terminale Proteinfragmente des mHtt-Proteins und der Bildung von Einschlusskörperchen mit Komponenten

des UPS (Hoffner et al., 2005) führt zu nachhaltigen Störungen des allgemeinen zellulären Proteinabbaus durch das UPS (Bence et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es durch eine pharmakologische Inhibition des Proteasoms zu einer Aggregation von mHtt-Proteinen kommt (Verhoef et al., 2002). Zudem wurde vermutet, dass das UPS Schwierigkeiten bei der Degradation von mHtt-Protein haben könnte und hierdurch die Funktionen des UPS beeinträchtigt werden (Venkatraman et al., 2004). Dies könnte damit zusammenhängen, dass die fehlgefalteten mHtt-Proteine nur schwer vom 19S-Proteasom entfaltet werden können, wodurch ihre proteasomale Degradation deutlich erschwert wird oder nicht stattfinden kann (Saunders et al., 2011). Diese Beeinträchtigungen wiederum führen zu einer vermehrten Bildung der Proteinaggregate und Einschlusskörperchen, wodurch es zu einer globalen verminderten Aktivität des UPS kommt (Finkbeiner and Mitra, 2008). Im Gegensatz hierzu konnte eine andere Studie zeigen, dass native und aberrante Htt-Proteine vom UPS normal degradiert werden können, das UPS aber mit der Proteinaggregation konkurriert (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Erhöht man künstlich die Halbwertszeit der aberranten Htt-Proteine, führt dies zu einer erhöhten Degradation und einer verringerten Aggregation der Proteine (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Weiterhin konnten Bennett und Kollegen zeigen, dass es durch Überexpression von proteasomalen Komponenten zu einem verbesserten Phänotyp in Mausmodellen der HD kommt (Bennett et al., 2007). Demzufolge könnte eine allgemeine Verbesserung des UPS zu einem verbesserten Abbau von aberranten mHtt-Proteinen führen, was zu einer Abmilderung der Proteinaggregation in der HD führen könnte (Krobitsch and Kazantsev, 2011).

Darüber hinaus spielen in der Degradation und Aggregation von mHtt-Proteinen noch weitere intrazelluläre Proteine eine entscheidende Rolle. So scheint das Adaptorprotein FE65 den Abbau von Htt-Proteinen zu regulieren, da es durch Bindung von FE65 zu einer verminderten Degradation und vermehrten Aggregation von mHtt-Proteinen kommt (Chow et al., 2012). Weiterhin regulieren auch molekulare Chaperone die Degradation von Htt-Proteinen. So konnte gezeigt werden, dass es durch die Interaktion der Ubiquitin-Ligasen CHIP mit HSP70 zu einem verbesserten Abbau von mHtt-Proteinen kommt (Jana et al., 2005). Darüber hinaus kann durch den Grad der Ubiquitinierung und Sumolysierung die Degradation der Htt-Proteine beeinflussen. Demzufolge resultiert eine erhöhte Ubiquitinierung von aberranten Proteinen in deren Degradation durch das UPS, wohingegen eine erhöhte Sumolysierung zu einer Stabilisierung und Aggregation der Proteine führt (Steffan et al., 2004; Terashima et al., 2002). Hierbei wird die Sumolysierung von Htt-Proteinen durch die Bindung des Guanin-bindenden Proteins Rhes beeinflusst, wodurch es zu einer

vermehrten Bildung von Htt-Oligomeren und abnormaler zellulärer Transkription kommt (Subramaniam et al., 2009).

Da es im normalen Metabolismus der Zellen zum Abbau von großen Mengen an aberranten Proteinen über das UPS als auch durch die Autophagie kommt (Myeku and Figueiredo-Pereira, 2011), wurde auch in der HD eine erhöhte Degradation von mHtt-Protein über den Mechanismus der Autophagie beschrieben (Menzies et al., 2010). Hierbei werden vor allem die gebildeten Oligomere und Aggregate der mHtt-Proteinen selektiv durch Autophagie-assoziierte Proteine erkannt und in Autophagolysosomen degradiert (Mizushima and Komatsu, 2011; Yang and Klionsky, 2010). Im Gegensatz hierzu konnten Studien von Li und Kollegen in Zellmodellen der HD zeigen, dass die Monomere der mHtt-Proteine bevorzugt über das UPS abgebaut werden und weniger über die Autophagie degradiert werden (Li et al., 2010).

1.3.2.4 Bildung von Huntingtin-Proteinoligomeren und Proteinaggregation

In vielen neurodegenerativen Erkrankungen gilt die Bildung der krankheitsverursachenden Proteine zu Proteinoligomeren als zytotoxischer Prozess, welcher zelluläre Signalwege und die Proteinhomöostasis negativ beeinflusst (Kayed et al., 2003; Walsh et al., 2002).

So kommt es in der HD durch pathologische Mutationen zur Destabilisierung und Fehlfaltung der polyglutaminen Proteindomäne (Lakhani et al., 2010), wodurch es zur Faltung dieser Proteinstruktur zu einem Beta-Faltblatt kommt und die Bildung löslicher Proteinoligomere mit Amyloid-ähnlichen Strukturen gefördert wird (Chen et al., 2002). Schließlich führen weitere Oligomerisierungen zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten und Einschlusskörperchen (Scherzinger et al., 1997; Kaye et al., 2003).

Interessanterweise scheinen die löslichen Oligomere in der Pathologie der HD eine wichtige Rolle zu spielen (Truant et al., 2008). So scheinen löslichen Oligomere aus mHtt-Proteinen eine größere Zytotoxizität zu vermitteln, als die Monomere oder Aggregate der Proteine (Takahashi et al., 2008). Andere Studien konnten zeigen, dass die gebildeten Proteinaggregate zelluläre Signalproteine rekrutieren, was zu einem Funktionsverlust dieser Proteine führt und dies Dysfunktionen in Neuronen auslösen kann (Davies et al., 1997; Nucifora et al., 2001). Weiterhin kommt es durch Bildung der Proteinaggregate zu einer Störung der Proteinhomöostasis durch Koaggregation von Proteinen des UPS (Verhoef et al., 2002). Schließlich hängt die Kinetik der Oligomerisierung nicht nur von der Konformation der mHtt-Proteine, sondern auch von deren

Degradationsgeschwindigkeit und somit der Menge der freien mtt-Proteine ab (Kaytor et al., 2004). Zudem kann das Proteasom nur lösliche Proteine verarbeiten, wodurch molekularen Chaperonen eine regulatorische Rolle durch Aufrechterhaltung der Proteinlöslichkeit zukommt (Bailey et al., 2002; Chafekar et al., 2012).

1.3.2.5 Therapieansätze in der HD

Die bisher einzige durch die „US Food and Drug Administration (FDA)“ anerkannte Therapie in der HD ist eine Behandlung der Patienten mit Tetrabenazine. Dieses Medikament unterdrückt ungewollte Bewegungen der Gliedmaßen, kann aber die Progression der HD nicht verlangsamen oder beenden (Poon et al., 2010).

Zu weiteren therapeutischen Ansätze gehört eine Veränderung der Expression von mHtt-Proteinen. So konnte in Mausmodellen der HD gezeigt werden, dass eine Unterdrückung der Expression von mHtt-Proteine zu einer Abmilderung bis hin zum Erlöschen der Erkrankung führt (Díaz-Hernández et al., 2005; Yamamoto et al., 2000). Neuere Studien schlagen eine Therapie mittels Interferenz-RNA (engl. „RNA interference“; RNAi) und antisense DNA-Oligonukleotiden vor, um einen selektiven Abbau bzw. Auslöschung der mRNA von mutanten *huntingtin*-Genen zu induzieren (Maxwell, 2009).

Darüber hinaus werden als therapeutische Ansätze eine pharmakologische Induktion sowie erhöhte Expression von molekularen Chaperonen diskutiert. Hierzu konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte HSP27-Expression die Zytotoxizität von polyglutaminen Proteinen verringern kann (Wytenbach et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass es durch eine pharmakologische Induktion von HSP70 zur Abnahme der Proteinaggregation von mHtt-Proteinen kommt und die Zytotoxizität der Aggregate gesenkt wird (Chafekar et al., 2012). Schließlich können molekulare Chaperone die aberranten Htt-Proteine länger löslich halten und ihre Degradation über das UPS fördern (Bailey et al., 2002; Pratt et al., 2010). Demzufolge gilt eine erhöhte Degradation von aberranten Htt-Proteinen durch eine induzierte, verbesserte Aktivität des UPS als therapeutische Möglichkeit in der HD. Hierzu konnte in einer Studie mit Mausmodellen der HD gezeigt werden, dass die Aktivierung des Proteasoms zu einem erhöhten Überleben neuronaler Zellen führt (Seo et al., 2007). Zudem wurde gezeigt, dass eine erhöhte proteasomale Aktivität zur schnelleren Degradation von toxischen mHtt-Monomeren führt und dies sich in einer verringerten Bildung von zytotoxischen Oligomeren und Aggregaten ausprägt (Li et al., 2011). Durch diese verminderte

Bildung von Proteinaggregaten werden weiterhin weniger Proteinen des UPS in diese Aggregate angesammelt, was somit zu einer verbesserten allgemeinen Proteindegradation führt und hierdurch die zelluläre Proteinhomöostasis stabilisiert wird (Krobitsch and Kazantsev, 2011; Finkbeiner and Mitra, 2008).

1.4 Ziel der Arbeit

Seit einigen Jahren werden sogenannten Phytopharmaka immer häufiger als eine natürliche Therapie bei neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt (Ramassamy, 2006). Hierbei wird vor allem der gut untersuchte *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb 761 in der Therapie der Demenz der Alzheimer-Krankheit (AD) eingesetzt, da dieser Extrakt nur geringe bekannte Nebenwirkungen aufweist (Mahadevan and Park, 2008). Durch die vielen verschiedenen Inhaltsstoffe von EGb 761 kommt es zu multiplen Wirkungen auf verschiedene protektive intrazelluläre Mechanismen, wodurch sich eventuelle therapeutische Wirkungen bei Erkrankungen mit Störungen der zellulären Homöostasis herleiten lassen (Mahadevan and Park, 2008; Bidon et al., 2009). So konnte in vielen Studien zur AD gezeigt werden, dass EGb 761 einen positiven Effekt auf die Aggregation von A β -Peptiden ausübt (Luo et al., 2002), wodurch die Vermutung nahe liegt, dass hierbei die Wirkung eventuell auf einem verbesserten Abbau der A β -Peptide beruht, somit deren Aggregation verhindert wird (Paul, 2008). Anhand dieser beschriebenen Wirkung auf die Proteinaggregation in der AD konnte auch ein möglicher therapeutischer Effekt von EGb 761 in der Huntington-Krankheit (HD) postuliert werden (Ross and Poirier, 2004).

In der HD führen Mutationen im Exon 1 des *huntingtin*-Gens zu pathologischen Proteinverlängerungen durch Glutamin-Wiederholungen (polyQ) im N-Terminus des kodierten Huntingtin-Proteins (Htt) (Goldberg et al., 1993), wodurch es zu Fehlfaltungen und Aggregation der Proteine kommt (Lakhani et al., 2010; Wetzell, 2012). Neben der Proteinaggregation kommt es in der HD auch zu einem reduzierten proteasomalen Abbau von aberranten Htt-Proteinen (Bence et al., 2001), wodurch vermutet wird, dass eine gesteigerte Proteasom-Aktivität von therapeutischem Nutzen sein könnte (Seo et al., 2007).

Demzufolge sollte in der vorliegenden Arbeit zuerst eine mögliche Wirkung von EGb 761 auf die enzymatische Aktivität des Proteasoms sowie auf die proteasomale Proteindegradation analysiert werden. Darauf folgend sollte die Wirkung von EGb 761 in zellulären Modellen der HD weiter untersucht werden, da bekannt war, dass es in diesen Modellen zu einer pathologischen Veränderung in der Proteasom-Aktivität kommt (Davies et al., 2007). Hierzu sollten Fusionsproteine aus GFP und dem Exon 1 des Huntingtin-Protein, mit verschiedenen Längen an Glutamin-Wiederholungen (polyQ-Protein), in HEK293-Zellen exprimiert werden (Krobitsch and Lindquist, 2000), wobei insbesondere die pathologisch verlängerten polyQ-Proteine im Mittelpunkt standen. Anhand dieser Analysen sollte im Weiteren der Einfluss von EGb 761 auf die Aggregation von pathologisch veränderten polyQ-Proteinen näher untersucht werden. Dafür sollte die Bildung

von polyQ-Proteinaggregaten in HEK293-Zellen, mittels transienter Expressionen der polyQ-Fusionsproteine, analysiert werden (Krobitsch and Lindquist, 2000). Hierbei sollte die Wirkung von EGb 761 auf die Aggregationstendenz der polyQ-Proteine bestimmt werden. Zudem sollte durch eine pharmakologische Proteasom-Inhibition die EGb 761-Wirkung auf den proteasomalen Abbau der polyQ-Proteine näher analysiert werden und ein Zusammenhang mit der Proteinaggregation hergestellt werden (Davies et al., 2007).

Darüber hinaus sollte die physiologische Relevanz der Ergebnisse in erweiterten Modellen der HD *in vitro* und *in vivo* evaluiert werden, um einen möglichen therapeutischen Effekt von EGb 761 in der HD in höheren Organismen zu testen. Für die *in vitro* Untersuchungen sollten primäre humane Fibroblasten verwendet werden, da in diesen Zellen auch altersbedingte Effekte in der Proteindegradation auftreten (Gamerding et al., 2009). Die Erweiterung der Untersuchungen *in vivo* sollte mittels transgenen *C. elegans*-Stämmen durchgeführt werden, da diese bezüglich ihrer auftretenden Phänotypen, in Korrelation mit der polyQ-Proteinaggregation, gut charakterisiert waren (Morley et al., 2002).

2 Material und Methode

2.1 Materialien

2.1.1 Zell- und Tiermodelle

Modell	Bezeichnung	Bezugsquelle
HEK293T	Human embryonic kidney cells 293	American Type Culture Collection
d2GFP-HEK	HEK293T-Zellen mit stabil exprimiertem d2GFP-Protein	Martin Gamerdinger (Gamerdinger et al., 2009)
IMR-90	Humane Fibroblasten aus Lungengewebe	Coriell Institute for Medical Research, Camden (USA)
<i>C. elegans</i>	Transgene Stämme AM134 und AM141	Caenorhabditis Genetics Center, Minnesota, USA

2.1.2 Geräte

Name	Bezugsquelle
Absaugpumpe VacuSafe comfort	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Amaxa Nucleofector I	Lonza Cologne GmbH, Köln
Aufsatzkamera Spot RT CCD Camera	Diagnostic Instruments; Sterling Heights (USA)
Brutschrank	Queue; Nunc Intermed GmbH, Wiesbaden
Brutschrank	Kühn & Bayer Laboreinrichtungen, Nidderau
CO ₂ -Inkubator CB 210	Binder GmbH, Tuttlingen
Elektrophoresegerät PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluoreszenz-Mikroskop Axiophot	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Fluoreszenz-Stereomikroskop MZ10F	Leica Camera AG, Solms
FujiFilm Intelligent Dark Box	FujiFilm, Düsseldorf
Geldokumentationssystem	Intas®UV-Systeme, Göttingen
Gelbild-Drucker P91D	Mitsubishi, Tokyo (Japan)
Heizblockmagnetrührer MR 3000	Heidolph Instruments, Schwabach

iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubatorschüttler Certomat®	HK Sartorius AG, Göttingen
Invers-Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Invers-Mikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
Netzgerät	Biometra, Göttingen
Neubauer-Kammer	Paul Marienfeld GmbH&Co KG, Königshofen
Kryobox (Nalgene Cryo 1°C freezing container)	Nalgene Labware, Dänemark
Kryogefäß	Nunc Intermed GmbH, Wiesbaden
pH Meter CG 825 SI	Analytics GmbH (SCHOTT AG), Mainz
Photometer Multiscan RC	Thermo Lab Systems, Franklin (MA, USA)
Potter-Elvehjem Apparatur Typ 853202 B.	Braun Melsungen AG, Melsungen
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Schallgerät, Ultrasonic Cell Disruptor	KONTES, Vineland (NJ, USA)
Schüttler	INFORS GmbH, Einsbach
Schüttler Denley MaxiMix	Denley Instruments Ltd., Colchester (UK)
Sicherheitswerkbank	Slee, Mainz
Sicherheitswerkbank MH-100 Telstar	Life Science Solutions, Frankfurt
Sicherheitswerkbank SterilGARD® III Advance	Labotect Labor-Technik GmbH, Göttingen
Stereomikroskop	Olympus, Hamburg
Stereomikroskop Leica DM IRB	Leica Camera AG, Solms
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Thermocycler T-Gradient 96T1	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
TransferMan NK2 + Femtojet	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman Coulter, Fullerton (CA, USA)
UV-Lampe NU-4KL	Benda, Wiesloch
UV/Vis Spectrophotometer DU® 800	Beckman Coulter, Fullerton (CA, USA)
UV-Tisch	Renner GmbH, Dannstadt
UV-Transilluminator Intas®	UV-Systeme, Göttingen
Varioklav H + P	Labortechnik GmbH, Oberschleissheim
VICTOR3 V Multilabel Counter 1420	PerkinElmer LAS GmbH, Jügesheim
Vortexer K MS 1 Minishaker IKA®	Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage TE153S	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge EBA12	Hettich, Tuttlingen

Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Fresco 17	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.1.3 Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anderweitig angegeben, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Schnellendorf) bezogen. Zellkulturmedien und Zellkulturpuffer wurden ebenfalls von Invitrogen bzw. Gibco bezogen. Die verwendeten Proteasom- und Lysosom-Inhibitoren wurden von Alexis Pharma bezogen. Der verwendete *Ginkgo Biloba*-Extrakt EGb 761(®) wurde von der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG (Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Materialien, Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und bei Bedarf autoklaviert bzw. steril filtriert.

2.1.4.1 Lösungen und Puffer der Proteinbiochemie

Bezeichnung	Zusammensetzung
1 x Lysispuffer	60 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 % (w/v) SDS 10 % (w/v) Saccharose 5 µg/ml Aprotinin 10 mM PMSF 1 % (v/v) Protease-Inhibitor-Cocktail 1 % (v/v) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail
4x Probenpuffer	200 mM Tris-HCl (pH 6,8) 24 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol

PAA-Gelpuffer (3,5 fach)	1,25 M bis-Tris (pH 6,5 - 6,8 mit HCL)
PAA-Gel / Sammelgel für 1 mm Gel	3,22 ml H ₂ O 1,5 ml PAA-Gelpuffer 525 µl Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 31 µl APS (10 %) 15 µl TEMED
PAA-Gel /Trenngel für 1 mm Gel	2,43 ml H ₂ O 1,5 ml PAA-Gelpuffer 1,32 ml Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 37 µl APS (10 %) 10 µl TEMED
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
1x Transferpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
1x Ponceau S	0,05 % (w/v) Ponceau S 1 % (w/v) Trichloressigsäure
10x PBS	1,3 M NaCl 27 mM KCl 70 mM NaH ₂ PO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ pH wurde auf 7,4 eingestellt.
Filterretardierung-Assaypuffer	1x PBS 50 µM DTT 2 % SDS
Waschpuffer (PBS-T)	1x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20
Blockierungspuffer	1x PBS-T 5 % (w/v) Trockenmilchpulver
Primär-Antikörperlösung	1x PBS-T 0,02 % Natriumazid

	1:1000 Antikörper
Sekundär-Antikörperlösung	1x PBS-T 1:100 0 Antikörper
Entwickler-Lösung (Luminol-Lösung) für einen Ansatz	- Lösung A (1 ml): 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6) 0,025 % Luminol - Lösung B (100 µl): 0,11 % para-Hydroxycommarinsäure in DMSO - Lösung C (1 µl): 35 % H ₂ O ₂

2.1.4.2 Lösungen und Puffer der Molekularbiologie

Bezeichnung	Zusammensetzung
1x TAE Puffer (Agarosegel-Puffer)	44,5 mM Tris (pH 7,5) 45,5 mM Borsäure 1 mM EDTA
6x Auftragspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 % (v/v) Ficoll 0,006 % Bromphenolblau
LB-Medium (Luria Broth)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefeextrakt 10 g/l NaCl
LB-Agarplatten	LB-Medium 15 g/l Bacto-Agar
Die LB-Lösungen wurde nach der Herstellung autoklaviert und die entsprechenden Antibiotika vor Verwendung hinzugefügt: Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (50 µg/ml)	

2.1.4.3 Lösungen und Puffer der Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kulturmedium	Dulbecco`s modified Eagle medium (DMEM) 1 mM Pyruvat

	10 % inaktives FCS 100 µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin
Kulturmedium, phenolrot-frei	Dulbecco`s modified Eagle medium (DMEM) HEPES 1 mM Pyruvat 10 % inaktives FCS 100 µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin
Einfriermedium	Kulturmedium 10 % DMSO
Elektroporationspuffer	25 % inaktiviertes FCS 135 mM KCl 0,2 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA 10 mM HEPES Der fertige Puffer wurde mit einem 0,2 µm Filter steril filtiert.
Lösung zur Bestimmung der Lebendzellzahl	50 % Kulturmedium 50 % Trypanblau (Sigma-Aldrich)

2.1.4.4 Lösungen und Puffer der Nematodenzucht

Bezeichnung	Zusammensetzung
1 M PPB (pH 6,0)	0,72 M KH ₂ PO ₄ 0,28 M K ₂ HPO ₄ Der pH 6,0 mit 10 N KOH eingestellt
NGM-Platten	0,3 % (w/v) NaCl 0,25 % (w/v) Bacto-Pepton 1,6 % (w/v) Bacto-Agar Nach autoklavieren (bei 65 °C) Zusatz von:

	25 mM PPB (pH 6,0) 21 mM CaCl 1 mM MgSO ₄ 200 µg/ml Uracil 500 mg/ml Cholesterol 100 mg/ml Streptomycin
Volumen der NGM-Lösungen für Kulturschalen	35 mm Kulturschale: 4,5 ml NGM. 60 mm Kulturschale: 11,5 ml NGM
1x M9-Puffer	0,6 % (w/v) Na ₂ HPO ₄ 0,3 % (w/v) KH ₂ PO ₄ 0,05 % (w/v) NaCl 0,1 % (w/v) NH ₄ Cl
Die NGM-Platten wurden mindestens einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss mit der bakteriellen Starterkultur versehen.	

2.1.4.5 Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies und Verdünnungsfaktor	Bezugsquelle
Primärantikörper für Immunoblots		
Anti-eGFP, monoklonal	Maus, 1:1000	Sigma-Aldich, Schellendorf
Anti-Tubulin, monoklonal	Maus, 1:3000	Sigma-Aldich, Schellendorf
Anti-20S Proteasome Subunit α1 (H-95), polyklonal	Hase, 1:1000	Santa Cruz Biotechnology (USA).
Anti-Polyubiquitin, polyklonal	Hase, 1:1000	Dako (USA).
Sekundärantikörper für Immunoblots		
Anti-Maus-HRP	Esel, 1:10000	Jackson ImmunoResearch, USA
Anti-Kaninchen-HRP	Esel, 1:10000	Jackson ImmunoResearch, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Kultivierung klonaler Zelllinien (HEK293, d2GFP-HEK)

Im Allgemeinen wurden HEK293-Zellen in einem Kulturmedium (Dulbecco's modified Eagle medium; DMEM) mit 1 mM Pyruvat, 10 % inaktivem FCS (Fötale Kälberserum), 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin) in geeigneten Zellkulturschalen im Brutschrank (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) kultiviert.

Zur Aufrechterhaltung der Zellkultur wurden subkonfluente Kulturen regelmäßig passagiert. Hierzu wurden die Zellen durch Trypsinierung (1x Trypsin/EDTA) von den Schalen gelöst und mittels Zentrifugation pelletiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und anteilig in neue Kulturschalen pipettiert. Nach weiteren 24 h wurde das vorhandene Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt.

2.2.1.2 Kultivierung von humanen Fibroblasten (IMR-90)

Die Kultivierung der IMR-90-Zellen erfolgte entsprechend der Kultivierung klonaler Zelllinien, wobei dem Kulturmedium noch 1 % nicht-essentielle Aminosäuren hinzugefügt wurden.

Da humane Fibroblasten als Modell der replikativen Seneszenz gelten, unterlaufen sie nur einer gewissen Anzahl von Zellteilungen bis zum Erreichen der Postmitose (Hayflick and Moorhead, 1961). Diese Eigenschaft musste bei der Aufrechterhaltung der IMR-90-Kulturen beachtet werden. Somit wurde bei jeder Passage die Gesamtzahl der Zellteilungen ermittelt, um die fortschreitende Seneszenz zu dokumentieren.

2.2.1.3 Bestimmung der Lebenszellzahl

Die Berechnung der Lebendzellzahl erfolgte im Zuge der Aufrechterhaltung der benutzten Zellkulturen. Hierzu wurden Zellsuspensionen mit Trypanblau gemischt (10µl Zellsuspension : 10 µl Trypanblau), das Gemisch in eine Neubauer-Kammer pipettiert (10 µl Gemisch) und die Anzahl der Zellen bestimmt. Durch die Färbung mit Trypanblau ist es möglich, tote Zellen von lebenden

Zellen zu differenzieren, da der Farbstoff nur in tote Zellen diffundieren kann. Die Ermittlung der Gesamtanzahl lebender Zellen berechnet sich wie folgt: Der Durchschnitt der lebenden Zellen pro Großquadrat (Gesamtzahl aller Zellen / 4) wird mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert (Zellzahl x 2) und auf 1 ml Zellsuspension extrapoliert (Ergebnis x 10^4).

2.2.1.4 Bestimmung von Populationsverdopplungen (PD)

Zur Dokumentation der fortschreitenden Seneszenz von IMR-90-Zellen, wurden bei jeder Passage die Populationsverdopplungen (PD) bestimmt. Hierzu wurde die Lebenszellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.1.3) und mit der Anzahl der ausplattierten Zellen verrechnet. Da man von einer exponentiellen Zellteilung ausgehen kann, berechnet sich die PD wie folgt:

$$(\log(\text{gezählte Zellen}) - \log(\text{ausplattierte Zellen})) / \log(2)$$

Die berechnete PD wurde dokumentiert und diente zur Einschätzung der zellulären Seneszenz.

2.2.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung dient der langfristigen Lagerung und Erhaltung von Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C . Hierzu wurden subkonfluente Zellkulturen mittels Trypsinierung von den Kulturschalen gelöst und mittels Zentrifugation pelletiert. Das entstandene Zellpellet wurde in einem Kulturmedium, mit Zusatz von 10 % DMSO, resuspendiert und in ein spezielles Kryogefäß übertragen. Das langsame Einfrieren der Kryogefäße erfolgte in einer mit 2-Propanol gefüllten Kryobox bei -80 °C , mit anschließender Lagerung in flüssigem Stickstoff.

2.2.1.6 Transiente Transfektionen

Zur Einschleusung von Fremd-DNA (Plasmid) in Wirtssysteme (z.B. Zellkulturen) stehen verschiedene chemische, physikalische und virale Transfektionsmethoden zur Verfügung, welche zu transienten und stabilen Transfektion führen. Das in dieser Arbeit angewendete Verfahren der physikalische Transfektion mittels Elektroporation beruht auf dem Anlegen eines elektrischen Feldes in Suspensionskulturen, wodurch die Membranen der Zellen kurzzeitig für Makromoleküle durchlässig werden, was zu einer hohen Ausbeute an transient transfizierten Zellen führt.

Zur Durchführung der transienten Transfektionen wurden die verwendeten Zellen (HEK293T und

IMR-90) erst von den Kulturschalen trypsiniert und durch Zentrifugation pelletiert. Das entstandene Zellpellet wurden dann in 1 ml Elektroporationspuffer resuspendiert und die Lebenszellzahl ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.1.3). Die benötigte Anzahl an Zellen wurden dann der Suspension entnommen und in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Es folgte die Zugabe der entsprechenden Menge Plasmid (20 µg Plasmid auf 10^6 Zellen) und das Auffüllen der Küvette mit Elektroporationspuffer zu einem Endvolumen von 400 µl. Die Elektroporation des Ansatzes erfolgte dann in einen Elektroporator (Nucleofector I, Amaxa), unter Verwendung des Programms U-24. Nach Durchführung der Elektroporation erfolgte eine Regenerationszeit von 5 min, um das Schließen der Zellmembranen zu ermöglichen. Die transfizierten Zellen wurden anschließend der Küvette entnommen, in dem benötigten Volumen an Zellkulturmedium resuspendiert und in Kulturschalen verteilt. Nach einer Kultivierungszeit von 24 h wurde die transfizierten Zellen unter einem Mikroskop kontrolliert und das Kulturmedium gewechselt.

2.2.2 Proteinbiochemie

2.2.2.1 Herstellung von Proteinpräparaten

Zur Herstellung von Proteinpräparaten der zu untersuchenden Zellen, wurden ganze Kulturen mit kaltem 1x PBS gewaschen und mit 50µl 1x Lysispuffer versetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen im Lysispuffer gelöst und das Zellysate in ein 1 ml Reaktionsgefäß übertragen. Nach Sonifikation der Lysate (10-Hübe bei 60 Hz) erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.2.2.2 Quantifizierung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der Zellysate wurde nach Herstellerangaben mittels BCA-Proteinassay (BCA ProteinAssay, Thermo Scientific) ermittelt. Hierzu wurden 5µl der Proteinproben in 45µl Wasser gelöst und mit 1 ml BCA-Reagenz versetzt. Zur Berechnung des Proteingehaltes wurde parallel eine Standardreihe aus definiertem Gehalt an Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt.

Es folgte eine Inkubation der Proben für 30 min bei 60 °C im Wasserbad, mit anschließender photometrischen Messung der Proben bei 562 nm. Mit Hilfe der Standardreihe, sowie dem Verdünnungsfaktor (210x), konnte der Proteingehalt der Proben pro µl bestimmt werden.

2.2.2.3 Immunoblotting

2.2.2.3.1 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteinpräparate nach ihrem Molekulargewicht, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit 12 %-igen Polyacrylamidgele (PAA-Gele) durchgeführt. Hierzu wurden die 20 µg der Proteinlysate mit 1x Probenpuffer versehen und für 3 min bei 99 °C denaturiert. Nach Abkühlung der Proben wurden diese auf das PAA-Gel aufgetragen, sowie einem Proteinstandardmarker (Prestained Marker, peqGold, PeqLab) zur späteren Bestimmung der Molekulargewichte. Anschließend wurde die Elektrophorese in einem 1x MES-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) bei 80 V für das Sammelgel, sowie 160 V für das Trenngel durchgeführt.

2.2.2.3.2 Proteintransfer (Western-Blotting)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im PAA-Gel erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran in einem Tank-Blotting-System (BioRad). Hierzu wurde das PAA-Gel auf die Nitrocellulosemembran gelegt und mit Filterpapieren sowie Schaumstoff umhüllt. Dieses „Sandwich“ wurde dann in einer Transfereinheit fixiert und in das Tank-Blotting-System (gefüllt mit 1x Transferpuffer) überführt. Dann erfolgte der Proteintransfer über Nacht bei 30 Volt. Nach Beendigung des Transfers wurde der Proteinübertrag kontrolliert, indem die Nitrocellulosemembran mittels Ponceau S-Lösung gefärbt wurde und anschließend zur vollständigen Entfärbung mehrfach mit dH₂O gewaschen. Abschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen durch 30 - 60 min Inkubation der Membran in einem Blockierungspuffer.

2.2.2.3.3 Immundetektion der Proteine

Zur Detektion einzelner Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurde diese über Nacht (4 °C) mit einem primären Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal mit PBS-T gewaschen, um Antikörperreste zu entfernen und einer anschließenden Inkubation für 1 - 2 h mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Danach wurde der Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen der Membran entfernt. Anschließend wurde die Membran mit einer selbst angefertigten ECL (engl. „Enhanced chemiluminescence“)-Lösung

benetzt und die Proteine durch eine Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Hierzu wurden Lichtquanten, welche durch die Katalyse von Luminol durch die Peroxidase des Sekundärantikörper entstanden, in einem „Luminescent Image Analyser“ (Fuji Las- 3000, Dark Box) detektiert und digitale Bilder der Immunoblots gespeichert. Anhand der erzeugten Bilder wurden die Intensitäten der verschiedenen Proteinbanden über die Software Image J (NIH, USA) quantifiziert. Für die bessere Analyse bzw. zur besseren Darstellung wurden die Bilder mit der Software GIMP (GNU General Public License) bearbeitet.

2.2.2.3.4 Filterretardierungs-Test (Filter Retardation Assay)

Zur quantitativen Analyse von aggregierten Proteinen können Proteinpräparationen mit Hilfe des Filterretardierungs-Test analysiert werden (Scherzinger et al., 1997). Hierbei werden Zellysate durch eine Filtermembran gesaugt, wobei nur hochmolekulare Proteine (wie zum Beispiel Proteinaggregate) an dieser Membran haften bleiben (Retardierung), während niedermolekulare Proteine (lösliche Proteine) durch die Membran gesaugt werden.

Zur Analyse der Proteinpräparationen wurden 10 µg Proteinlysate in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit 100 µl Filterretardierungs-Testpuffer aufgefüllt. Die Proben wurden nun für 7 min, bei 99 °C und 650 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert, sowie abschließend auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Zur Durchführung des Filterretardierungs-Test wurde das Dot-Blot System Minifold I (Schleicher&Schuell) verwendet. Zur Versuchsdurchführung wurden jeweils eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm) und ein Filterpapier in 1x PBS-T eingelegt und anschließend zwischen beide Platten des Minifold I Systems gelegt. Nach dem Zusammensetzen des Systems wurde ein Vakuum angelegt und die Proteinproben in die einzelnen Löcher des Systems pipettiert. Nach dem Absaugen der Proben wurden die Löcher mit 200 µl 1x PBS-T gespült und für weitere 20 min abgesaugt. Die Membranen wurden dann für 30 min in einem Blockierungspuffer inkubiert, mehrmals mit 1x PBS-T gewaschen und über Nacht (4 °C) mit primärem Antikörper inkubiert. Die weitere Analyse wurde abschließend, wie in Abschnitt 2.2.2.3.3 (Immundetektion der Proteine) beschrieben, mittels Sekundärantikörper durchgeführt.

2.2.3 Mikroskopische Analyse der Zelllinien

Zur mikroskopischen Fluoreszenzanalyse der exprimierten Proteine wurden Zellen auf poly-L-

Ornithin-beschichteten Deckgläschen unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert. Bei geringer Konfluenz wurden die Zellen zuerst mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) verwendet, da er selektiv in der kleinen Furche der DNA bindet und somit repräsentativ die DNA des Zellkerns darstellt. Hierzu wurde das PFA von den Kulturen entfernt und die Zellen anschließend für 15 min bei Raumtemperatur mit entsprechenden Mengen DAPI (1 µg/ml in 1x PBS) inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundenes DAPI durch zweimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt. Mit Hilfe einer Pinzette wurden nun die Deckgläschen auf einen mit Polyvinylalkohol-behandelten (Polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO, Fulka Analytical) Objektträger transferiert und mit Nagellack versiegelt. Nach einer Trocknungszeit von 24 h konnten die Präparate unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) analysiert und ausgewertet werden. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden die Extinktion-/Emissionsfilterpaare 360/460 nm für DAPI und 490/510 nm für GFP benutzt.

Anhand der erzeugten Bilder wurden über die Software Image J (NIH, USA) die Intensitäten und Anzahl der polyQ-Aggregate quantifiziert. Für die bessere Analyse bzw. zur besseren Darstellung wurden die Bilder mit der Software GIMP (GNU General Public License) bearbeitet. Zur graphischen Auswertung der GFP-Fluoreszenz von Zellen mit Proteinaggregaten wurden folgende Berechnungen durchgeführt: Die Anzahl an Aggregat-tragenden Zellen wurde ermittelt, indem die Anzahl aller DAPI-positiven Zellen zu Zellen mit fluoreszenten polyQ-Aggregaten berechnet wurde und in Prozent (%) dargestellt wurde. Die Berechnung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Proteinaggregate wurde berechnet, indem die durchschnittliche Intensität (I) mit der Aggregatgröße (Pixel) multipliziert wurde und sich somit die relative Fluoreszenzintensität ($I \cdot \text{Pixel}$) der Aggregate ergab.

2.2.4 Sulforhodamin B-Test (SRB-Test; SRB-Assay)

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wird sehr häufig der auf dem gelben Tetrazoliumsalz basierende MTT-Test genutzt. Hierbei beruht die Nachweisreaktion auf der Reduktion von MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu Formazan, wodurch dieser Test durch reduzierend wirkende Substanzen verfälscht werden kann.

Als Alternative zur Bestimmung der Zytotoxizität gilt der kolorimetrische Sulforhodamin B-Test. Dieser Test beruht auf dem anionischen, wasserlöslichen Farbstoff Sulforhodamin B (SRB),

welcher bei saurem pH-Wert an basischen Aminosäuren bindet und somit die Messung der Absorption von gebundenem SRB zur Zellzahl korreliert (Vichai and Kirtikara, 2006).

Die Durchführung des SRB-Test erfolgte nach der Beschreibung von Vichai und Kirtikara (Vichai and Kirtikara, 2006). Hierzu wurden Zellen in eine durchsichtige 96-Well Zellkulturschale ausplattiert und für 24 h kultiviert, anschließend das vorhandene Zellkulturmedium durch Medium mit verschiedenen Konzentrationen von EGb 761 ersetzt und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Anschließend wurde das vorhandene Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) fixiert. Nach Entfernung der TCA wurden die Platten zweimal mit dH₂O gewaschen und bei RT getrocknet. Die entgültige Färbung der Zellen erfolgte durch Inkubation mit einer 0.057 % SRB-Lösung für 15 min bei RT. Danach wurde nicht gebundenes SRB durch einmaliges Waschen mit Essigsäure (1 % w/v) entfernt und die Zellkulturschalen erneut bei RT getrocknet. Schließlich erfolgte eine weitere Inkubation mit 10mM Tris-Base für 30 min bei RT, wodurch das gebundene SRB gelöst wurde. Abschließend erfolgte die Messung des SRB-Gehalts in einem Mikroplate-Reader (ThermoLabsystems, Multiskan RC) bei einer Absorption von 560 nm.

2.2.5 Messung der d2GFP-Degradation (d2GFP-Degradationstest)

Zur Bestimmung der proteasomalen Aktivität kann die Messung der Degradation des d2GFP-Proteins genutzt werden (Andreatta et al., 2001). Das d2GFP-Protein ist ein GFP-Protein, welches eine PEST-Sequenz trägt, wodurch die Halbwertszeit des Proteins auf ca. 2 h reduziert wird (Li et al., 1998). Zudem werden Proteine mit einer PEST-Sequenz direkt von 20S-Proteasom erkannt und degradiert, wodurch eine Ubiquitinierung des Proteins entfällt (Park et al., 2005).

Zur Versuchsdurchführung wurden HEK293A-Zellen mit einer dauerhaften Expression von d2GFP-Proteinen (d2GFP-HEK) benutzt (Gamerdinger et al., 2009). Zur Analyse der d2GFP-Degradation wurden d2GFP-HEK-Zellen in schwarze, poly-L-Ornithin-beschichtete 96-Well Zellkulturschalen ausplattiert. Diese 96-Well Zellkulturschalen wiesen einen durchsichtigen Boden auf, wodurch eine visuelle Kontrolle der Zellen möglich war. Nach einer Kultivierung der Zellen für 24 h, wurde das vorhandene Zellkulturmedium durch ein phenolrot-freies Medium mit Zusatz von 150 µg/ml EGb 761 bzw. 0,1 % DMSO ersetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h, wurde das vorhandene Zellkulturmedium abgesaugt und durch frisches phenolrot-freies Medium ersetzt. Zur Analyse der proteasomalen d2GFP-Degradation wurden dem Medium entweder ein Proteasom-Inhibitor (MG132, 10µM) oder ein

Proteinbiosynthese-Inhibitor (Cycloheximid, 500nM) bzw. 0,1 % DMSO (als Kontrolle) hinzugefügt und die Zellen für mindestens 2 h weiter inkubiert. Die Fluoreszenz der vorhandenen d2GFP-Proteine wurde abschließend direkt bzw. in 30 min Intervallen (37 °C) in einem Fluorimeter (Victor3V Multilabel counter, Perkin Elmer) mit den Extinktions- /Emissionsfiltern 485 nm / 535 nm gemessen. Durch Verrechnung der erhaltenen Fluoreszenz von Inhibitor-behandelten Zellen mit der Fluoreszenz von unbehandelten Zellen, konnte die proteasomale Degradation von d2GFP-Proteinen ermittelt und dargestellt werden.

2.2.6 Messungen der enzymatischen Proteasom-Aktivität (SUC-AMC-Test)

Die proteolytische Aktivität (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) des 20S Proteasoms kann mit Hilfe des fluorogenen Markerpeptids Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Suc-LLVY-AMC; Enzo Life Sciences) gemessen werden (Liggett et al., 2010). Dieses Proteasom-spezifische Substrat besteht aus einem Peptid mit vier Aminosäuren (Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin) und einem C-terminal Fluorochrom, dem 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC). Durch die proteolytische Hydrolyse des Peptids kommt es zur Abspaltung des AMC-Rest, wodurch der AMC-Rest erst Fluoreszenzeigenschaften bekommt (Liggett et al., 2010). Diese entstehende AMC-Fluoreszenz kann als Maßstab der enzymatischen Proteasom-Aktivität genutzt werden, vor allem, da die Hydrolyse des Peptids von weiteren Faktoren, wie Ubiquitinierung oder Entfaltungsprozesse unabhängig ist.

Zur Untersuchung der Proteasom-Aktivität wurden die Versuche „*in vivo*“ durchgeführt (Gil-Parrado et al., 2002), da die Aufreinigung des Proteasom zur Verfälschung von proteasomalen Effekten, wie zum Beispiel durch schwere Proteine bzw. Proteinaggregate geführt hätten (Giguere and Schnellmann, 2008). Zur Versuchsdurchführung wurden native oder transfizierte HEK293T (siehe Abschnitt 2.2.1.6, Transiente Transfektionen) benutzt und in schwarze, poly-L-Ornithin-beschichtete 96-Well Zellkulturschalen ausplattiert. Diese 96-Well Zellkulturschalen wiesen einen durchsichtigen Boden auf, wodurch eine visuelle Kontrolle der Zellen möglich war. Nach einer Kultivierung von 24 h wurde das vorhandene Kulturmedium durch phenolrot-freies Medium, supplementiert mit 150 µg/ml EGb 761 oder 0,1 % DMSO ersetzt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Zur Messung der Proteasom-Aktivität wurde das vorhandene Kulturmedium durch frisches phenolrot-freies Medium ersetzt, welchem SUC-LLVY-AMC (100 µM) und ein Proteasom-Inhibitor (MG132, 25 µM) bzw. 0,1 %DMSO (als Kontrolle) zugesetzt wurde. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 60 min wurden die Zellen unter Zusatz von 50 µl Reporter-Lysis-Puffer

(Promega, USA) pro Well lysiert und der Umsatz von SUC-LLVY-AMC gemessen. Hierzu erfolgte die Messung der AMC-Fluoreszenz im Fluorimeter (Victor3V Multilabel counter, Perkin Elmer) mit den Extinktion- /Emissionsfiltern 380 nm / 460 nm. Zur Berechnung der spezifischen proteasomalen Enzymaktivität wurden die Fluoreszenz von Inhibitor-behandelten Proben mit der Fluoreszenz von unbehandelten Proben verrechnet und dargestellt.

2.2.7 Molekularbiologische Methoden

2.2.7.1 Enzyme und Kits für molekularbiologische Arbeiten

Enzyme / Kits	Bezugsquelle
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Finnland
Omniscript Reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden
PCR clean-up Gel Extraktion II-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript Reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
Alle verwendeten Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt

2.2.7.2 Herstellung der verwendeten Plasmide

Grundlegend wurden alle verwendeten Plasmide mittels InFusion-Technik der Firma Clontech nach Herstellerangaben hergestellt.

Zur Analyse der Huntingtin-Proteine wurden verschiedene Vektoren bezogen (Bezugsquelle: Addgene), welche zur Expression des Exon 1 aus dem Huntingtin-Protein (HttEx1) führen und durch Krobitch und Lindquist beschrieben und hergestellt wurden (Krobitch and Lindquist, 2000). Da diese Vektoren eine Hefe-spezifische Promotersequenz tragen, mussten die kodierenden Sequenzen für das Huntingtin-Protein in einen Vektor mit Säugetier-spezifischen Promoter kloniert werden. Hierzu wurde die kodierenden Sequenzen für verschiedene HttEx1-Proteine aus den Vektoren p426-25Q-GPD, p426-Q46-GPD und p426-103Q-GPD (Bezugsquelle: Addgene) amplifiziert und in den Vektor peGFP-N1 (Clontech) kloniert. Hieraus ergaben sich Plasmide, welche für die Expression verschieden langer polyglutaminer HttEx1-Proteine kodierten: htt_Q25

mit 25 Glutamin-Wiederholungen, htt_Q46 mit 46 Glutamin-Wiederholungen und htt_Q103 mit 103 Glutamin-Wiederholungen im Protein.

2.2.7.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der spezifischen Nukleinsäuresequenzen wurde mittels einer „Phusion High-Fidelity“ DNA-Polymerase (Finnzymes) und Polymerase-Kettenreaktion (engl. „Polymerase Chain Reaction“; PCR) erreicht. Zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen wurden folgende Primerpaare benutzt:

Primersequenzen für die PCR	
Forward-Primer httQX_GFP	5'-CGCGGGCCCGGGATCATGGCGACCCTGGAAAAG-3'
Reverse-Primer httQX_GFP	5'-TCTAGAGTCGCGGCCTTACTTGTACAGCTCGTCC-3'

Zur Durchführung der PCR wurde folgendes Reaktionsgemisch (50µl Ansatz) für auf Eis pipettiert:

Reaktionsansatz für die PCR	
35 µl	DEPC-H ₂ O
10µl	5x Phusion HF Puffer
1µl	dNTPs (10mM)
0,5 µl	Forward-Primer (100 pmol/µl)
0,5 µl	Reverse-Primer (100 pmol/µl)
1µl	Template-DNA (100 ng)
1,5µl	DMSO
0,5 µl	Phusion DNA Polymerase (2U/µl)

Es folgte die Durchführung der PCR in einem Thermocycler (Biometra) unter folgenden Reaktionsbedingungen:

Reaktionsbedingungen der PCR			
Start-Denaturierung	2 min. bei 98 °C		
Amplifikation	Denaturierung	15 sec. bei 98 °C	40 Zyklen
	Hybridisierung	30 sec. bei 70 °C	
	Elongation	1 min. bei 72 °C	
End-Elongation	7 min. bei 72 °C		

2.2.7.4 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegel-Elektrophorese

Zur elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren, entsprechend ihrer Größe in Basenpaaren, wird die grundlegende negative Ladung der Moleküle genutzt.

Demzufolge wurden die erhaltenen Amplifikationsprodukte der PCR mit einem 1x Gelladepuffer versetzt und in einem 1 %igen Agarosegel (1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer + 1 Tropfen Ethidiumbromid) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarosegel unter UV-Beleuchtung mit Hilfe der Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid analysiert und photographisch dokumentiert.

2.2.7.5 Aufreinigung spezifischer PCR-Produkte

Im Anschluss an die Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte wurde das Agarosegel mit einer UV-Lampe beleuchtet, wodurch die entsprechenden Banden der PCR-Amplifikate identifiziert wurden. Diese wurden augenblicklich mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen. Die so gewonnenen PCR-Produkte wurden anschließend durch eine Gelextraktion (DNA Extraction Kit NucleoSpin Extract II; Macherey-Nagel), wie vom Hersteller angegeben, eluiert und aufgereinigt.

2.2.7.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationbestimmung von DNA erfolgt durch die Messung der spezifischen Lichtabsorption der Nukleinsäuren bei 260 nm, wodurch sich unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes die Konzentration der Nukleinsäuren berechnen lässt. Hierzu wurden 5 µl der aufgereinigten PCR-Produkte mit 95 µl Wasser gemischt, in Quarzküvetten pipettiert und in einem Photometer (Beckman Coulter) gemessen. Auf diese Weise konnte die Konzentration der Nukleinsäuren, sowie deren Reinheitsgrad, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (1:20) berechnet.

2.2.7.7 Restriktion des Zielvektors peGFP-N1

Zur Rekombination der aufgereinigten PCR-Produkte mit dem Zielvektor peGFP-N1 über die „In-Fusion“-Reaktion musste der Zielvektor zuerst linearisiert werden. Hierzu wurde der Vektor über

Nacht, bei 37 °C mit spezifischen Restriktionsendonucleasen geschnitten und linearisiert.
Für die Restriktion wurde folgender Ansatz (100µl) pipettiert:

Ansatz für die Restriktion von peGFP-N1	
0,83 µl	Vektor (4 µg)
10 µl	10x NEB 3-Buffer
1 µl	BSA (100x)
2 µl	BAM H1-Restriktionsenzym
2 µl	Not I-Restriktionsenzym
84,17 µl	ddH ₂ O

Nach der durchgeführten Restriktion des Zielvektors wurde das Reaktionsprodukt einer molekularbiologischen Auftrennung und Aufreinigung mit abschließender Konzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt 2.2.7.4, 2.2.7.5, 2.2.7.6) unterzogen

2.2.7.8 Rekombination mittels In-Fusion Reaktion

Die Rekombination von verschiedenen DNA-Fragmenten mittels „In-Fusion Cloning Technology“ (Clontech, USA) beruht auf den Eigenschaften des proprietären In-Fusion-Enzyms verschiedene linearisierte DNA-Fragmente zu fusionieren bzw. zu rekombinieren. Hierzu wurden der aufgereinigte, linearisierte Zielvektor peGFP-N1 mit den PCR-Produkten des HttEx1 (*Inserts*) in einem Verhältnis von 2:1 gemischt und anschließend die In-Fusion Reaktion für 15 min. bei 50 °C nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ansatz für die Rekombinationsreaktion	
2µl	5x In-Fusion Enzyme Premix
1,6 µl	Vektor (peGFP-N1)
0,8 µl	<i>Insert</i> (httEx1)
5,6 µl	ddH ₂ O

Abschließend wurde das entstandene Rekombinationsprodukt (HttEx1-peGFP-N1) einer molekularbiologischen Auftrennung, Aufreinigung und abschließender Konzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt 2.2.7.4, 2.2.7.5, 2.2.7.6) unterzogen.

Die In-Fusion Reaktion lieferte somit verschiedene Rekombinationsprodukte, welche für

Rekombinationsproteine kodieren sollten, bestehend aus einem N-terminalen Huntingtin-Exon1-Peptid und einem C-terminalen Ende des eGFP-Peptids (Abb. 2.1). Durch die verschiedenen Längen der PCR-Produkte des Huntingtin-Exon1 ergaben sich somit Vektoren (*htt_QX*), welche für verschieden lange polyglutamine (polyQ)-Domänen mit 25 bis 103 Glutamin-Wiederholungen (Q) kodierten. Somit wurden die entsprechenden Vektoren (*htt_QX*), nach der Länge der kodierten polyQ-Einheiten benannt: *htt_Q25*, *htt_Q46* und *htt_Q103* (Sequenzen und Vektorkarten: Anhang 7.2).

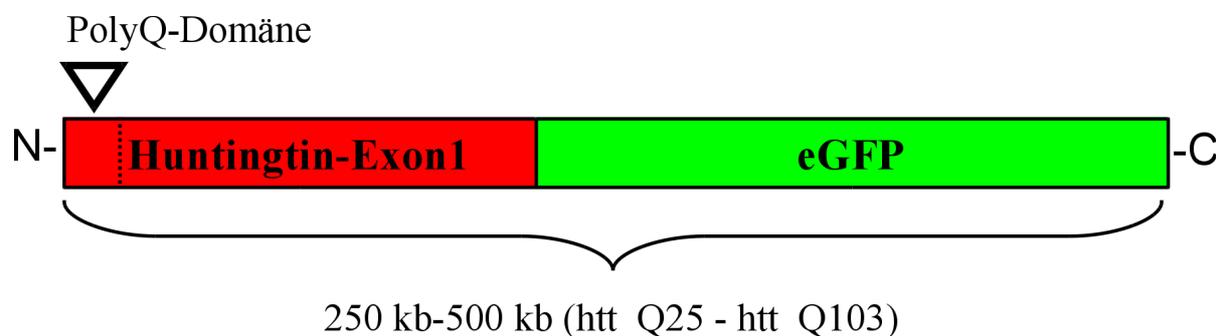


Abbildung 2.1: Rekombinationsprodukt der In-Fusion Reaktion (HttEx1 und peGFP-N1). Die In-Fusion Reaktion führte zur Rekombination der verschiedenen PCR-Produkte von HttEx1 (Inserts) und dem Zielvektor peGFP-N1. Hieraus ergaben sich Plasmide, welche für Rekombinationsproteine kodierten, bestehend aus einem N-terminalen Huntingtin-Exon1-Peptid und einem C-terminalen Ende des eGFP-Peptids. Durch die verschiedenen Längen der PCR-Produkte des Huntingtin-Exon1 ergaben sich somit Vektoren (*htt_QX*), welche für verschieden lange polyglutamine (polyQ)-Domänen mit 25 bis 103 Glutamin-Wiederholungen (Q) kodierten. Somit wurden die entsprechenden Vektoren nach der Länge der codierten polyQ-Einheiten benannt: *htt_Q25*, *htt_Q46* und *htt_Q103*.

2.2.7.9 Klonierung der hergestellten Vektoren (*htt_QX*)

2.2.7.9.1 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Vervielfältigung der hergestellten Vektoren, wurden 45 µl chemisch-kompetenter *E. coli* Bakterien (DH5α) mit 5 µl Vektor-DNA gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Transformation der Bakterien erfolgte durch einen Hitzeschock für 90 sec., bei 42 °C und einer anschließenden Abkühlung für 2 min. auf Eis. Nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium erfolgte eine erneute Inkubation für 30 min der Suspension bei 37 °C. Abschließend wurden 50 µl der Suspension auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Kanamycin 30 mg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Vermehrung der transformierten Bakterien wurden einzelne Bakterienklone von den LB-Platten isoliert und in 10 ml LB-Medium mit geeignetem

Antibiotikum (Kanamycin 30 mg/ml) gezogen.

2.2.7.9.2 Aufreinigung der klonierten Plasmide

Die Präparation und Aufreinigung der klonierten Plasmide aus den Bakterien-Suspension erfolgte unter Verwendung des „NucleoSpin Plasmid Kit“ (Macherey-Nagel) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur abschließenden Kontrolle der Transformationsansätze wurden die klonierten, aufgereinigten Plasmide einer Test-Restriktion unterzogen sowie mittels einer anschließender Agarosegel-Elektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.7.4, 2.2.7.5, 2.2.7.6) aufgetrennt und analysiert. Somit konnten erfolgreiche Transformationsansätze in größeren Mengen vervielfältigt werden. Hierzu wurden die transformierten Bakterien in 100 ml LB-Medium (mit Kanamycin 30 mg/ml) für 24 h, bei 37 °C gezüchtet. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der klonierten Plasmide unter Verwendung des JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Kit (Genomed GmbH) und Durchführung nach Herstellerangaben. Abschließend wurde noch die Konzentration der aufgereinigten Plasmide photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.7.6) und die Plasmide bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.7.10 Quantitative-Real-Time-Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR)

Zur quantitativen Analyse der Expression von proteasomalen Genen, wurde die Methode der „Quantitative real-time reverse-transcription PCR“ (qRT-PCR) angewendet. Hierzu wurde Gesamt-RNA der Zellen isoliert und mittels einer reversen Transkriptase in „complementary DNA“ (cDNA) umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der zu untersuchenden Genexpressionen mittels Real-Time PCR in einem iCycler (BioRad) unter Verwendung spezifischer sense bzw. antisense Primer und eines SYBRGreen Supermix (BioRad).

2.2.7.10.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Zellen erfolgte unter Verwendung eines „NucleoSpin RNA II Kit“ (Macherey-Nagel), entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde die Konzentration und Reinheit der aufgereinigten RNA photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.7.6) und die Proben bei 4° C gelagert.

2.2.7.10.2 Reverse Transkription (RT-PCR) der isolierten Gesamt-RNA

Zur quantitativen Analyse der Genexpressionen musste die aufgereinigte Gesamt-RNA mittels einer reversen Transkriptase-Reaktion in „complementary DNA“ (cDNA) umgeschrieben werden. Die Durchführung der Reaktion erfolgte mit 1 µg aufgereinigter Gesamt-RNA unter Verwendung eines „Omniscrypt RT Kits“ (Qiagen), entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Hierzu wurde folgendes Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt:

Ansatz für die Reverse Transkription	
2 µl	H ₂ O
2 µl	10x Reverse Transkriptase Puffer
2 µl	dNTP-Mix (5 mM)
2 µl	Oligo-(dT 23)-Primer (10 µM)
1 µl	RNasin (10 U)
1 µl	Omniscrypt Reverse Transkriptase (4 U)
10 µl	Isolierte Gesamt-RNA (1 µg in DECP-H ₂ O)

Zur Kontrolle wurde ein Reaktionsgemisch ohne Reverse Transkriptase (1 µl H₂O) hergestellt. Anschließend wurde die reverse Transkription der Gesamt-RNA zu cDNA in einem Thermocycler (BioRad) für 60 min., bei 37 °C durchgeführt.

2.2.7.10.3 Quantitative-Real-Time-PCR (qPCR) der cDNA-Proben

Zur Quantifizierung der Expressionen von proteasomalen Genen wurde die synthetisierte cDNA mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR) analysiert und die Menge der proteasomalen Gen-Transkripte relativ zu einem Standardgen (*aktin*) bestimmt. Hierzu wurden folgende Primerpaare für die proteasomalen Gene *psmb5*, *psmb6* und *psmb7* (Kapeta et al., 2010) verwendet :

Primerpaare für die qPCR

Primer	Sequenz
<i>aktin</i> -reverse	5'CAGGTCCAGACGCAGGATGGC'3
<i>aktin</i> -forward	5'CTACAATGAGCTGCGTGTGGC'3
<i>psmb5</i> -reverse	5'CATCTCTGTAGGTGGCTTGGT'3
<i>psmb5</i> -forward	5'AGGTTCTGGCTCTGTGTATGC'3
<i>psmb6</i> -reverse	5'CAAACCTGCACGGCCATGATA'3
<i>psmb6</i> -forward	5'GAGGCATTCACTCCAGACTG'3
<i>psmb7</i> -reverse	5'ACAACCATCCCTTCAGTTGC'3
<i>psmb7</i> -forward	5'TGCAAAGAGGGGATAACAAGC'3

Für die Durchführung der qPCR wurde ein ABsolute SYBR GreenFluorescein Mix (Thermo Scientific) verwendet und folgendes Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 25 μ l hergestellt:

Ansatz für die qPCR	
11,5 μ l	MilliQ-H ₂ O
0,1 μ l	Forward-Primer (100 pmol/ μ l)
0,1 μ l	Reverse-Primer (100 pmol/ μ l)
12,5 μ l	2x SYBR GreenFluorescein Mix
1 μ l	cDNA

Die Analyse der Proben erfolgte jeweils in Triplets pro Gen und Behandlung. Die Durchführung der qPCR-Reaktion erfolgte in einem iCycler (BioRad) unter folgenden Bedingungen:

Reaktionsbedingungen der qPCR		
Start-Denaturierung	15 min. bei 95 °C	
Amplifikation	20 sec., 95 °C	35 Zyklen
	20 sec., 60 °C	
	30 sec., 72 °C	
Real-Time Analyse	60 sec., 95 °C	88 Zyklen
	60 sec., 55 °C	
	8 sec., 55 °C, mit 0,5 °C	
	Anstieg pro Zyklus	

Nach Abschluss der qPCR-Reaktion konnte mittels der Software REST (Pfaffl et al., 2002) eine relative Quantifizierung der untersuchten Genexpressionen im Vergleich zum Referenzgen *aktin*

ermittelt werden.

2.2.8 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)-Methoden

2.2.8.1 Die verwendeten transgenen *C. elegans*-Stämme

Der Nematode *C. elegans* (Fadenwurm) ist auf Grund seiner kurzen Generationszeit (drei Tage), seiner exakten Zellzahl (959 somatische Zellen), seiner Transparenz sowie seiner einfachen Zucht ein sehr guter Modellorganismus für biologisch relevante Untersuchungen. Zudem kommen unter Laborbedingungen die meisten Würmer als Hermaphrodit vor, welche sich durch Selbstbefruchtung vermehren können und somit „klonalen“ Nachwuchs erzeugen (Brenner, 1974).

Zur Untersuchung von polyglutaminen Proteinen und Aggregaten wurden transgene Wurmstämme über das *Caenorhabditis* Genetic Center (Minnesota, USA) bezogen (Morley et al., 2002). In diesen Würmern wird ein Fusionsprotein, bestehend aus YFP-Protein und polyglutaminem Peptid (AM 141 Stamm: 40 Glutamine; AM 134 Stamm: 0 Glutamine), durch einen *unc-54* Promoter exprimiert, wodurch es in der Körperwand des Wurmes zu fluoreszierenden Proteinexpressionen und Aggregatbildung kommt (Morley et al., 2002).

2.2.8.2 Kultivierung von *C. elegans*

Zur Kultivierung der Nematoden dienten NGM (engl. „Nematode growth medium“-)Platten, welche mit einem *E. coli*-Stamm (HB-101) beimpft wurden und den Würmern als Nahrung dienten. Für die Behandlung der Nematoden mit dem *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb 761 wurden NGM-Platten verwendet, welche mit EGb 761-behandelten HB101-Kulturen beimpft wurden (siehe Abschnitt 2.2.8.3). Auf Grund der Temperatursensitivität der Nematoden wurden die Würmer bei einer Temperatur von 20 °C kultiviert und behandelt. Zur Aufrechterhaltung der Populationen wurden die Würmer täglich durch einen Platindraht oder durch das Ausschneiden von Agarstücken auf frische NGM-Platten transferiert.

2.2.8.3 Herstellung von NGM-Platten mit bakteriellen Kulturen

Zur Herstellung von NGM-Platten wurde zuerst das „Nematoden-Wachstumsmedium“ (engl.

„Nematode growth medium“) hergestellt und autoklaviert (siehe Abschnitt 2.1.4.4). Die noch heiße NGM-Lösung wurde dann in Kulturschalen gegossen und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die getrockneten NGM-Platten mit HB101-Kulturen versehen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für die Behandlung der Nematoden mit dem *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb 761 wurden 1,5 ml HB101-Bakteriensuspension für 2 min zentrifugiert. Der Überstand der Suspension wurde verworfen und das verbleibende Bakterienpellet in 300 µl M9-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde diese Bakteriensuspension mit EGb 761(150 mg/ml) bzw. DMSO (Kontrolle) im Verhältnis 1:1000 supplementiert und jeweils 150 µl Suspension auf die NGM-Platten pipettiert.

2.2.8.4 Synchronisierung von *C. elegans*

Zur Durchführung reproduzierbarer Untersuchungen von *C. elegans* wurden die Kulturen synchronisiert, um möglichst gleichaltrige Nematoden zu erhalten.

Hierzu wurden adulte, eiertragende Nematoden auf frische NGM-Platten übertragen, auf welchen nach 3 - 4 h eine Eiablage erfolgte. Anschließend wurden die adulten Nematoden von den NGM-Platten entfernt und die Platten bei 20 °C bis zum Schlüpfen der Larven kultiviert. Nach dem Schlüpfen der ersten (L1)-Larven wurden diese jeden Tag bis zum Erreichen der adulten Stadien auf frische NGM-Platten umgesetzt.

2.2.8.5 Mikroskopische Analyse von *C. elegans*

Zur mikroskopischen Untersuchung der Nematoden wurden Objektträger mit 150 µl 3%iger Agarose beschickt und adulte Würmer auf diese transferiert. Anschließend wurden die Würmer nach Zugabe von 20 µl Levamisol (0,1 mg/ml) mit einem Deckgläschen fixiert.

Schließlich erfolgte die mikroskopische Analyse der Nematoden an einem Fluoreszenzmikroskop (Cell[^]R Imaging Station, Olympus) mit der Fokussierung auf die exprimierten polyglutaminen Proteine. Hierzu wurde die Morphologie des Wurmes im Differenzialinterferenzkontrast-Kanal (DIC), sowie die YFP-Fluoreszenz mit den Extinktion- /Emissionparametern 490/510 nm fotografiert und analysiert.

2.2.8.6 Untersuchungen zur Beweglichkeit von *C. elegans*

Die untersuchten *C. elegans* zeichneten sich durch einen charakteristischen Phänotyp aus, in

welchem die Bildung von polyglutaminen Proteinaggregaten mit einer verminderten Beweglichkeit korrelieren (Morley et al., 2002). Somit kann anhand der Nematoden-Beweglichkeit auf den Status der Proteinaggregation geschlossen. Zur Analyse von Veränderungen in der Beweglichkeit von *C. elegans* wurde ein Bewegungs-Test der Nematoden durchgeführt.

Hierzu wurden jeweils ein adulter Nematode in ein Sichtglas (Uhrglas) mit M9-Puffer transferiert und nach einer Eingewöhnungszeit von 60 sec. die Ausschläge der Nematoden über einen Zeitraum von 30 sec. gezählt und dokumentiert (Witan et al., 2008).

2.2.8.7 Proteinpräparation und Immunoblotting von *C. elegans*

Zur proteinbiochemischen Analyse der Nematoden wurden 5 adulte Würmer in ein Reaktionsgefäß mit 10µl Wasser überführt und in einem Wasserbad dreimalig, für jeweils 10 sec. sonifiziert. Anschließend wurde den Proben noch 10 µl Probenpuffer (beta-Mercaptoethnaol) hinzugefügt und die Proben für 5 min bei 99 °C denaturiert. Danach wurden die Proben in vorgefertigte 4-12% Bis-Tris Gele (Invitrogen, Karlsruhe) pipettiert und einer Gelelektrophorese in 1x MES-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) unterzogen. Abschließend erfolgte die weitere Analyse mittels Immunoblotting wie in Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Wirkung von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität

In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass EGb 761 eine Wirksamkeit auf unterschiedliche zelluläre Signalwege besitzt, sowie die Aktivitäten verschiedener Proteine modulieren kann (Bidon et al., 2009; Luo and Smith, 2004). Hierbei konnte in einige Arbeiten mit zellulären Modellen der AD ein abmildernder Effekt von EGb 761 auf die Aggregation von A β -Peptiden nachgewiesen werden, welche nicht auf den antioxidativen Eigenschaften von EGb 761 beruhten (Luo et al., 2002). Demzufolge konnte vermutet werden, dass der beobachtete EGb 761-Effekt eventuell auf einer verbesserten Degradation der A β -Peptiden zurückzuführen wäre, wodurch die Proteinaggregation vermindert würde (Paul, 2008). Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde zuerst die Wirkung von EGb 761 auf die Aktivität des Proteasoms untersucht.

3.1.1. Charakterisierung der Proteasom-Aktivität anhand der Hydrolyse von SUC-AMC

Zur Untersuchung einer möglichen modulierenden Wirkung von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität wurde ein Testverfahren (SUC-AMC-Test) etabliert, welches die proteolytische Aktivität (Chymotrypsin-ähnliche-Aktivität) des 20S-Proteasom darstellen konnte. Hierbei wurde die enzymatische Hydrolyse des spezifischen Substratpeptids Suc-LLVY-AMC (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) durch die Chymotrypsin-ähnliche-Aktivität genutzt, welche zur Freisetzung des fluorogenen AMC-Rest führte und somit die Messung der entstandenen AMC-Fluoreszenz als Maßstab der enzymatischen Proteasom-Aktivität genutzt werden konnte (Liggett et al., 2010). Der Vorteil dieser Methode zur Messung der Proteasom-Aktivität lag vor allem in der Verwendung eines künstlichen, Proteasom-spezifischen Substratpeptids, wodurch die proteasomale Hydrolyse des Peptids von Faktoren wie Ubiquitinierung oder Entfaltungsprozesse unabhängig war. Hiermit war es auch möglich, die Untersuchung der enzymatischen Proteasom-Aktivität „*in vivo*“ durchzuführen (Gil-Parrado et al., 2002), wodurch Fehlinterpretationen durch Messungen von aufgereinigtem Proteasom, wie zum Beispiel durch schwere Proteine bzw. Proteinaggregate, vermieden wurden (Giguere and Schnellmann, 2008).

Zur Durchführung der Messung der proteolytischen Proteasom-Aktivität wurden HEK293-Zellen für 2 h mit ansteigender Konzentration des Proteasom-Inhibitors MG132 bzw. Lösungsmittel

(Kontrolle) behandelt und anschließend, nach Zugabe von SUC-AMC-haltigem Medium, für eine weitere Stunde inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mittels eines Reporter-Lysispuffers lysiert und die Messung der AMC-Fluoreszenz durchgeführt.

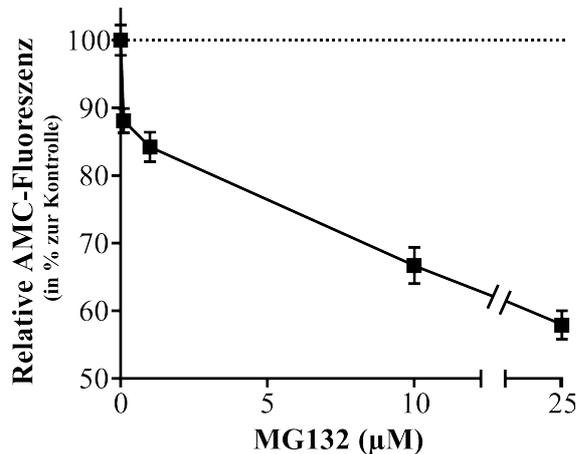


Abbildung 3.1: SUC-AMC-Test zur Messung der enzymatischen Proteasom-Aktivität. HEK293-Zellen wurden für 2 h mit ansteigenden Konz. des Proteasom-Inhibitors MG132 (0 – 25 µM) bzw. Lösungsmittel (Kontrolle) behandelt. Anschließend wurde Kulturmedium mit Suc-LLVY-AMC (SUC-AMC, 50 µM finale Konz.) hinzugefügt und die Zellen für eine weitere Stunde inkubiert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Aktivitätsbestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen Peptidase (enzymatische Proteasom-Aktivität). Hierfür wurde die enzymatische Hydrolyse von SUC-AMC anhand der entstandenen Fluoreszenz des AMC-Rests (AMC-Fluoreszenz) gemessen und die erhaltenen Werte auf den Gesamtproteingehalt im Well angeglichen. Anhand der benutzten Konz. von MG132, konnte die Abhängigkeit der AMC-Fluoreszenz von der proteasomalen Peptidase-Aktivität dargestellt werden. Darstellung der Werte in Prozent zur Kontrolle, als Mittelwert mit Standardfehler (relative AMC-Fluoreszenz). n=2 in jeweils 5 Wells.

Wie die durchgeführten Messungen der AMC-Fluoreszenz ergaben, kam es zu einer Abnahme der enzymatischen Proteasom-Aktivität, in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen von MG132 (Abb. 3.1). Hierbei führte schon eine geringe Konzentration von 0,1 µM MG132, zu einer signifikant verringerten AMC-Fluoreszenz auf 88 % der Kontrolle. Ebenso führte eine erhöhte Konzentration von 10 µM MG132 zu einer Reduktion der AMC-Fluoreszenz auf 67 % bzw. mit 25 µM MG132 auf 58 % der Kontrolle (Abb. 3.1). Da es mit 10 µM MG132 zu gut differenzierbaren Werten kam, wurde dies MG132-Konzentration als akzeptable Menge für fortführende Versuche angenommen. Folglich konnten die erhaltenen Ergebnisse demonstrieren, dass in dieser Versuchsanordnung, die AMC-Fluoreszenz direkt mit der proteasomalen Enzymaktivität korrelierte und gut differenzierbare Ergebnisse lieferte (Liggett et al., 2010). Somit konnte der durchgeführte SUC-AMC-Test als gute Methode zur Bestimmung der Proteasom-Aktivität angesehen werden und für weitere Untersuchungen genutzt werden.

3.1.2 Modulation der Proteasom-Aktivität durch EGb 761

Anhand der erfolgreichen Charakterisierung der Proteasom-Aktivität mit Hilfe des SUC-AMC-Tests konnte nun die Wirkung von EGb 761 auf die proteolytische Proteasom-Aktivität untersucht werden.

Hierzu wurden HEK293-Zellen für 24 h mit ansteigenden Konzentration von EGb 761 bzw. Lösungsmittel (Kontrolle) behandelt. Anschließend wurde den Zellen ein SUC-AMC-haltiges Kulturmedium hinzugefügt, welches zusätzlich MG132 bzw. DMSO beinhaltet, um die Spezifität der AMC-Fluoreszenz zu ermitteln. Nach einer einstündigen Inkubation erfolgte die Zellyse sowie die Bestimmung der proteolytischen Proteasom-Aktivität mittels Messung der AMC-Fluoreszenz.

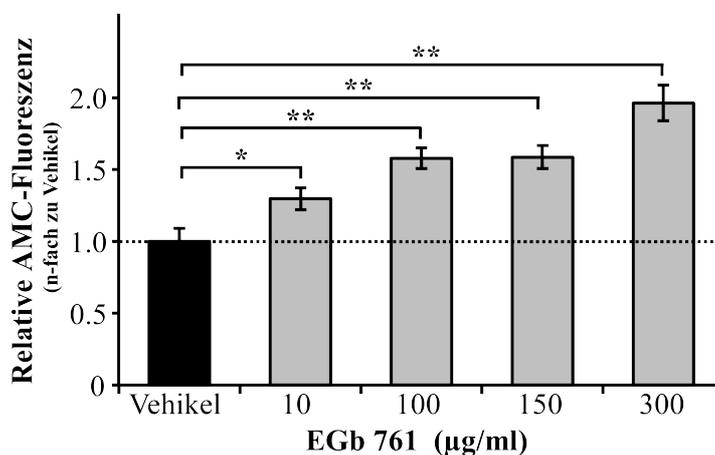


Abbildung 3.2: SUC-AMC-Test zur Analyse der EGb 761-Wirkung auf die Proteasom-Aktivität. HEK293 Zellen wurden für 24 h mit ansteigenden EGb 761-Konzentrationen (10 – 300 µg/ml) bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurde SUC-AMC-haltiges Kulturmedium hinzugefügt, mit Zusatz von 10 µM MG132 bzw. DMSO, um die Spezifität der AMC-Fluoreszenz zu ermitteln. Nach erfolgter Zellyse wurde durch Messung der AMC-Fluoreszenz die proteolytische Proteasom-Aktivität ermittelt. Die erhaltenen Fluoreszenz-Werte wurden abschließend auf den Gesamtproteingehalt normiert, sowie die Spezifität der AMC-Fluoreszenz berechnet. Hierzu wurden die gemessenen Fluoreszenz in Gegenwart bzw. Abwesenheit von MG132 miteinander verrechnet. Zur quantitativen Darstellung der relativen AMC-Fluoreszenz wurden die Werte der Kontrolle als 1 gesetzt. n=4 in jeweils 5 Wells. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01.

Wie die durchgeführten Messungen der AMC-Fluoreszenz ergaben, kam es zu einer Steigerung der enzymatischen Proteasom-Aktivität in Abhängigkeit der eingesetzten EGb 761-Konzentration (Abb. 3.2). Hierbei führte schon eine geringe Konzentration von 10 µg/ml EGb 761, zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität auf das 1,3-fache der Kontrolle (Vehikel) und wurde mit 300 µg/ml EGb 761 auf das 1,96-fache der Kontrolle gesteigert (Abb. 3.2). Darüber hinaus führte eine EGb 761-Konzentration von 150 µg/ml zu einer erhöhten AMC-Fluoreszenz auf das 1,59-fache der Kontrolle

und wurde als hypothetischer EC₅₀ -Wert gesetzt. Interessanterweise stimmte dieser Wert nahezu mit einem errechneten, theoretischen EC₅₀ -Wert von 139 µg/ml EGb 761 überein (Abb. 3.2). Auf Grund der Zunahme der proteolytischen Proteasom-Aktivität, in Abhängigkeit der eingesetzten EGb 761-Konzentration, demonstrierten diese Ergebnisse, dass die EGb 761-Wirkung auf die Proteasom-Aktivität auf einem sehr spezifischen EGb 761-Effekt beruhen musste. Hierfür wurde vermutet, dass EGb 761 wahrscheinlich einen Effekt auf die vermehrte Bildung von proteasomalen Proteinen ausübte (Kisselev and Goldberg, 2001).

3.1.3 Modulation des proteasomalen Proteinabbaus durch EGb 761

Eine erhöhte Aktivität proteasomaler Enzyme kann zu einer erhöhten proteasomalen Proteindegradation führen (Liggett et al., 2010). Zur Untersuchung der Wirkung von EGb 761 auf die proteasomale Proteindegradation wurde ein GFP-basiertes Reporterprotein (d2GFP) benutzt, welches durch eine PEST-Sequenz destabilisiert ist und hierdurch schnell vom Proteasom abgebaut wird. Hierdurch ist es durch Messung der GFP-Fluoreszenzintensität möglich die Proteindegradation durch das Proteasom zu bestimmen (Andreatta et al., 2001). Um die Wirkung von EGb 761 auf den proteasomalen Abbau von d2GFP-Proteinen zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit einer dauerhaften Expression von d2GFP-Proteinen (d2GFP-HEK) herangezogen (Gamerding et al., 2009). Folglich wurden d2GFP-HEK-Zellen für 24 h mit ansteigender Konzentration von EGb 761 inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensitäten der Zellen gemessen.

Wie die durchgeführten GFP-Fluoreszenzmessungen ergaben, kam es zu einer signifikanten Reduktion der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der eingesetzten EGb 761-Konzentrationen (Abb. 3.3 A). Hierbei wurde schon mit 10 µg/ml EGb 761 eine signifikante Abnahme der Fluoreszenz auf das 0,93-fache der Kontrolle gemessen und reduzierte sich mit 300 µg/ml EGb 761 auf das 0,81-fache zur Lösungsmittelkontrolle (Vehikel) (Abb. 3.3 A). Interessanterweise führten 150 µg/ml EGb 761 zu einer Verringerung der Fluoreszenz auf das 0,82 fache der Kontrolle, wodurch vermutet wurde, dass hier eine „Sättigung“ der proteasomalen Proteindegradation erreicht wurde (Abb. 3.3 A). Somit wurde eine Konzentration von 150 µg/ml EGb 761 als effektive Konzentration für alle weitere Untersuchungen festgelegt.

Folglich konnten diese Experimente demonstrieren, dass es durch EGb 761 zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der proteasomalen Proteindegradation kam (Abb. 3.3 A).

Zur Überprüfung des spezifischen Effektes von EGb 761 auf die Proteindegradation wurden die analysierten Zellen zusätzlich für 2 h mit 10 μ M des Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt und anschließend die GFP-Fluoreszenz erneut gemessen.

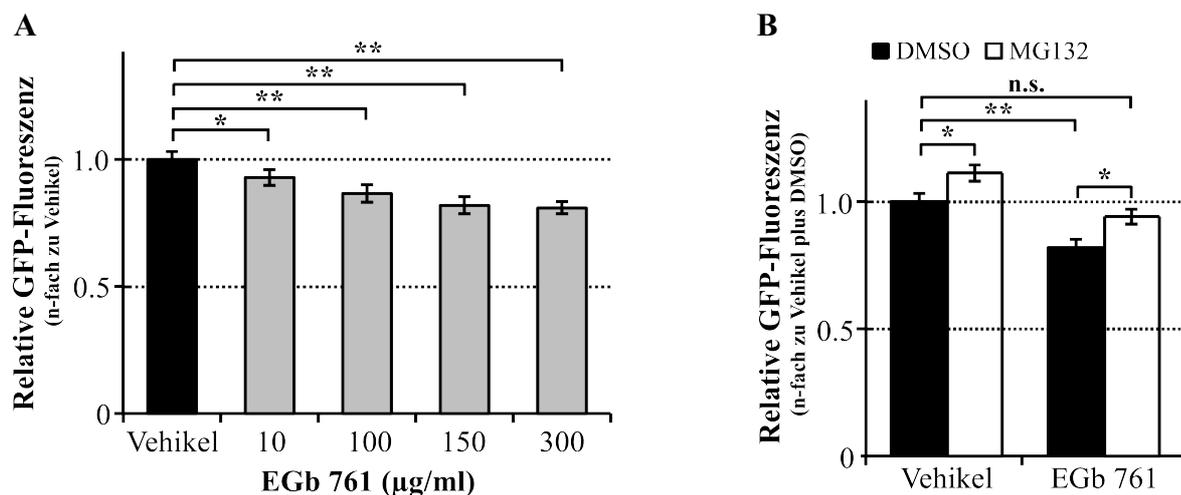


Abbildung 3.3: GFP-Fluoreszenzmessung zur Analyse der EGb 761-Wirkung auf die proteosomale Proteindegradation von d2GFP-Proteinen. d2GFP-HEK-Zellen wurden für 24 h mit ansteigenden EGb 761-Konzentrationen (10 – 300 μ g/ml) bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. **(A)** Anschließend wurden die GFP-Fluoreszenzintensitäten der Zellen gemessen, um den d2GFP-Proteingehalt zu bestimmen. Zur quantitativen Darstellung der relativen GFP-Fluoreszenz wurden die erhaltenen GFP-Fluoreszenzintensitäten auf den Gesamtproteingehalt normiert und abschließend die Werte der Kontrolle als 1 gesetzt. n=5 in jeweils 5 Wells. **(B)** d2GFP-HEK-Zellen mit Behandlung von 150 μ g/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel (Vehikel) (aus dem vorherigen Versuch A), wurden zusätzlich für 2 h mit 10 μ M MG132 bzw. DMSO inkubiert. Hierdurch sollte der spezifische Einfluss der Proteasom-Aktivität auf die GFP-Fluoreszenzintensität, bzw. den d2GFP-Proteingehalt demonstriert werden. Zur quantitativen Darstellung der relativen GFP-Fluoreszenz wurden die Werte der Kontrolle, mit DMSO-Inkubation als 1 gesetzt. n=4 in jeweils 5 Wells. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Die erneut durchgeführten GFP-Fluoreszenzmessungen ergaben in allen Zellen eine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität durch die Inhibition des Proteasoms mit MG132 (Abb. 3.3 B). Hierbei kam es in Lösungsmittel-behandelten Zellen (Vehikel) zu einem Anstieg der GFP-Fluoreszenz auf das 1,11-fache zu Zellen ohne Inhibition (DMSO-Behandlung gleich 1). Zudem konnte auch in EGb 761-behandelten Zellen ein Anstieg der Fluoreszenz auf das 1,15-fache (0,94-fache der Kontrolle mit DMSO-Inkubation) zu Zellen ohne Inhibition beobachtet werden (Abb. 3.3 B).

Auf Grund der Tatsache, dass Modulationen der Proteasom-Aktivität sich direkt in der proteosomalen d2GFP-Degradation auswirken, kommt es zu Veränderungen im d2GFP-

Proteingehalt, welcher wiederum proportional zur GFP-Fluoreszenzintensität steht. Somit konnten diese Experimente die spezifische Abhängigkeit der d2GFP-Fluoreszenzintensität zur proteasomalen Proteindegradation bestätigen (Abb. 3.3 B). Dementsprechend konnte somit auch nachgewiesen werden, dass die in EGb 761-behandelten Zellen gemessene Abnahme der GFP-Fluoreszenz durch einen spezifischen EGb 761-Effekt auf die proteasomale Proteindegradation zu Stande kam (Abb. 3.3 A).

3.1.4 Erweiterte Analyse der EGb 761-Wirkung auf den proteasomalen Proteinabbau

Zur weiteren Analyse der EGb 761-Wirkung auf den proteasomalen Proteinabbau wurde der proteasomale Abbau von d2GFP-Proteinen unter Inhibition der Proteinbiosynthese untersucht. Hierzu wurden d2GFP-HEK-Zellen für 24 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden allen Zellen mit 500 nM Cycloheximid (CHX) inkubiert, zur Inhibition der Proteinbiosynthese, gefolgt von Messungen der GFP-Fluoreszenz in verschiedenen Zeitintervallen.

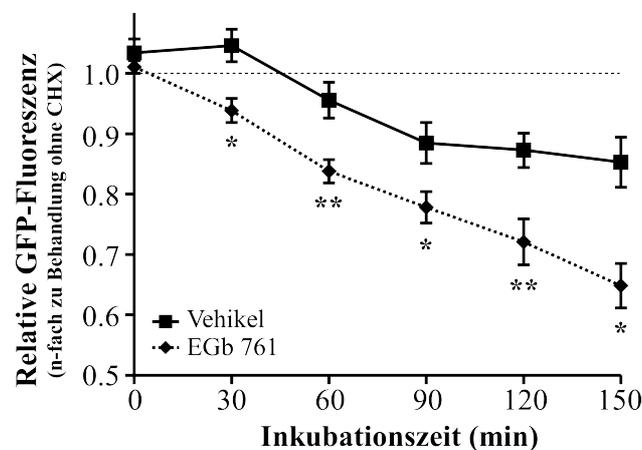


Abbildung 3.4: GFP-Fluoreszenzmessung unter Inhibition der Protein-Neusynthese, zur erweiterten Analyse der EGb 761-Wirkung auf die Proteasom-Aktivität. d2GFP-HEK Zellen wurden für 24 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich mit 500 nM des Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX) inkubiert, um eine Messung der reinen d2GFP-Degradation zu ermöglichen. Zur Erstellung der spezifischen d2GFP-Degradationskinetiken wurde die GFP-Fluoreszenz in Intervallen von 30 min. gemessen. Zur quantitativen Darstellung der relativen GFP-Fluoreszenz wurden die erhaltenen GFP-Fluoreszenzintensitäten auf den Gesamtproteingehalt normiert und abschließend die Messwerte der unterschiedlichen Behandlungen, ohne CHX-Inkubation als 1 gesetzt. n=3 in jeweils 3 Wells. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.*: p<0.05 und **: p<0.01.

Wie die durchgeführten GFP-Fluoreszenzmessungen ergaben, führte die Inhibition der Proteinbiosynthese mit zunehmender Inkubationszeit in allen Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität (Abb. 3.4). Dieser Effekt zeigte den reinen Abbau der d2GFP-Proteine ohne Effekte der Protein-Neusynthese, wodurch die schnelle Degradation bzw. kurze Halbwertszeit der d2GFP-Proteine bestätigt wurde (Andreatta et al., 2001).

Interessanterweise konnte in EGb 761-behandelten Zellen eine schnellere Abnahme der Fluoreszenz gemessen werden, im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Zellen (Abb. 3.4). Hierbei konnte in EGb 761-behandelten Zellen schon nach einer 60 minütigen CHX-Inkubation eine reduzierte GFP-Fluoreszenz auf das 0,84-fache der Kontrolle gemessen werden, welche sich nach 150 min Inkubation weiter auf das 0,65-fache zur Kontrolle reduzierte (Abb. 3.4). Im Gegensatz hierzu konnte in Lösungsmittel-behandelten Zellen nach 60 min. CHX-Inkubation nur eine verringerte GFP-Fluoreszenz auf das 0,96-fache der Kontrolle gemessen werden, welche sich schließlich nach 150 min Inkubation auf das 0,85 fache reduzierte (Abb. 3.4). Folglich konnte durch diese Ergebnisse gezeigt werden, dass es durch eine EGb 761-Behandlung der Zellen zu einer erhöhten proteasomalen Proteindegradation kam.

3.1.5 EGb 761 erhöht die Transkription proteasomaler Gene

Wie in den vorherigen Experimenten gezeigt wurde, induzierte die EGb 761-Behandlung in den Zellen eine gesteigerte proteasomale Proteindegradation (Ergebnisse 3.1.3 und Ergebnisse 3.1.4), sowie eine erhöhte enzymatische Proteasom-Aktivität (Ergebnisse 3.1.2). Hierdurch wurde vermutet, dass EGb 761 eine gesteigerte Bildung von funktionellen Proteasomeinheiten induzierte. Dieser Effekt wäre somit durch eine transkriptionelle Induktion proteasomaler Gene erfolgt, vermittelt durch ARE-Elemente im Promoterbereich dieser Gene (Kwak et al., 2003). Hierzu konnten einige Studien zeigen, dass EGb 761 eine erhöhte Transkription von Phase II-Proteingenen induziert, vermittelt durch die Bindung des Transkriptionsfaktors NRF2 an ARE-Elementen im Promoterbereich (Liu et al., 2007). Vor diesem Hintergrund wurde die Wirkung von EGb 761 auf die Transkription proteasomaler Gene (PSMB5, PSMB6, PSMB7) untersucht, welche für die wichtigsten katalytischen Proteasomenzyme kodieren. Zur Versuchsdurchführung wurden HEK293-Zellen für 2 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt und anschließend die Expression proteasomaler Gene mittels qRT-PCR analysiert.

Wie die qRT-PCR-Analysen der Expressionen proteasomaler Gene ergaben, kam es in EGb 761-

behandelten Zellen zu einer signifikant erhöhten Expression aller untersuchten Proteasomgene. Hierbei wurde eine Steigerung der Transkriptionsprodukte von PSMB5 auf das 1,65-fache, von PSMB6 auf das 1,45-fache, sowie von PSMB7 auf das 1,71-fache der Kontrolle beobachtet (Abb. 3.5).

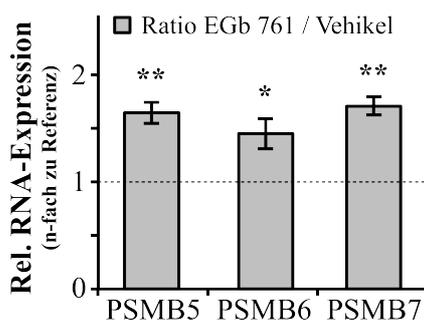


Abbildung 3.5: qRT-PCR-Analyse der EGb 761-Wirkung auf die Expressionen proteasomaler Gene. HEK293-Zellen wurden für 2 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurde Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert und die Expressionen der proteasomalen Gentranskripte von PSMB5, PSMB6 und PSMB7 mittels qRT-PCR analysiert. Zur quantitativen Darstellung der relativen mRNA-Expressionen wurden die einzelnen Expressionen im Verhältnis zum Referenzgen berechnet und als Ratio der EGb 761-Behandlung zur Kontrollbehandlung (Vehikel) dargestellt. n=3. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01.

Somit konnte hierdurch demonstriert werden, dass EGb 761 einen Effekt auf die transkriptionelle Regulation von proteasomalen Genen ausübte. Als Konsequenz wäre es zu einer vermehrten Bildung proteasomaler Proteinen gekommen, wodurch die Proteasom-Aktivität gesteigert worden wäre (Ergebnisse 3.1.2) (Arlt et al., 2009).

3.1.6 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung auf die Proteasom-Aktivität

Wie die durchgeführten Experimenten (Ergebnisse 3.1.) zeigen konnten, führte eine EGb 761-Behandlung in Zellen zu einer gesteigerten Proteasom-Aktivität. Hierbei wurde eine erhöhte proteolytischen Aktivität der proteasomalen Peptidasen festgestellt, sowie eine gesteigerte Degradation des proteasomalen Reporterproteins d2GFP. Zudem wurde eine spezifische Induktion von proteasomalen Genen durch EGb 761 festgestellt. Demzufolge wurde vermutet, dass diese Induktion zur vermehrten Bildung aktiver Proteasomproteine führte und dies die beobachtete erhöhte Proteasom-Aktivität erklären würde (Kwak et al., 2003).

3.2 Untersuchung der Wirkung von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD

Auf Grund der beobachteten erhöhten Proteasom-Aktivität in Zellen mit EGb 761-Behandlung wurde vermutet, dass EGb 761 positive Wirkungen auf Zellen mit einem gestörten Proteinabbau haben könnte. Da es bei der Huntington-Krankheit (HD) neben der pathologischen Proteinaggregation auch zu einem Funktionsverlust der Proteasom-Aktivität kommt (Park et al., 2005), wurde die Wirksamkeit von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD untersucht.

3.2.1 EGb 761 erhöht die enzymatischen Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD

Für die Untersuchung einer EGb 761-Wirkung auf die enzymatische Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD wurden HEK293-Zellen mit den hergestellten polyQ-Plasmiden transient transfiziert, um eine Expression der polyQ-Fusionsproteine, bestehend aus GFP und dem Exon 1 des Huntingtin-Proteins (htt_QX), zu erreichen. In diesen Fusionsproteinen variierte die Anzahl an Glutamin-Wiederholungen von 25 Glutaminen (htt_Q25) zu 46 Glutaminen (htt_Q46) bis hin zu 103 Glutaminen (htt_Q103) (Krobitsch and Lindquist, 2000). Im Folgenden wurden htt_QX-exprimierende Zellen, zur Vereinfachung als htt_QX-Zellen bezeichnet.

Somit wurden für die Versuchsdurchführung HEK293-Zellen mit transienter Expression von eGFP, htt_Q25, htt_Q46, sowie htt_Q103 für 24 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt und anschließend die proteasomale Peptidase-Aktivität der Zellen mittels SUC-AMC-Test untersucht.

Wie die durchgeführten AMC-Fluoreszenzmessungen ergaben, kam es zwischen htt_Q25-Zellen und eGFP-Zellen (diese Werte wurden gleich 1 gesetzt) zu vergleichbaren AMC-Fluoreszenzen, wodurch ersichtlich wurde, dass die Expression von polyQ-Proteinen *per se* keine Auswirkungen auf die Proteasom-Aktivität hatte (Abb. 3.6). Interessanterweise konnte in htt_Q46-Zellen eine verringerte Proteasom-Aktivität auf das 0,88-fache, sowie in htt_Q103-Zellen auf das 0,84-fache von eGFP-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.6). Hierdurch wurde deutlich, dass pathologische Expansionen der polyQ-Proteine zu einer Reduktion der proteolytischen Proteasom-Aktivität führen (Park et al., 2005).

Im Gegenzug führte in allen Zellen eine EGb 761-Behandlung zu einer signifikanten Steigerung der proteasomalen Peptidase-Aktivität. So erhöhte sich die Aktivität in eGFP-Zellen auf das 1,22-fache,

in htt_Q25-Zellen auf das 1,18-fache, in htt_Q46-Zellen auf das 1,31-fache, sowie in htt_Q103-Zellen auf das 1,25-fache zur Lösungsmittelbehandlung (Abb. 3.6).

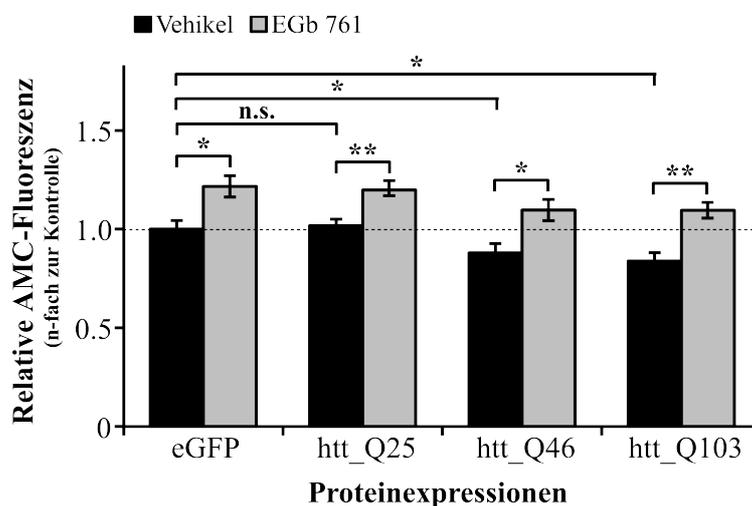


Abbildung 3.6: SUC-AMC-Test zur Analyse der EGb 761-Wirkung auf die Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD. HEK293-Zellen mit transienter Expression von eGFP bzw. den polyQ-Proteinen htt_Q25, htt_Q46 und htt_Q103, wurden für 24 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Durch Messung der AMC-Fluoreszenz wurde die proteolytische Proteasom-Aktivität ermittelt. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden abschließend auf den Gesamtproteingehalt normiert, sowie die spezifische AMC-Fluoreszenz, in Gegenwart bzw. Abwesenheit von MG132 berechnet. Zur quantitativen Darstellung der relativen AMC-Fluoreszenz wurden die Werte der Kontrolle von eGFP-Zellen gleich 1 gesetzt. n=3 in jeweils 5 Wells. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Diese Ergebnisse waren vergleichbar zu den vorherigen Beobachtungen in nativen HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.1.2) und demonstrierten, dass auch in zellulären Modellen der HD eine EGb 761-Behandlung zur Steigerung der proteolytischen Proteasom-Aktivität führte und somit der Effekt von EGb 761 unabhängig vom Status der basalen Proteasom-Aktivität war.

3.2.2 Modulation der Proteindegradation durch EGb 761 in zellulären Modellen der HD

Zur weiteren Untersuchung der EGb 761-Wirkung auf die proteasomale Proteindegradation in zellulären Modellen der HD wurde der Abbau des d2GFP-Reporterproteins in polyQ-exprimierenden Zellen untersucht. Auf Grund der Tatsache, dass die verwendeten polyQ-Proteine auf GFP-Fusionsproteinen basierten, konnten für die Untersuchungen keine GFP-Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden. Somit wurden die Untersuchungen zur d2GFP-

Degradation mittels Immunoblotting durchgeführt.

Zur Versuchsdurchführung wurden d2GFP-HEK-Zellen mit transienten Proteinexpressionen von htt_Q25, htt_Q46 und htt_Q103 für 24 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden Lysate der Zellen mittels Immunoblotting untersucht und der Gehalt von d2GFP-Proteinen, sowie von proteasomalen Proteinen (proteasomale Untereinheit $\alpha 1$, 20S) analysiert. Auf eine Untersuchung von eGFP-Zellen wurde verzichtet, da die vorangegangenen Versuche keinen Unterschied in der Proteasom-Aktivität zu htt_Q25-Zellen zeigten (Ergebnisse 3.2.1).

Wie die durchgeführten Immunblot-Analysen ergaben, kam es zu keinen signifikanten Unterschieden im d2GFP-Proteingehalt zwischen htt_Q25-Zellen (Werte wurde als 1 gesetzt) und htt_Q46-Zellen (Abb. 3.7). Im Gegensatz hierzu wurde in htt_Q103-Zellen ein leicht erhöhter d2GFP-Gehalt auf das 1,13-fache von htt_Q25-Zellen beobachtet (Abb. 3.7), was auf eine verringerte d2GFP-Degradation hindeutete (Park et al., 2005).

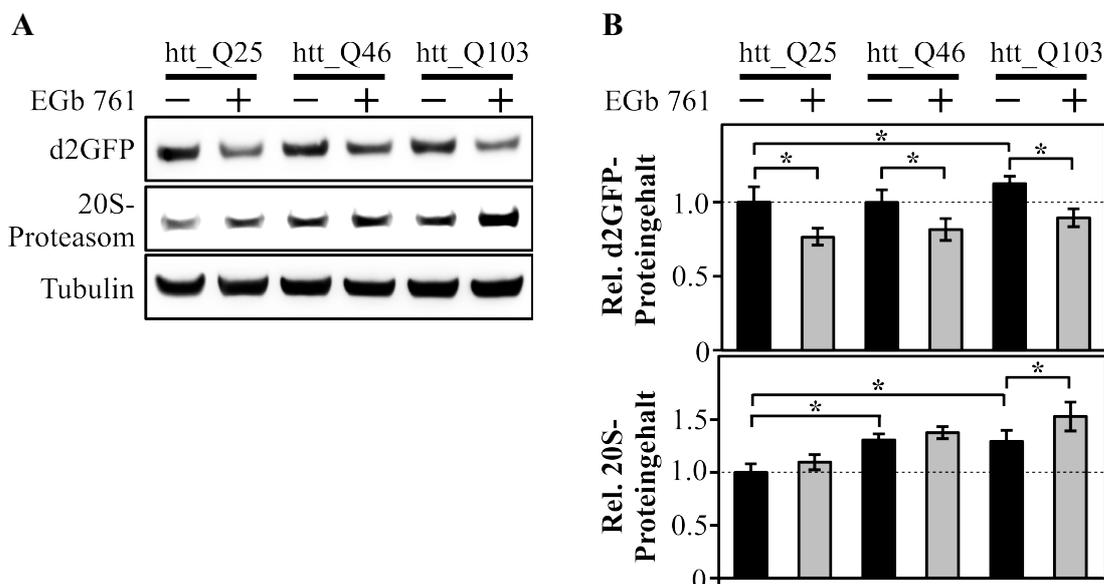


Abbildung 3.7: Immunoblot-Analyse der EGb 761-Wirkung auf den proteasomalen Proteinabbau in zellulären Modellen der HD. d2GFP-HEK-Zellen mit transienten Proteinexpressionen von htt_Q25, htt_Q46 und htt_Q103, wurden für 24 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden Lysate der Zellen auf ein 12 %iges PAA-Gel aufgetragen und mittels Immunoblotting untersucht. **(A)** Immunoblot der exprimierten d2GFP- und 20S-Proteine, sowie Tubulin als Referenzprotein. **(B)** Der Gehalt von d2GFP- und 20S-Proteinen wurde densitometrisch gemessen und quantifiziert. Zur quantitativen Darstellung des relativen Proteingehalts wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) von htt_Q25-Zellen als 1 gesetzt. n=3. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Interessanterweise führte eine EGb 761-Behandlung in allen Zellen zu einer signifikanten Reduktion von d2GFP-Proteinen. So ergaben die quantitativen Analysen einen verminderten d2GFP-Gehalt in htt_Q25-Zellen auf das 0,76-fache, in htt_Q46-Zellen auf das 0,82-fache, sowie in htt_Q103-Zellen auf das 0,77-fache der Kontrollbehandlung (Abb. 3.7). Diese Ergebnisse deuteten auf eine EGb 761-induzierte Erhöhung der proteasomalen d2GFP-Degradation hin und waren vergleichbar mit den Beobachtungen aus den durchgeführten Fluoreszenzmessungen in nativen d2GFP-HEK-Zellen (Ergebnisse 3.1.3).

Die zusätzlich durchgeführte Analyse des Gehalts an proteasomalen 20S-Proteinen ergab eine signifikante Zunahme in htt_Q46-Zellen auf das 1,31-fache, sowie in htt_Q103-Zellen auf das 1,29-fache von htt_Q25-Zellen (Abb. 3.7). Anhand der vorherigen Beobachtungen einer reduzierten proteolytischen Proteasom-Aktivität in htt_Q46- und htt_Q103-Zellen (Ergebnisse 3.2.1) wurde vermutet, dass der erhöhte 20S-Proteingehalt aus inaktiven Proteasomproteinen bestand, hervorgerufen durch eine Koaggregation mit polyQ-Aggregaten (Bennett et al., 2005). Interessanterweise führte eine EGb 761-Behandlung in htt_Q25-Zellen zu einer Zunahme des 20S-Gehaltes auf das 1,1-fache der Kontrolle (Abb. 3.7). Zudem führte eine EGb 761-Behandlung auch in htt_Q46-Zellen zu einer leichten Zunahme im 20S-Gehalt auf das 1,05-fache, sowie in htt_Q103-Zellen auf das 1,19-fache der Lösungsmittelbehandlung (Abb. 3.7). Diese beobachtete leichte Erhöhung des 20S-Proteingehalts, wurde hierbei als Folge der EGb 761-induzierten erhöhten Expression proteasomaler Gene (Ergebnisse 3.1.5) angesehen.

3.2.3 EGb 761 erhöht die Transkription proteasomaler Gene in zellulären Modellen der HD

Wie die durchgeführten Immunoblot-Analysen demonstrierten, kam es in htt_Q103-Zellen schon basal, wie auch durch EGb 761-Behandlung, zu einem deutlichen Anstieg im 20S-Proteingehalt (Ergebnisse 3.2.2). Um diesen Effekt näher zu analysieren, wurden die Expressionen proteasomaler Gene in htt_Q103-Zellen mittels qRT-PCR untersucht.

Zur Untersuchung der basalen Genexpressionen wurden zuerst htt_Q25- und htt_Q103-Zellen, 24 h nach erfolgter Transfektionen mittels qRT-PCR untersucht. Zur Untersuchung der EGb 761-Wirkung auf die Transkription proteasomaler Gene wurden htt_Q25- und htt_Q103-Zellen 24 h nach erfolgter Transfektion für 2 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt.

Wie die durchgeführten qRT-PCR-Analysen ergaben, kam es in htt_Q103-Zellen schon basal zu

signifikant erniedrigten Expressionen proteasomaler Gene im Vergleich zu htt_Q25-Zellen (Abb. 3.8 A). Hierbei wurden die Transkriptionsprodukte von PSMB5 auf das 0,66-fache, von PSMB6 auf das 0,85-fache, sowie von PSMB7 auf das 0,71-fache von htt_Q25-Zellen reduziert (Abb. 3.8 A).

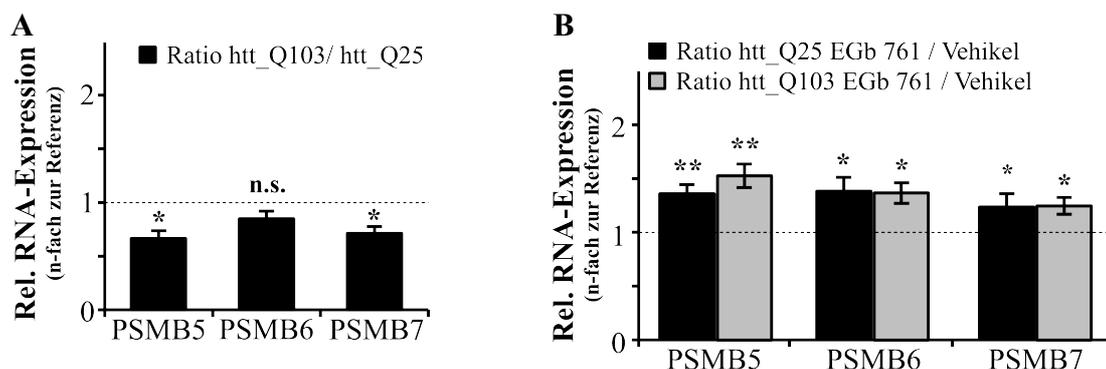


Abbildung 3.8: qRT-PCR-Analyse der EGb 761-Wirkung auf die Expressionen proteasomaler Gene in zellulären Modellen der HD. (A) HEK293-Zellen mit transienten Expressionen von htt_Q25 und htt_Q103 wurden 24 h nach erfolgter Transfektionen mittels qRT-PCR analysiert. Quantitative Darstellung der relativen mRNA-Expressionen von PSMB5, PSMB6 und PSMB7 in htt_Q103-Zellen als Ratio zu htt_Q25-Zellen. n=3. (B) HEK293-Zellen mit transienten Expressionen von htt_Q25 und htt_Q103 wurden 24 h nach erfolgter Transfektionen für 2 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der Expressionen proteasomaler Gene mittels qRT-PCR. Quantitative Darstellung der relativen mRNA-Expressionen von PSMB5, PSMB6 und PSMB7 als Ratio der EGb 761-Behandlung zur Kontrollbehandlung (Vehikel). n=3. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Im Zusammenhang mit dem beobachteten erhöhten 20S-Proteingehalt in htt_Q103-Zellen (Ergebnisse 3.2.2), zeigten die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse, dass die Akkumulation von 20S-Proteinen nicht durch eine erhöhte Gentranskription verursacht wurden und bekräftigten die Vermutung einer Inaktivierung durch Koaggregation mit polyQ-Aggregaten (Bennett et al., 2005).

Im Gegensatz hierzu führt eine EGb 761-Behandlung in htt_Q25- und htt_Q103-Zellen zu signifikant erhöhten Transkriptionen der proteasomalen Gene (Abb. 3.8 B). Interessanterweise konnte hierfür in htt_Q103-Zellen eine Zunahme der Transkriptionsprodukte von PSMB5 auf das 1,53-fache, von PSMB6 auf das 1,37-fache, sowie von PSMB7 auf das 1,25-fache der Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 3.8 B). Zudem konnte auch in htt_Q25-Zellen eine signifikant erhöhte Expression von PSMB5 auf das 1,36-fache, von PSMB6 auf das 1,38-fache, sowie von PSMB7 auf das 1,24-fache der Lösungsmittelbehandlung nachgewiesen werden (Abb. 3.8 B).

Diese Ergebnisse waren vergleichbar zu den vorherigen Beobachtungen in nativen HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.1.5) und demonstrierten, dass der Effekt von EGb 761 auf die Transkription

proteasomaler Gene sogar unabhängig von pathologischen Bedingungen in der Zelle war. Darüber hinaus konnte somit gezeigt werden, dass eine EGb 761-Behandlung zur Abmilderung von pathologischen Veränderungen der Gentranskription, sowie der proteasomalen Degradation führte.

3.2.4 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung auf die Proteasom-Aktivität in HD-Modellen

Wie die durchgeführten Untersuchungen von zellulären Modellen der HD (Ergebnisse 3.2) zeigen konnten, führte die Expression von aberrant verlängerten polyQ-Proteinen zu einer reduzierten Proteasom-Aktivität, einer verminderten Transkription proteasomaler Gene, sowie zu einer Akkumulation von proteasomalen Proteinen. Diese akkumulierten Proteine waren vermutlich katalytisch inaktiv, bedingt durch eine Koaggregation mit polyQ-Aggregaten.

Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass eine EGb 761-Behandlung in Zellen mit Expressionen pathogener polyQ-Proteinen zu einer erhöhten Proteasom-Aktivität und Proteindegradation führte. Zudem konnte die EGb 761-Behandlung die pathologisch reduzierte Transkription proteasomaler Gene wieder steigern, wodurch auch der Gehalt an proteasomalem 20S-Protein erhöht wurde. Demzufolge wurde vermutet, dass eine EGb 761-Behandlung in der HD auch zu einer Abmilderung der pathologischen polyQ-Proteinaggregation führen könnte (Seo et al., 2007).

3.3 Untersuchungen zur Wirkung von EGb 761 auf polyQ-Proteine

Ein Hauptmerkmal der HD ist das Auftreten von Proteinaggregaten, welche durch die Oligomerisierung von mutanten Huntingtin-Proteinen (mHtt-Proteine) entstehen (Poirier et al., 2002). Hierbei steigt die Aggregationstendenz der mHtt-Proteine mit der Anzahl an Glutamin-Wiederholungen in der polyglutaminen Proteindomäne (Chen et al., 2002). Weiterhin kommt es durch eine pharmakologische Inhibition des Proteasoms zu einer schneller Akkumulation und Aggregation von mHtt-Proteinen, woraus sich schließen lässt, dass mHtt-Proteine nur schlecht vom Proteasom abgebaut werden können (Lakhani et al., 2010). Zudem führt die Expression von mHtt-Proteinen zu einer allgemein verschlechterten Proteasom-Aktivität, wodurch noch weniger mHtt-Proteine abgebaut werden und somit mehr mHtt-Proteine aggregieren können (Hipp et al., 2012). Darüber hinaus vermindern mHtt-Proteinaggregate die Proteasom-Aktivität indem Komponenten des UPS und ganze Proteasomkomplexe mit den Aggregaten koaggregieren (Verhoef et al., 2002). Vor diesem Hintergrund wird allgemein vermutet, dass eine induzierte Verbesserung der Proteasom-Aktivität den Abbau von mHtt-Proteinen fördern könnte und folglich die Aggregation von mHtt-Proteinen vermindert würde (Krobitsch and Kazantsev, 2011).

Anhand der beobachteten verbesserten Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD durch eine EGb 761-Behandlung (Ergebnisse 3.2) sollte folglich die Wirkung von EGb 761 auf polyQ-Proteine, sowie auf die Aggregation der polyQ-Proteine in zellulären Modellen der HD untersucht werden.

3.3.1 EGb 761 reduziert die Anzahl von polyQ-Proteinaggregaten

Für die Untersuchung der Wirkung von EGb 761 auf polyQ-Proteine und deren Aggregation sollten zuerst EGb 761-behandelte HEK293-Zellen, mit Expressionen verschieden langer polyQ-Proteine, durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen analysiert werden.

Zur Versuchsdurchführung wurden HEK293-Zellen mit transienter Expression der polyQ-Proteine htt_Q25, htt_Q46, sowie htt_Q103 für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Zur Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit transienter Expression von eGFP mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop untersucht. Da die exprimierten polyQ-Proteine als Fusionsproteine von eGFP und mHtt vorlagen, konnten die polyQ-Proteine anhand ihrer GFP-Fluoreszenz untersucht und analysiert werden.

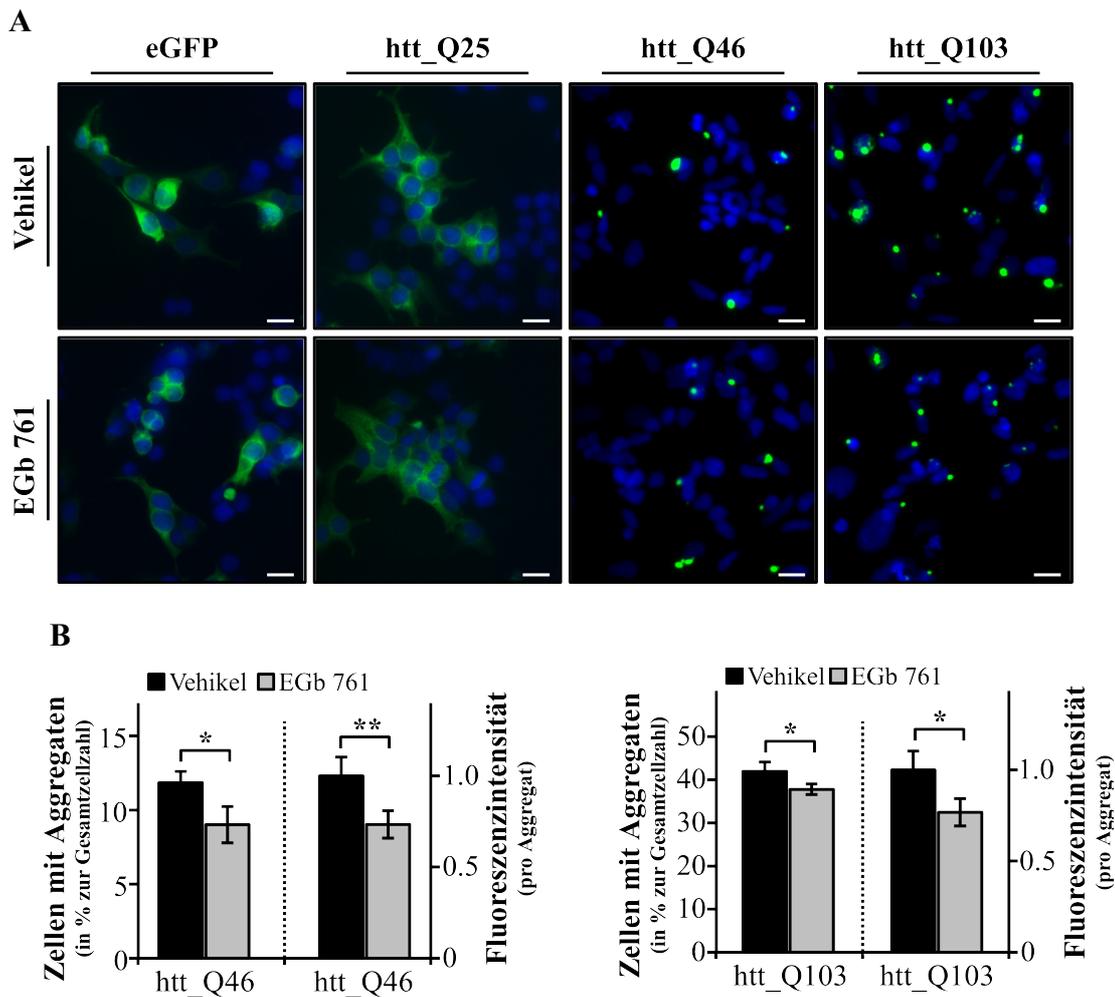


Abbildung 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine und polyQ-Proteinaggregate. HEK293-Zellen mit transienter Expression der Proteine eGFP, htt_Q25, htt_Q46 und htt_Q103 wurden für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop untersucht. **(A)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Zellen. Die exprimierten Proteine wurden über GFP-Fluoreszenz, sowie die Zellkerne über DAPI-Fluoreszenz nachgewiesen. Repräsentative Bilder sind gezeigt. Zur Aufnahme der polyQ-Aggregate mussten verschiedene Belichtungszeiten verwendet werden. Maßstabsbalken: 20 µm. **(B)** Graphische Auswertung der GFP-Fluoreszenz von htt_Q46- und htt_Q103-Zellen. Dargestellt ist die Anzahl Aggregat-tragender Zellen (%), sowie die relative Fluoreszenzintensität der Aggregate. n=3. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01.

Wie die durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, kam es in eGFP- und htt_Q25-Zellen zu einer gleichförmigen Verteilung der GFP-Fluoreszenz in der ganzen Zelle, wobei keine deutlichen Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten der exprimierten Proteine sichtbar wurden. Zudem konnte beobachtet werden, dass die EGb 761-Behandlung der eGFP- und htt_Q25-Zellen zu keinen merklichen Veränderungen in der Verteilung und Intensität der GFP-Fluoreszenz verursachte und somit anscheinend auch keinen Einfluss auf den Gehalt der exprimierten Proteine

hatte (Abb. 3.9 A).

Im Gegensatz hierzu konnte in htt_Q46- und htt_Q103-Zellen eine Aggregation der GFP-Fluoreszenz beobachtet werden, wodurch verdeutlicht wurde, dass aberrant verlängerte polyQ-Proteine zur Aggregation neigen (Abb. 3.9 A). Die quantitative Analyse der Aggregate ergab, dass 12 % der htt_Q46-Zellen und 42 % der htt_Q103-Zellen polyQ-Aggregate bildeten, wodurch die Korrelation zwischen der Proteinlänge und der Aggregationstendenz deutlich wurde (Abb. 3.9 B). Interessanterweise führte die EGb 761-Behandlung der htt_Q46-Zellen zu einer signifikanten Reduzierung Aggregat-tragenden Zellen von 12 % auf 9 % (0,75-fache der Kontrolle), sowie zu einer verminderten Fluoreszenzintensität der Aggregate um 27 % (0,73-fache der Kontrolle) (Abb. 3.9 B). Ebenso konnte die EGb 761-Behandlung der htt_Q103-Zellen die Anzahl Aggregat-tragender Zellen von 42 % auf 38 % (0,9-fache der Kontrolle) reduzieren und verminderte zudem die Fluoreszenzintensität der Aggregate um 23 % (0,77-fache der Kontrolle) (Abb. 3.9 B). Demzufolge führte die EGb 761-Behandlung zu einer reduzierten Bildung von polyQ-Aggregaten, sowie zu einer verminderten Aggregation der polyQ-Proteine. Auf Grund der Tatsache, dass die Intensität der GFP-Fluoreszenz proportional zur Menge an GFP-Proteinen ist, verdeutlichte somit die beobachtete verminderte Fluoreszenzintensität der polyQ-Aggregate, dass die Menge an aggregierten polyQ-Proteinen reduziert wurde und dieser Effekt vermutlich auf einer erhöhten polyQ-Proteindegradation basierte (Cummings et al., 1999).

3.3.2 EGb 761 vermindert den Gehalt von aggregierten polyQ-Proteinen

Zur genaueren Untersuchung der molekularen Effekte von EGb 761 auf polyQ-Proteine und deren Aggregation, wurde der Einfluss von EGb 761 auf die exprimierten polyQ-Proteine mittels proteinbiochemischer Methoden untersucht.

Zur Versuchsdurchführung wurden HEK293-Zellen mit transienter Expression von htt_Q25, htt_Q46, sowie htt_Q103 für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt und anschließend Lysate der Zellen mittels Immunoblotting analysiert. Hierbei wurde auf eine Untersuchung von eGFP-Zellen verzichtet, da die fluoreszenzmikroskopischen Analysen keine deutlichen Unterschiede zu htt_Q25-Zellen aufzeigten (Ergebnisse 3.3.1).

Wie die durchgeführten Immunoblot-Analysen ergaben, migrierten die exprimierten polyQ-Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe im SDS-Trenngel und waren folglich SDS-löslich (im Folgenden werden diese Proteine nur noch als lösliche polyQ-Proteine bezeichnet) (Abb. 3.10 A).

In diesem Zusammenhang konnte anhand erster densitometrischer Analysen der polyQ-Proteine eine signifikante Reduktion im Proteingehalt, mit zunehmender Länge der polyQ-Proteine, detektiert werden. Hierbei wurde ein signifikant reduzierter Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen, in htt_Q46-Zellen auf das 0,78-fache, sowie in htt_Q103-Zellen auf das 0,54-fache von htt_Q25-Zellen (diese Werte wurden gleich 1 gesetzt) festgestellt (Abb. 3.10 B).

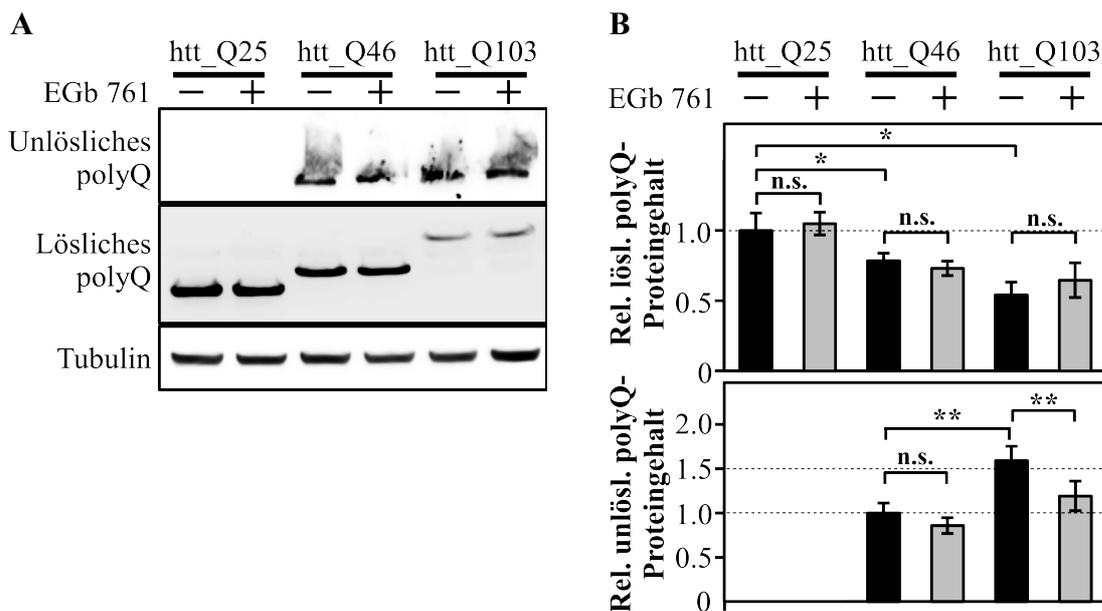


Abbildung 3.10: Immunoblot-Analyse der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine und ihrer Aggregation. HEK293-Zellen mit transienter Expression der polyQ-Proteine htt_Q25, htt_Q46 und htt_Q103 wurden für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden Lysate der Zellen auf ein 12 %iges PAA-Gel aufgetragen und mittels Immunoblotting untersucht. **(A)** Immunoblot der exprimierten polyQ-Proteine, sowie Tubulin als Referenzprotein. Die polyQ-Proteine wurden unter Verwendung eines anti-GFP-Antikörpers nachgewiesen. Hierbei konnten akkumulierte, SDS-unlösliche polyQ-Proteine in den „Taschen“ des SDS-Sammelgels detektiert werden, während SDS-lösliche polyQ-Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße im Gel vorlagen. Zur Darstellung der SDS-unlöslichen polyQ-Proteine wurden eine längere Expositionszeit gewählt. **(B)** Der Gehalt von SDS-löslichen und SDS-unlöslichen polyQ-Proteinen wurde densitometrisch gemessen und quantifiziert. Zur quantitativen Darstellung des relativen Proteingehalts von löslichen polyQ-Proteinen, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) von htt_Q25-Zellen als 1 gesetzt. Zur quantitativen Darstellung des relativen Proteingehalts von unlöslichen polyQ-Proteinen, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) von htt_Q46-Zellen als 1 gesetzt. n=4. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Darüber hinaus ergaben die weiteren Analysen, dass die EGb 761-Behandlung in allen Zellen keine signifikanten Veränderungen im Proteingehalt löslicher polyQ-Proteine bewirkte (Abb. 3.10 B).

Bemerkenswerterweise wurden durch längere Expositionszeiten der Immunoblots, zusätzlich in den Proben von htt_Q46- und htt_Q103-Zellen noch weitere polyQ-Proteine im SDS-Sammelgel sichtbar (Abb. 3.10 A). Da diese Proteine während der SDS-Elektrophorese nicht in das Trenngel

migrierten, waren diese polyQ-Proteine resistent gegenüber der SDS-Denaturierung und somit SDS-unlöslich (im Folgenden werden diese Proteine nur noch als unlösliche polyQ-Proteine bezeichnet). Diese unlöslichen polyQ-Proteine bestanden aus polyQ-Aggregaten bzw. aggregierten polyQ-Oligomeren, welche wiederum aus aberrant veränderten polyQ-Proteinen (htt_Q46 und htt_Q103) mit abnormaler β -Faltblattstruktur, gebildet wurden (Scherzinger et al., 1997). Zudem wird diese fehlerhafte β -Faltblattstruktur mit zunehmend abnormalen Proteinlängen stabilisiert, wodurch die proteasomale Entfaltung und Degradation vermindert wird (Saunders et al., 2011). Infolgedessen korreliert die Menge an unlöslichen polyQ-Proteinen mit der Fehlfaltungstendenz der polyglutaminen Proteindomäne und der hieraus resultierenden Aggregationstendenz der polyQ-Proteine (Lakhani et al., 2010). Zusätzlich wirken die Fehlfaltungen der polyQ-Proteine als starkes Signal für eine schnelle proteasomale Degradation, die aber auch durch die Fehlfaltung erschwert wird und somit eine schnelle Akkumulation von nicht degradierten polyQ-Proteinen verursacht wird (Michalik and Van Broeckhoven, 2004).

Vor diesem Hintergrund ergaben die densitometrischen Analysen, dass der Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen in htt_Q103-Zellen auf das 1,59-fache von htt_Q46-Zellen (Werte von Lösungsmittel-behandelte htt_Q46-Zellen wurden gleich 1 gesetzt) anstieg (Abb. 3.10 B). Diese Akkumulation von unlöslichen polyQ-Proteine mit zunehmender Länge der Konstrukte korrelierten mit der beobachteten Zunahme von polyQ-Aggregaten aus den Analysen der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 3.9). Darüber hinaus bestätigten diese Beobachtungen, dass die exprimierten htt_Q46-Proteine eine geringere Tendenz zur Fehlfaltung aufwiesen als htt_Q103-Proteine und somit auch weniger polyQ-Proteine zu SDS-unlöslichen Proteinen aggregierten (Lakhani et al., 2010). Bemerkenswerterweise konnten die weiteren Analysen aufzeigen, dass eine EGb 761-Behandlung den Gehalt an unlöslichem polyQ-Protein signifikant reduzierte. So wurde der Gehalt an unlöslichem polyQ-Protein in htt_Q46-Zellen auf das 0,86-fache, sowie in htt_Q103-Zellen auf das 1,19-fache (29 % Reduzierung) von Lösungsmittel-behandelten htt_Q46-Zellen reduziert (Abb. 3.10 B). Diese Ergebnisse korrelierten mit der beobachteten Abnahme der Fluoreszenzintensität der polyQ-Aggregate (Abb. 3.9), wodurch auch der Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Proteinmenge verdeutlicht wurde.

Somit wurde die Vermutung bekräftigt, dass die EGb 761-Behandlung zu einer verbesserten Degradation fehlgefalteter polyQ-Proteine führte und dies in einem reduzierten Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen, Fluoreszenzintensität und Anzahl der polyQ-Aggregate resultierte (Li et al., 2008).

3.3.3 EGb 761 reduziert den Gehalt an polyQ-Aggregaten ohne zytotoxische Wirkung

Wie die Untersuchungen der Immunblot-Analyse zeigten, kam es zu einer Akkumulation von SDS-unlöslichen polyQ-Proteinen im Bereich der Ladetaschen des SDS-Sammelgels, wodurch die Detektion und Quantifizierung der polyQ-Proteine deutlich erschwert wurde (Ergebnisse 3.3.2). Dementsprechend wurden zur besseren quantitativen Analyse der aggregierten polyQ-Proteine, die Proben von htt_Q46- und htt_Q103-Zellen mittels Filterretardierungs-Test (engl. „Filter Retardation Assay“) analysiert. Der Filterretardierungs-Test ist eine sehr gute und einfache Methode zur Visualisierung und Quantifizierung von Proteinaggregaten, da nur stark aggregierte Proteine auf der Filtermembran verbleiben, während alle anderen Proteine verworfen werden (Scherzinger et al., 1997). Zur Durchführung wurden die Proben (Zellysate) aus dem vorherigen Experiment (Ergebnisse 3.3.2) mit einem speziellen reduzierendem Puffer versehen, aufgeköcht und mittels einer Vakuumpumpe durch eine Zellulosemembran gesaugt. Danach konnten die polyQ-Aggregate mittels Immunodetektion visualisiert und analysiert werden.

Weiterhin sollte noch überprüft werden, ob die beobachteten Effekte von EGb 761 auf die Aggregation von polyQ-Proteinen durch eine zytotoxische Wirkung von EGb 761 verursacht wurden. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit transienten Expressionen von htt_Q103 für 48 h mit 50, 100, 150 und 500 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt und anschließend einer Untersuchung mittels SRB-Tests unterworfen.

Die durchgeführten Untersuchungen mittels Filterretardierungs-Test ergaben, dass mit zunehmender Länge der polyQ-Proteine die Bildung von polyQ-Aggregaten erhöht wurde (Abb. 3.11 A) und bestätigten die Beobachtungen der vorhergegangenen Experimenten (Ergebnisse 3.3.1). Hierbei ergab die quantitative Analyse eine signifikante Steigerung an polyQ-Aggregaten in htt_Q103-Zellen auf das 2,1-fache von htt_Q46-Zellen (diese Werte wurden gleich 1 gesetzt) (Abb. 3.11 A). Zudem ergaben die weiteren Analysen, dass die EGb 761-Behandlung den Gehalt an polyQ-Aggregaten in htt_Q46-Zellen signifikant auf das 0,71-fache, sowie in htt_Q103-Zellen auf das 1,4-fache der Kontrolle reduzierte (Abb. 3.11 A). Diese Ergebnisse bestätigten die vorherigen Beobachtungen der Fluoreszenzmikroskopie, in der die EGb 761-Behandlung die Anzahl, sowie Fluoreszenzintensität der polyQ-Aggregate reduzierte (Ergebnisse 3.3.1).

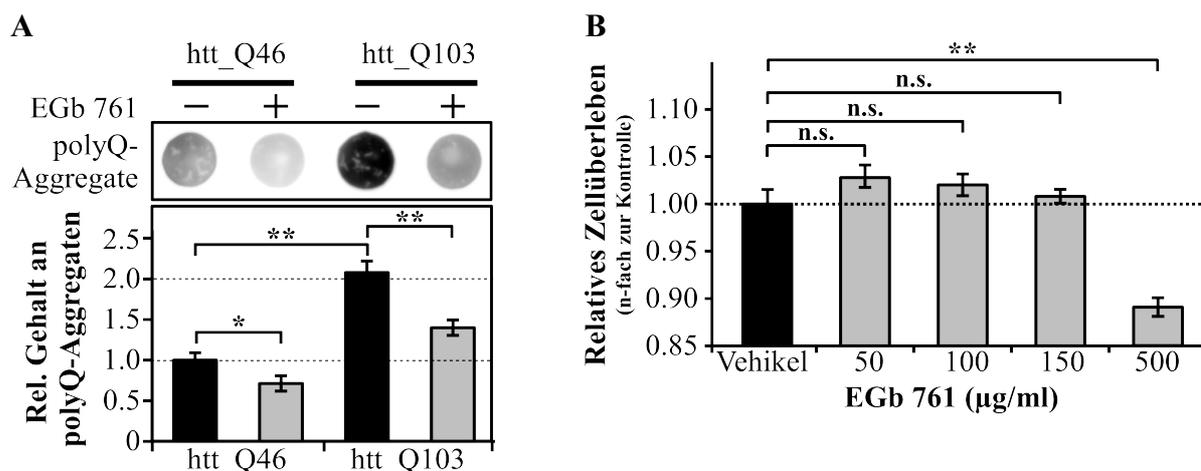


Abbildung 3.11: Filterretardierungs-Test (A) zur Analyse der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Aggregate, sowie SRB-Test (B) zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Effekte von EGb 761. (A) HEK293-Zellen mit transienten Expressionen der polyQ-Proteine htt_Q46 und htt_Q103 wurden für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurde Lysate der Zellen mittels Filterretardierungs-Test untersucht. PolyQ-Aggregate wurden unter Verwendung eines anti-GFP-Antikörpers visualisiert und densitometrisch analysiert. Zur quantitativen Darstellung des relativen Gehalts an polyQ-Aggregaten, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) von htt_Q46-Zellen als 1 gesetzt. n=4. (B) HEK293-Zellen mit transienten Expressionen von htt_Q103 wurden für 48 h mit 50, 100, 150 und 500 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurde ein SRB-Test durchgeführt, um einen möglichen zytotoxischen Effekt von EGb 761 auf htt_Q103-Zellen zu testen. n=3 in 6 Wells je Behandlung. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Zur Klärung, ob die beobachteten Effekte von EGb 761 auf die Aggregation von polyQ-Proteinen durch eine zytotoxische Wirkung von EGb 761 verursacht wurden, wurde eine Analyse mittels SRB-Tests durchgeführt. Wie die durchgeführten Untersuchungen mittels SRB-Tests ergaben, konnte keine zytotoxische Wirkung der bisher eingesetzten Konzentrationen von EGb 761 (50, 100 und 150 µg/ml) in htt_Q103-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.11 B). Erst eine sehr hohe Konzentrationen von 500 µg/ml EGb 761 verursachte eine geringe zytotoxische Wirkung in den untersuchten Zellen, wodurch die Gesamtzellzahl signifikant um 11 % abnahm (0,89-fache zur Kontrolle) (Abb. 3.11 B). Diese Ergebnisse demonstrierten, dass der beobachtete Effekt von EGb 761 auf polyQ-Proteine (Ergebnisse 3.3.2) und polyQ-Aggregate (Ergebnisse 3.3.1) nicht durch eine zytotoxische Wirkung von EGb 761 verursacht wurde (Abb. 3.11 B).

Somit konnten diese Beobachtungen die Vermutung weiter verstärken, dass eine EGb 761-Behandlung zu einer verbesserten Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen führte und hierdurch die Aggregation der polyQ-Proteine vermindert wurde (Chow et al., 2012).

3.3.4 EGb 761 vermindert die Aggregation von polyQ-Proteinen mit Beginn der Behandlung

Zur genaueren Analyse der EGb 761-Wirkung auf unlösliche polyQ-Proteine bzw. polyQ-Aggregate, wurde hierzu die Akkumulation unlöslicher polyQ-Proteine unter dem Einfluss von EGb 761 an unterschiedlichen Zeitpunkten proteinbiochemisch untersucht.

Zur Versuchsdurchführung wurden htt_Q103-Zellen nach erfolgter Transfektion für 24 h kultiviert und anschließend mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle behandelt. Nach Inkubationszeiten von 3 h, 6 h, 12 h, 24 h wurden jeweils Zellysate gesammelt und abschließend mittels Immunoblotting auf ihren Gehalt an polyQ-Proteinen untersucht. Hierbei wurden die Proben mit einem 4 - 12 %-igen Gradientengel aufgetrennt, um die Akkumulation der SDS-unlöslichen polyQ-Proteine im Sammelgel zu verhindern (Ergebnisse 3.3.2) und eine bessere Analyse der unlöslichen Proteine zu gewährleisten.

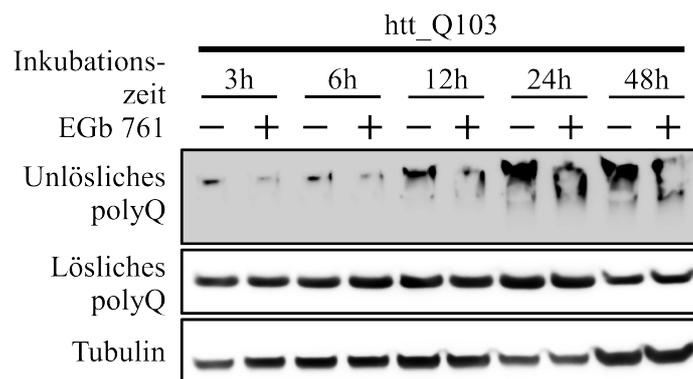


Abbildung 3.12: Immunoblot-Analyse der Aggregation von polyQ-Proteinen in EGb 761-Behandlungen. HEK293-Zellen mit transienten Expressionen von htt_Q103 wurden 24 h nach erfolgreicher Transfektion, mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Zellysate wurden nach 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h EGb 761-Inkubation gesammelt und auf einem 4 - 12 %-igen Gradientengel aufgetragen und mittels Immunoblotting untersucht. Zur Analyse der exprimierten polyQ-Proteine wurde ein anti-GFP-Antikörper benutzt. Durch längere Expositionszeiten der Immunoblots konnte unlösliches polyQ-Protein in den „Taschen“ des SDS-Sammelgels detektiert werden und bildete einen amorphen Proteinschmier. n=2.

Wie die erste Analyse der erhaltenen Immunoblots zeigte, kam es in den verwendeten SDS-Gradientengelen zur Migration der löslichen polyQ-Proteine gemäß ihre Molekülmasse sowie zur Akkumulation der unlöslichen polyQ-Proteine in den Ladetaschen der Gele und bildeten einen kurzen Proteinschmier. Folglich ergab sich durch die Verwendung von Gradientengelen kein wirklicher Vorteil für die Analyse der unlöslichen polyQ-Proteine, gegenüber den vorher verwendeten SDS-Gelen (Ergebnisse 3.3.2).

Anhand weiteren Analysen konnte festgestellt werden, dass es mit zunehmender Expressionszeit der htt_Q103-Konstrukte, zu einem starken Anstieg der unlöslichen polyQ-Proteinen kam, während die Menge an löslichen polyQ-Proteinen nur leicht anstieg (Abb. 3.12). Diese grundlegenden Beobachtungen veranschaulichten, dass unterschiedliche Faktoren bzw. Mechanismen für die Entstehung der löslichen und unlöslichen polyQ-Protein verantwortlich waren. Demzufolge demonstrierte der langsame, lineare Anstieg an löslichen polyQ-Proteinen, dass die Bildung und Degradation dieser Proteine annähernd im Gleichgewicht standen (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Im Gegensatz hierzu verdeutlichte die nicht lineare, starke Zunahme von unlöslichen polyQ-Proteinen, dass das Gleichgewicht zwischen Bildung und Degradation fehlgefalteter polyQ-Proteine merklich verschoben wurde (Verhoef et al., 2002). Für diese Beobachtungen konnte eine erhöhte Proteinexpression bzw. Proteinbildung ausgeschlossen werden, da sich diese auch in einem stark erhöhten Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen manifestiert hätte (Abb. 3.12). Somit ergab sich die Vermutung, dass die erhöhten Mengen von unlöslichen polyQ-Proteinen aus einer verminderten Degradation fehlgefalteter Proteine resultierten, wodurch mehr aggregationsfähige Proteine zu SDS-resistenten polyQ-Aggregaten oligomerisieren konnten (Li et al., 2010).

Wie die weiteren Analysen zeigten, konnte eine EGb 761-Behandlung schon mit Beginn der Inkubationszeit den Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen gegenüber der Kontrolle vermindern. Zudem konnte auch in den EGb 761-behandelten Zellen ein Anstieg von unlöslichen polyQ-Proteinen, mit zunehmender Expressionszeit detektiert werden. Diese Zunahme war aber im Vergleich zur Kontrollbehandlung deutlich reduziert (Abb. 3.12). Im Gegensatz hierzu konnte keine merkliche Wirkung von EGb 761 auf lösliche polyQ-Proteine festgestellt werden, da der Gehalt an löslichem polyQ-Protein zu jedem gemessenen Zeitpunkt vergleichbar zu den Kontrollbehandlungen war (Abb. 3.12). Hierdurch wurde deutlich, dass die EGb 761-Behandlung keinen Einfluss auf die Expression der polyQ-Proteinen hatte. Zudem verdeutlichten diese Beobachtungen auch, dass EGb 761 keinen Effekt auf die Faltung der polyQ-Proteine ausübte, da es hierdurch zu einem Anstieg der löslichen polyQ-Proteine gegenüber der Kontrollbehandlung gekommen wäre (Zhang et al., 2005). Somit konnte die Wirkung von EGb 761 auf die Akkumulation unlöslicher polyQ-Proteine mit erhöhten Degradation fehlgefalteter polyQ-Proteine erklärt werden, wodurch die Menge an aggregationsfähigen polyQ-Proteinen reduziert wurde und schließlich die Bildung der unlöslichen Oligomere vermindert wurde.

3.3.5 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine und polyQ-Aggregate

Wie die durchgeführten Untersuchungen (Ergebnisse 3.3) zeigen konnten, verursachte die Expression von aberrant verlängerten polyQ-Proteine in den Zellen eine Akkumulation von SDS-resistenten, aggregierten polyQ-Proteinen sowie die Bildung von polyQ-Aggregaten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es durch eine EGb 761-Behandlung zu einer deutlichen Reduzierung von unlöslichen polyQ-Proteinaggregaten kam. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt von EGb 761 nicht durch eine veränderte Expression oder verbesserte Faltung der polyQ-Proteine hervorgerufen wurde. Infolgedessen wurde vermutet, dass die Wirkung von EGb 761 auf einer erhöhten Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen (htt_Q46 und htt_Q103) beruhte und diese Wirkung in einer verminderten Aggregation der polyQ-Proteine resultiert hätte (Michalik and Van Broeckhoven, 2004).

3.4 Untersuchung der EGb 761-Wirkung auf den Abbau von polyQ-Proteinen

Der normale Abbau von polyQ-Proteinen verläuft in der Zelle über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), wobei auch ein Abbau, vor allem von aggregierten Proteinen, über den Mechanismus der Autophagie beschrieben wurde (Li et al., 2008).

Wie die bisher erlangten Ergebnisse demonstrierten, bewirkte eine EGb 761-Behandlung in polyQ-exprimierenden Zellen eine erhöhte Proteasom-Aktivität mit einer beschleunigten Degradation von kurzlebigen, destabilisierten Proteinen (d2GFP-Reporterproteinen) (Ergebnisse 3.2). Zudem konnten weitere Untersuchungen zeigen, dass eine EGb 761-Behandlung in polyQ-exprimierenden Zellen zu einer deutlichen Reduktion von unlöslichen, aggregierten polyQ-Proteinen führte, aber keinen Effekt auf den Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen hatte (Ergebnisse 3.3). Folglich wurde vermutet, dass die beobachtete Wirkung von EGb 761 auf unlösliche polyQ-Proteine durch einen verbesserten Abbau von fehlgefalteten polyQ-Proteinen zustande kam (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Somit sollte durch weitere Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen der beobachteten erhöhten Proteasom-Aktivität und der Reduzierung von unlöslichen polyQ-Proteinen hergestellt werden. Hierzu wurden Untersuchungen zur EGb 761-Wirkung auf den proteasomalen Abbau von normalen polyQ-Proteinen (htt_Q25) sowie von aberranten polyQ-Proteinen (htt_Q103) durchgeführt. Hierbei sollte durch den Einsatz pharmakologischer Proteasom-Inhibitoren die proteasomale Degradation von polyQ-Proteinen genauer analysiert werden sowie mit der Degradation von d2GFP-Proteinen verglichen werden. Zur vollständigen Aufklärung der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Aggregate wurde abschließend noch die EGb 761-Wirkung auf einen autophagosomalen Abbau von polyQ-Aggregaten untersucht.

3.4.1 EGb 761 induziert den proteasomalen Abbau von kurzlebigen Proteinen, aber nicht von löslichen polyQ-Proteinen

Zur Untersuchung der EGb 761-Wirkung auf den proteasomalen Abbau von polyQ-Proteinen, wurde zuerst die Degradation von löslichen, normalen polyQ-Proteinen im Vergleich zu destabilisierten, kurzlebigen d2GFP-Proteinen analysiert. Hierbei sollte eine pharmakologische Proteasom-Inhibition, mit ansteigender Konzentration von MG132, für die genauere Analyse der proteasomalen Proteindegredation verwendet werden. Hierbei sollte durch die Verwendung von niedrigen MG132-Konzentrationen, sowie der kurzen Inkubationszeit, eventuelle Nebenwirkungen der Proteasom-Inhibition auf andere zelluläre Prozesse vermindert bzw. ausgeschlossen werden

(Park, 2009).

Zur Durchführung der Experimente wurden htt_Q25-Proteine transient in d2GFP-HEK-Zellen exprimiert und für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden die EGb 761-behandelten Zellen für 4 h mit ansteigenden Konzentrationen des Proteasom-Inhibitors MG132 (0,25 µM; 1 µM; 10 µM) bzw. Lösungsmittel (DMSO) inkubiert. Abschließend wurden Lysate der Zellen mittels Immunoblotting untersucht und der Gehalt an polyQ-Proteinen, d2GFP-Proteinen sowie Polyubiquitin-Proteinen (PolyUB-Proteine) analysiert.

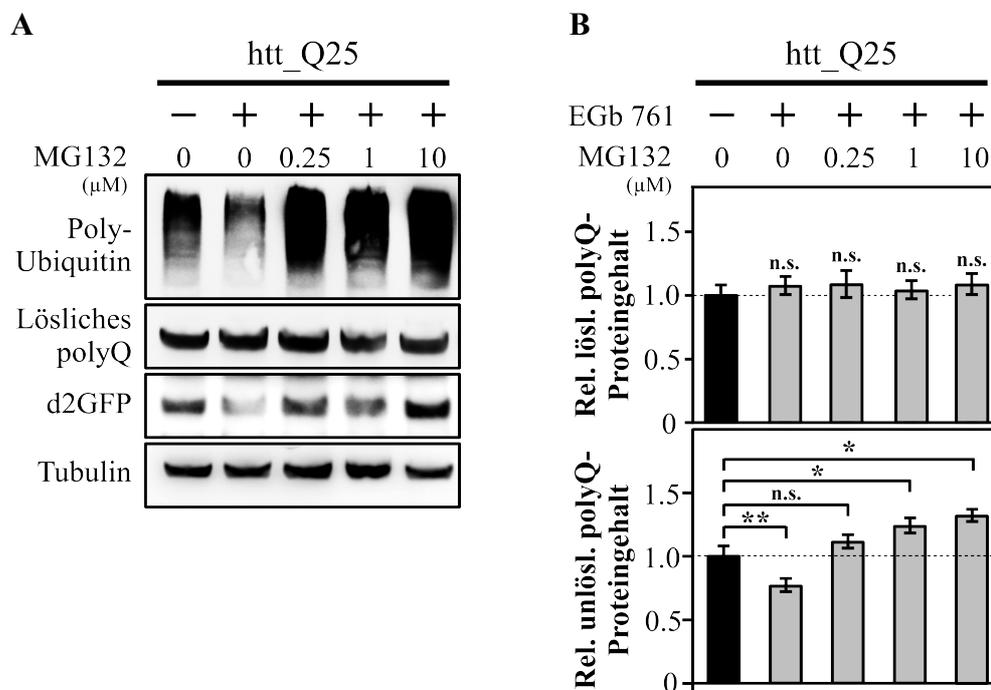


Abbildung 3.13: Immunoblot-Analyse der EGb 761-Wirkung auf die proteasomale Degradation von polyQ- und d2GFP-Proteinen. d2GFP-HEK-Zellen mit transienten Expressionen von htt_Q25 wurden für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden EGb 761-behandelte Zellen zusätzlich für 4 h mit 0,25 µM, 1 µM und 10µM MG132 bzw. Lösungsmittel (DMSO) inkubiert und mittels Immunoblotting analysiert. **(A)** Immunoblot mit Nachweis der Proteine Polyubiquitin (PolyUB), d2GFP und htt_Q25, sowie Tubulin als Referenzprotein. Der Proteingehalt der untersuchten Proteine unter Proteasom-Inhibition (MG132-Inkubation), wurde analysiert und densitometrisch quantifiziert. **(B)** Zur quantitativen Darstellung des relativen Proteingehalts von löslichen polyQ- und d2GFP-Proteinen, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) als 1 gesetzt. n=4. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Wie die durchgeführten Immunblot-Analysen ergaben, konnte die EGb 761-Behandlung den Gehalt an d2GFP-Proteinen signifikant auf das 0,76-fache der Kontrolle (diese Werte wurden gleich 1

gesetzt) reduzieren (Abb. 3.13 B), wodurch die vorherigen Beobachtungen bestätigt wurden (Ergebnisse 3.2.2). Zudem wurde ein signifikanter Anstieg der d2GFP-Proteinen mit einer Proteasom-Inhibition durch MG132 festgestellt (Abb. 3.13 B). Hierbei kam es schon bei einer Konzentration von 0,25 μM MG132 zu einem signifikant erhöhten Proteingehalt von 32 % (1,11-fache zur Kontrolle), sowie mit 1 μM MG132 von 38 % (1,23-fache zur Kontrolle) und mit 10 μM MG132 von 42 % (1,32-fache zur Kontrolle) (Abb. 3.13 B). Diese Ergebnisse zeigten, dass die EGb 761-induzierte Reduktion von d2GFP-Proteinen durch eine Proteasom-Inhibition aufgehoben werden kann. Folglich konnte hierdurch gezeigt werden, dass der verminderte Proteingehalt von d2GFP-Proteinen in EGb 761-behandelten Zellen, durch einen verbesserten proteasomalen Abbau der d2GFP-Proteinen induziert wurde (Andreatta et al., 2001). Unter anderem bestätigte der MG132-konzentrationsabhängige Anstieg an d2GFP-Proteinen die Spezifität des EGb 761-Effektes auf die proteasomale Degradation der d2GFP-Proteine.

Weiterhin wurde der Gehalt an PolyUB-Proteinen untersucht, da diese die Degradation vieler Proteine vermitteln und somit als Kennzeichen für die Proteasom-Aktivität genutzt werden können (Ciechanover, 2005). Hierbei wurde aus technischen Gründen auf eine quantitative Analyse des PolyUB-Proteinschmier verzichtet. Wie die Untersuchung der PolyUB-Proteine ergab, kam es durch die EGb 761-Behandlung zu einer deutlichen Verminderung an PolyUB-Proteinen im Vergleich zur Lösungsmittelbehandlung (Abb. 3.13 A). Dieser Effekt wurde durch eine Inkubation mit MG132 wieder aufgehoben, wobei der Gehalt an PolyUB-Proteinen stark anstieg und sogar deutlich über der Kontrolle lag (Abb. 3.13 A). Diese Beobachtungen bestätigten die erhöhte Proteasom-Aktivität in EGb 761-behandelten Zellen (Myung et al., 2001). Weiterhin wurde hierdurch verdeutlicht, dass PolyUB-Proteine unter pharmakologischer Proteasom-Inhibition ähnlich schnell akkumulieren wie die proteasomalen d2GFP-Reporterproteine (Abb. 3.13 A) und sich somit PolyUB-Proteine gut zur Analyse der Proteasom-Aktivität eignen (Lindsten and Dantuma, 2003). Anhand dieser Beobachtungen konnte festgestellt werden, dass in EGb 761-behandelten Zellen eine erhöhte proteasomale Proteindegradation stattfand und dies auch Auswirkungen auf die löslichen polyQ-Proteine haben sollte.

Interessanterweise ergaben die erste Analyse der polyQ-Proteine, dass die EGb 761-Behandlung zu keinen signifikanten Unterschieden im Proteingehalt zu Lösungsmittel-behandelten Zellen führte (Abb. 3.13 B) und waren somit in Übereinstimmung mit den vorherigen Beobachtungen (Ergebnisse 3.3.2). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die zusätzliche Proteasom-Inhibition nur zur einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung des Proteingehalts von polyQ-Proteinen führte

(Abb. 3.13 A). So wurde durch eine Inkubation mit 10 μM MG132 ein leicht gesteigener Gehalt auf das 1,1-fache zur Kontrolle festgestellt (Abb. 3.13 B). Durch diese Ergebnisse wurde deutlich, dass die untersuchten polyQ-Proteine nur langsam durch das Proteasom abgebaut werden und somit eine hohe Halbwertszeit aufwiesen (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Demzufolge wurde vermutet, dass hierfür auch die langen Halbwertszeiten von eGFP verantwortlich waren, da die untersuchten polyQ-Proteine als eGFP-Fusionsproteine vorlagen (Corish and Tyler-Smith, 1999). Im Gegensatz hierzu konnte in den durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass die kurzlebigen, destabilisierten d2GFP-Proteine relativ schnell und stark durch die pharmakologische Proteasom-Inhibition akkumulierten (Abb. 3.13 A).

Zusammenfassend ergaben die durchgeführten Untersuchungen, dass die EGb 761-Behandlung eine Reduzierung von d2GFP- und PolyUB-Proteinen bewirkte, welche durch eine erhöhte proteasomalen Proteindegradation vermittelt wurde. Schließlich konnte auch gezeigt werden, dass nicht pathologisch veränderte polyQ-Proteine (htt_Q25) kein starkes Degradationssignal aufwiesen und somit nur langsam vom Proteasom degradiert wurden, wodurch es zu keinem deutlichen Effekt durch EGb 761 kam.

3.4.2 EGb 761 induziert den proteasomalen Abbau von fehlgefalteten polyQ-Proteinen

Wie die vorherigen Untersuchungen des proteasomalen Proteinabbaus demonstrierten, wurden kurzlebige, destabilisierte Proteinen schnell und effektiv durch das Proteasom abgebaut, während lösliche polyQ-Proteine nur langsam abgebaut wurden (Ergebnisse 3.4.1). Zur Untersuchung der EGb 761-Wirkung auf den proteasomalen Abbau von fehlgefalteten, aberranten polyQ-Proteinen, wurde die Bildung von unlöslichen polyQ-Proteinen unter einer zusätzlichen pharmakologischen Proteasom-Inhibition analysiert werden.

Für die Versuchsdurchführung wurden htt_Q103-Proteine transient in HEK293-Zellen exprimiert und für 48 h mit 150 $\mu\text{g/ml}$ EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Danach wurden die EGb 761-behandelten Zellen für 4 h mit ansteigenden Konzentrationen des Proteasom-Inhibitors MG132 (0,25 μM ; 1 μM ; 10 μM) bzw. Lösungsmittel (DMSO) inkubiert. Anschließend wurden Lysate der Zellen mittels Immunoblotting untersucht und der Gehalt an löslichen und unlöslichen polyQ-Proteinen, sowie PolyUB-Proteinen analysiert.

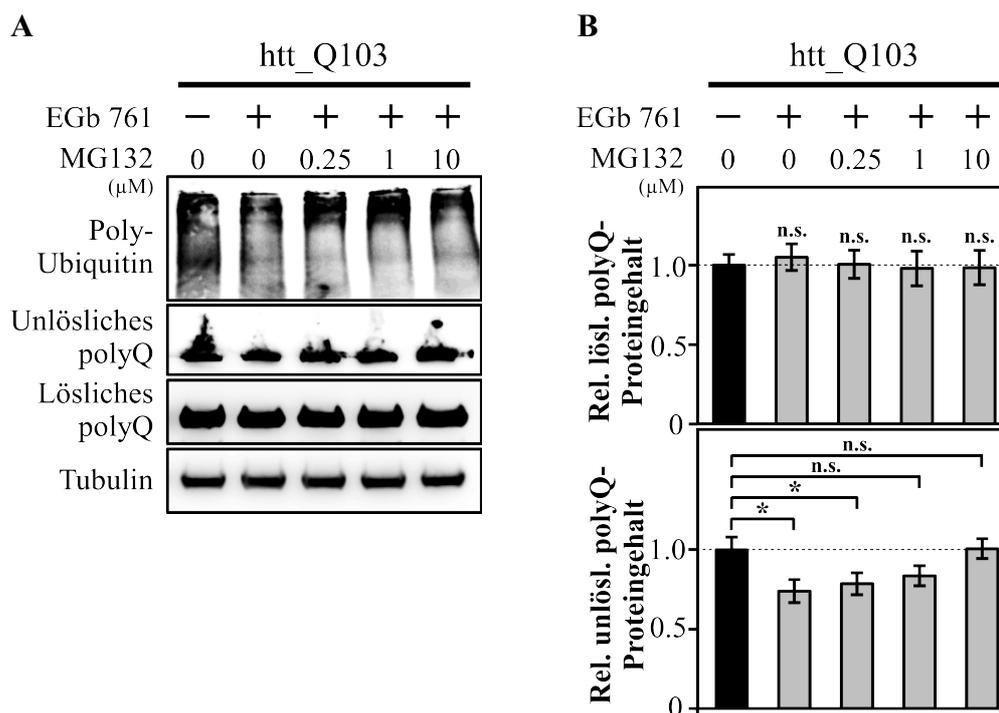


Abbildung 3.14: Immunoblot-Analyse der EGb 761-Wirkung auf die proteasomale Degradation von aberranten polyQ-Proteinen. HEK293-Zellen mit transienten Expressionen von htt_Q103 wurden für 48 h mit 150 μ g/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden EGb 761-behandelte Zellen zusätzlich für 4 h mit 0,25 μ M, 1 μ M und 10 μ M MG132 bzw. Lösungsmittel (DMSO) inkubiert und mittels Immunoblotting analysiert. **(A)** Immunoblot mit Nachweis der löslichen und unlöslichen polyQ-Proteine, sowie von PolyUB-Proteinen und Tubulin. Der Proteingehalt der untersuchten Proteine unter Proteasom-Inhibition (MG132-Inkubation), wurde analysiert und densitometrisch quantifiziert. **(B)** Zur quantitativen Darstellung des relativen Proteingehalts von löslichen und unlöslichen polyQ-Proteinen, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) als 1 gesetzt. n=3. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Wie die ersten Analysen der Immunoblots ergaben, konnte die EGb 761-Behandlung in htt_Q103-Zellen keine signifikanten Unterschiede im Proteingehalt der löslichen polyQ-Proteine bewirken (Abb. 3.14 A) und entsprach den vorherigen Beobachtungen (Ergebnisse 3.3.2). Interessanterweise ergab die weitere Analyse der löslichen polyQ-Proteine, dass die zusätzliche Proteasom-Inhibition mittels MG132 keinen Effekt auf den Gehalt der löslichen polyQ-Proteine hatte (Abb. 3.14 A). Hierbei konnte sogar eine Inkubation mit sehr hohen Konzentration von 10 μ M MG132 keinen Anstieg der löslichen polyQ-Proteine bewirken (Abb. 3.14 B). Folglich waren diese Ergebnisse äquivalent zu den vorherigen Beobachtungen in htt_Q25-exprimierenden d2GFP-HEK-Zellen (Ergebnisse 3.4.1). Hierdurch konnte demonstriert werden, dass die pathologischen Veränderungen der polyQ-Proteine keinen Einfluss auf die proteasomale Degradation von löslichen polyQ-Proteinen hatte (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Demzufolge verdeutlichten diese

Ergebnisse, dass aberrante polyQ-Proteine (htt_Q103) mit einer korrekten Proteinfaltung (lösliche polyQ-Proteine) einem langsamen proteasomalen Abbau unterliegen (Kaytor et al., 2004). Somit wurde auch hier vermutet, dass die Fusion mit eGFP die Stabilität bzw. Halbwertszeit der aberranten polyQ-Proteine beeinflusste (Corish and Tyler-Smith, 1999).

Weiterhin wurde der Gehalt von PolyUB-Proteinen untersucht, um Auskünfte über den proteasomalen Proteinabbau zu erhalten. Auf eine Quantifikation des „Protein-Schmieres“ wurde auch in diesem Experiment aus technischen Gründen verzichtet. Wie die Analyse der PolyUB-Proteine ergab, lag in EGb 761-behandelten Zellen ein deutlich verminderter Gehalt an PolyUB-Proteinen im Vergleich zu Lösungsmittel-behandelten Zellen vor (Abb. 3.14 A). Darüber hinaus konnte dieser Effekt durch die Inkubation mit MG132 aufgehoben werden, wodurch die erhöhte Proteasom-Aktivität in EGb 761-behandelten Zellen belegt wurde (Abb. 3.14 A).

Wie die weiteren Analysen der Immunblots ergaben, wurde der Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen in EGb 761-behandelten Zellen signifikant auf das 0,74-fache von Lösungsmittel-behandelten Zellen (Werte dieser Zellen wurden gleich 1 gesetzt) reduziert (Abb. 3.14 B) und bestätigte die Ergebnisse aus den vorhergehenden Experimenten (Ergebnisse 3.2.2). Interessanterweise konnte dieser reduzierte Gehalt von unlöslichen polyQ-Proteinen, in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen von MG132, wieder auf das Niveau der Lösungsmittelbehandlung erhöht werden (Abb. 3.14 A). Hierbei wurde der Proteingehalt mit 0,25 μ M MG132 auf das 0,79-fache, mit 1 μ M MG132 auf das 0,84-fache, sowie mit 10 μ M MG132 auf das 1,01-fache der Lösungsmittelbehandlung erhöht (Abb. 3.14 B). Infolgedessen veranschaulichte der MG132-konzentrationsabhängige Anstieg von unlöslichen polyQ-Proteinen, dass die EGb 761-Wirkung auf den Gehalt von unlöslichen polyQ-Proteinen spezifische mit der Proteasom-Aktivität gekoppelt war (Abb. 3.14 B). Zudem zeigten diese Beobachtungen, dass die pharmakologische Proteasom-Inhibition zu einer relativ schnelle Akkumulation von unlöslichen polyQ-Proteinen führte, welche vergleichbar mit der Akkumulation kurzlebiger d2GFP-Proteinen war (Ergebnisse 3.4.1). Demzufolge konnte vermutet werden, dass die unlöslichen Proteine aus kurzlebigen polyQ-Proteinen bestanden, welche nicht abgebaut wurden und somit akkumulierten (Li et al., 2010). Da auch beobachtet wurde, dass eine Proteasom-Inhibition keine Wirkung auf lösliche, richtig gefaltete polyQ-Proteinen hatte, wurde somit vermutet, dass die Fehlfaltung aberranter polyQ-Proteine als starkes Degradationssignal fungierte und somit die Halbwertszeit sehr stark gesenkt wurde (Bailey et al., 2002). Folglich wurde vermutet, dass aberrante polyQ-Proteine durch Fehlfaltungen destabilisiert wurden, aber nur schwer degradiert werden konnten und dies

schließlich zur Bildung von unlöslichen polyQ-Proteinen führte (Li et al., 2008). Demzufolge konnten die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die beobachtete Reduzierung von unlöslichen polyQ-Proteinen in EGb 761-behandelten Zellen durch eine verbesserte proteasomale Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen induziert wurde (Chow et al., 2012).

3.4.3 EGb 761 erhöht die Effizienz der proteasomalen Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen

Anhand der durchgeführten Untersuchungen mit htt_Q103-Zellen wurde deutlich, dass der verminderte Abbau von fehlgefalteten, aberranten polyQ-Proteinen in SDS-resistenten Proteinaggregaten resultierte (Ergebnisse 3.4.2). Folglich konnte der Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen bzw. polyQ-Aggregaten zur indirekten Bestimmung der proteasomalen Degradationseffizienz fehlgefalteter polyQ-Proteine genutzt werden (Li et al., 2010). Auf Grund der Akkumulation der unlöslichen polyQ-Proteine in den Ladetaschen der SDS-Gele wurde die Quantifizierung des Gehalts an unlöslichen polyQ-Proteinen deutlich erschwert, wodurch die proteasomale Degradationseffizienz nur schlecht quantifiziert werden konnte. Infolgedessen wurde die Effizienz der proteasomalen Degradation über die Bildung der polyQ-Aggregate im quantitativen Filterretardierungs-Test bestimmt (Scherzinger et al., 1997).

Für die Versuchsdurchführung wurden htt_Q103-Zellen für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden alle Zellen für 4 h mit ansteigenden Konzentrationen von MG132 (0,25 µM; 1 µM; 10 µM) bzw. Lösungsmittel (DMSO) inkubiert. Abschließend wurden Lysate der Zellen mittels Filterretardierungs-Test untersucht und der Gehalt an polyQ-Aggregaten bestimmt.

Wie die durchgeführten Filterretardierungs-Tests ergaben, konnte die EGb 761-Behandlung den Gehalt an polyQ-Aggregaten signifikant auf das 0,78-fache der Lösungsmittelbehandlung (Werte dieser Zellen wurden gleich 1 gesetzt) reduzieren (Abb. 3.15) und bestätigte die Ergebnisse aus den vorhergehenden Untersuchungen (Ergebnisse 3.3.3).

Wie die weiteren Analysen ergaben, bewirkte die pharmakologische Proteasom-Inhibition sowohl in EGb 761-behandelten Zellen, als auch in Lösungsmittel-behandelten Zellen einen signifikanten Anstieg im Gehalt an polyQ-Aggregaten (Abb. 3.15). Folglich konnte der MG132-konzentrationsabhängige Anstieg an polyQ-Aggregaten zeigen, dass die Bildung der polyQ-Aggregate spezifische mit der Proteasom-Aktivität gekoppelt war (Li et al., 2010).

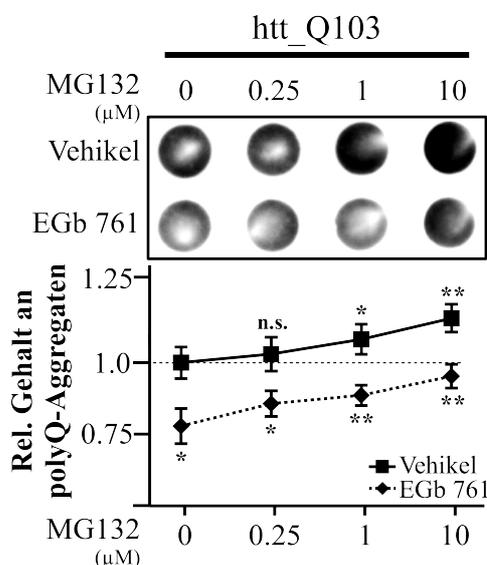


Abbildung 3.15: Filterretardierungs-Test zur quantitativen Analyse der EGb 761-Wirkung auf die polyQ-Proteindegradation. HEK293-Zellen mit transienten Expressionen von htt_Q103 wurden für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden alle Zellen zusätzlich für 4 h mit 0,25 µM, 1 µM und 10 µM MG132 bzw. Lösungsmittel (DMSO) inkubiert und Zellysate mittels Filterretardierungs-Test untersucht. PolyQ-Aggregate wurden mit einem anti-GFP-Antikörper visualisiert und der Gehalt an polyQ-Aggregaten unter Proteasom-Inhibition (MG132-Inkubation) analysiert und densitometrisch quantifiziert. Zur quantitativen Darstellung des relativen Gehalts an polyQ-Aggregaten, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) ohne MG132-Inkubation als 1 gesetzt. n=5. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Interessanterweise ergaben die weiteren Analysen, dass es in Lösungsmittel-behandelten Zellen erst mit 1 µM MG132 zu einem signifikant erhöhten Gehalt an polyQ-Aggregaten auf das 1,08-fache der Kontrolle kam und mit 10 µM MG132 auf das 1,15-fache der Kontrolle gesteigert wurde (Abb. 3.15). Im Gegensatz hierzu bewirkte in EGb 761-behandelten Zellen schon 0,25 µM MG132 einen signifikanten, 10 %-igen Anstieg im Gehalt an polyQ-Aggregaten auf das 0,86-fache der Kontrolle. Zudem wurde der Gehalt an polyQ-Aggregaten durch eine Inkubation mit 1 µM MG132 auf das 0,89-fache, sowie mit 10 µM MG132 das 0,95-fache der Kontrolle gesteigert (Abb. 3.15). Hierdurch wurde bestätigt, dass die beobachtete EGb 761-induzierte Reduzierung der polyQ-Aggregate über eine erhöhte proteasomale Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen vermittelt wurden (Michalik and Van Broeckhoven, 2004).

Folglich konnte anhand der erhaltenen Werte der Lösungsmittel- und EGb 761-Behandlung die EGb 761-induzierte gesteigerte Effizienz in der Degradation fehlgefalteter polyQ-Proteine errechnet werden. Da in Lösungsmittel-behandelten Zellen eine Inkubation mit 10 µM MG132 einen Anstieg der polyQ-Aggregate um 15 % verursachte und dieselbe Konzentration in EGb 761-behandelten Zellen einen Anstieg von 22 % verursachte (Abb. 3.15), wurde hiermit postuliert, dass die EGb 761-Behandlung die Degradationseffizienz von fehlgefalteten polyQ-Proteinen um 7 % verbesserte. Als Konsequenz resultierte die 48 stündige EGb 761-Behandlung in einer Verminderung der polyQ-Aggregate auf das 0,78-fache der Kontrolle (Abb. 3.15).

3.4.4 EGb 761 hat keine Wirkung auf den autophagosomalen Abbau von polyQ-Aggregaten

Wie aus den vorherigen Untersuchungen mit htt_Q103-Zellen hervorging, führte eine EGb 761-Behandlung zu einer Reduzierung von polyQ-Aggregaten durch eine verbesserte proteasomale Degradation von polyQ-Proteinen (Ergebnisse 3.4.3). Darüber hinaus konnten Studien auch zeigen, dass akkumulierte, aberrante Proteine über den Mechanismus der Autophagie abgebaut werden können (Yang and Klionsky, 2010). Demzufolge konnte vermutet werden, dass die beobachtete EGb 761-induzierten Reduktion von polyQ-Aggregaten eventuell durch eine Beteiligung der Autophagie zu Stande kam (Li et al., 2008). Dementsprechend sollte die EGb 761-Wirkung auf den autophagosomalen Abbau von aberranten polyQ-Proteinen und polyQ-Aggregaten untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte eine pharmakologischen Inhibition der Autophagie mit Bafilomycin A1 (Klionsky et al., 2008), zur genaueren Analyse der autophagosomalen Degradation verwendet werden. Hierbei sollte die Verwendung einer niedrigen Bafilomycin-Konzentration, sowie einer kurzen Inkubationszeit, inhibitorische Effekte auf die Proteasom-Aktivität und andere zelluläre Prozesse vermindert werden (Korolchuk et al., 2009b).

Zur Versuchsdurchführung wurden htt_Q103-Zellen für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Danach wurden alle Zellen für 3 h mit 1 µM Bafilomycin A1 (Baf.) bzw. Lösungsmittel (DMSO) inkubiert. Anschließend wurden Lysate der Zellen mittels Immunoblotting untersucht und der Gehalt an polyQ-Proteinen und LC3-Proteinen bestimmt. Hierbei wurde zur Analyse des autophagosomalen Flux bzw. der autophagosomalen Aktivität, die Akkumulation von LC3-II-Proteinen unter Autophagie-Inhibition mit Bafilomycin A1 untersucht (Mizushima and Yoshimori, 2007). Zur abschließenden Untersuchung der EGb 761-Wirkung auf den autophagosomalen Abbau von polyQ-Aggregaten, wurde die Zellysate mittels Filterretardierungs-Test untersucht und der Gehalt an polyQ-Aggregaten bestimmt.

Wie die ersten Analysen der Immunoblots ergaben, bewirkte die EGb 761-Behandlung keine signifikanten Veränderungen im Gehalt an LC3-I-Proteinen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.16 A). Darüber hinaus ergab die weitere Analyse, dass die zusätzliche Autophagie-Inhibition durch Inkubation mit Bafilomycin in beiden Behandlungen zu einer deutlichen Akkumulation der LC3-II-Proteine führte, wodurch ersichtlich wurde, dass die Autophagie in beiden Behandlungen funktionstüchtig war (Abb. 3.16 A). Interessanterweise verursachte die Inhibition der Autophagie in beiden Behandlungen eine gleich starke Akkumulation der LC3-II-Proteinen (Abb. 3.16 A),

wodurch gezeigt wurde, dass die EGb 761-Behandlung keine Wirkungen auf die Autophagie an sich hatte (Mizushima and Yoshimori, 2007). Weiterhin konnten die Analysen der Immunoblots zeigen, dass die EGb 761-Behandlung keine Veränderungen auf die löslichen polyQ-Proteinen hatte, wohingegen der Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen deutlich reduziert wurde (Abb. 3.16 A), wodurch die vorherigen Beobachtungen bestätigt wurden (Ergebnisse 3.3.2).

Bemerkenswerterweise ergaben die weiteren Analysen, dass in beiden Behandlungen die pharmakologische Inhibition der Autophagie keine sichtbaren Auswirkungen auf die löslichen und unlöslichen polyQ-Proteine hatte (Abb. 3.16 A). Folglich konnte hierdurch gezeigt werden, dass weder lösliche, aberrante polyQ-Proteine noch fehlgefaltete, aberrante polyQ-Proteine über den autophagosomalen Weg abgebaut wurden (Menziez et al., 2010).

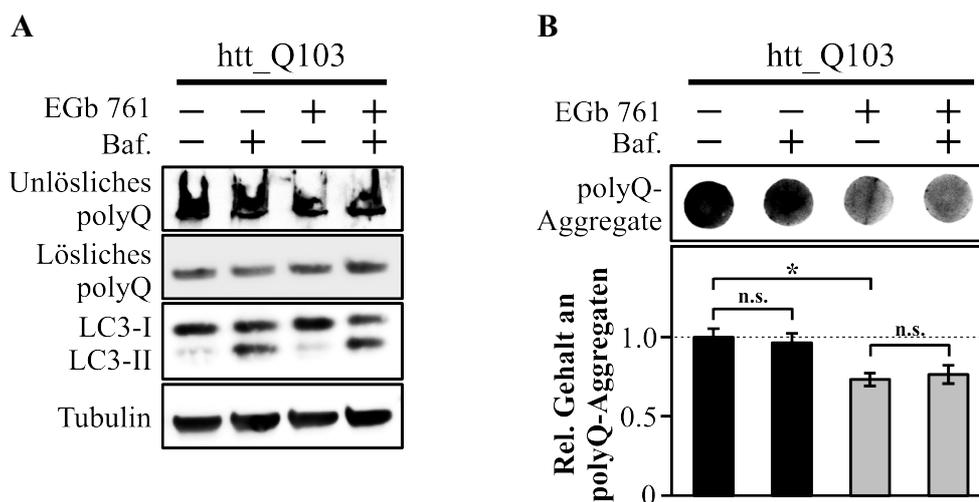


Abbildung 3.16: Immunoblot-Analyse (A) der EGb 761-Wirkung auf den autophagosomalen Abbau von aberranten polyQ-Proteinen, sowie Filterretardierungs-Test (B) zur Analyse der polyQ-Aggregate. HEK293-Zellen mit transienten Expressionen von htt_Q103 wurden für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden zusätzlich alle Zellen für 3 h mit 1 µM Bafilomycin (Baf.) bzw. Lösungsmittel (DMSO) inkubiert und Zellysate gesammelt. **(A)** Immunoblot-Analyse des Gehalts an löslichen und unlöslichen polyQ-Proteinen, sowie von LC3-Proteinen unter Autophagie-Inhibition (Baf.-Inkubation). n=3. **(B)** Untersuchungen der Zellysate mittels Filterretardierungs-Test. PolyQ-Aggregate wurden mit einem anti-GFP-Antikörper visualisiert und der Gehalt an polyQ-Aggregaten unter Autophagie-Inhibition (Baf.-Inkubation) analysiert und densitometrisch quantifiziert. Zur quantitativen Darstellung des relativen Gehalts an polyQ-Aggregaten, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) ohne Baf.-Inkubation als 1 gesetzt. n=3. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05. n.s.: nicht signifikant.

Dementsprechend konnten diese Beobachtungen demonstrieren, dass der autophagosomalen Abbau keinen Einfluss auf die EGb 761-induzierte Reduzierung von unlöslichen polyQ-Proteinen hatte,

wodurch die postulierte EGb 761-induzierte verbesserte proteasomale Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen gefestigt wurde (Ergebnisse 3.4.2).

Zur abschließenden Überprüfung, ob die EGb 761-induzierte Reduzierung der polyQ-Aggregate, durch einen zusätzlichen Abbau von polyQ-Aggregaten über die Autophagie vermittelt wurde, erfolgte die Analyse der durchgeführten Filterretardierungs-Tests (Abb. 3.16 B). Anhand der ersten Analysen der Filterretardierungs-Tests konnte festgestellt werden, dass die EGb 761-Behandlung den Gehalt an polyQ-Aggregaten auf das 0,73-fache der Kontrolle reduzierte (Abb. 3.16 B), wodurch die vorherigen Beobachtungen bestätigt wurden (Ergebnisse 3.3.3). Interessanterweise ergaben die weiteren Analysen, dass die pharmakologische Inhibition der Autophagie weder in Lösungsmittel-behandelten Zellen (0,97-fache der Kontrolle) noch in EGb 761-behandelten Zellen (0,77-fache der Kontrolle) signifikante Veränderungen im Gehalt an polyQ-Aggregaten verursachte (Abb. 3.16 B). Somit demonstrierten diese Ergebnisse, dass es in beiden Behandlungen zu keinem autophagosomalen Abbau von polyQ-Aggregaten kam und somit die EGb 761-Behandlung keinen Abbau der polyQ-Aggregate über die Autophagie induzierte. Zusammenfassend konnten diese Ergebnisse demonstrieren, dass in dem verwendeten Zellmodell der Mechanismus der Autophagie nicht im Abbau von polyQ-Proteinen und polyQ-Aggregaten beteiligt war (Li et al., 2010). In Folge dessen konnte auch die EGb 761-Behandlung keine Wirkung auf einen autophagosomalen Abbau von polyQ-Aggregaten haben, wodurch die postulierte EGb 761-Wirkung auf polyQ-Aggregate durch eine verbesserte Degradation von polyQ-Proteinen gefestigt wurde (Ergebnisse 3.4.3).

3.4.5 Zusammenfassung der EGb 761 -Wirkung auf den Abbau von polyQ-Proteinen

Wie die durchgeführten Untersuchungen (Ergebnisse 3.4) zeigen konnten, bewirkte die EGb 761-Behandlung eine erhöhte proteasomale Proteindegradation, wodurch der Proteingehalt von d2GFP- und PolyUB-Proteinen vermindert wurde, es aber hierdurch zu keinem Effekt auf lösliche polyQ-Proteine (htt_Q25, htt_Q103) kam. Da weder eine EGb 761-Behandlung, noch eine pharmakologische Proteasom-Inhibition eine Auswirkung auf die löslichen polyQ-Proteine hatte, wurde vermutet, dass polyQ-Proteine mit einer korrekten Proteinfaltung eine hohe Halbwertszeit besaßen. Wie die Untersuchungen in htt_Q103-Zellen zeigten, konnte zudem vermutet werden, dass die unlöslichen Proteine durch die Aggregation von kurzlebigen polyQ-Proteinen entstanden, welche auf Grund von Fehlfaltung eine kurze Halbwertszeit besaßen. Somit konnte hierdurch gezeigt werden, dass die EGb 761-Behandlung eine erhöhte proteasomale Degradation von

fehlgefalteten polyQ-Proteinen bewirkte und somit der Gehalt an aggregierten, unlöslichen polyQ-Proteinen reduzierte wurde.

Abschließenden konnten weitere Untersuchungen zeigen, dass die EGb 761-Behandlung keine Wirkungen auf die Autophagie verursachte. Zudem konnte auch keine Beteiligung der Autophagie im Abbau von polyQ-Proteinen und polyQ-Aggregaten nachgewiesen werden, wodurch eine EGb 761-Wirkung auf den autophagosomalen Abbau von polyQ-Aggregaten ausgeschlossen wurde. Folglich konnte durch diese Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die EGb 761-Wirkung auf die Bildung der polyQ-Aggregate auf einer erhöhten polyQ-Proteindegradation beruhte.

3.5 Untersuchungen zur Wirkung von EGb 761 auf polyQ-Proteine in primären

humanen Fibroblasten

Angeichts der Tatsache, dass die bisher dargestellten Versuche in klonalen HEK293-Zellen durchgeführt wurden, sollten für die Untersuchung einer möglichen therapeutischen Wirkung von EGb 761 in der HD weitere Experimente in primären humanen Zellen durchgeführt werden.

Hierzu wurden normale humane Fibroblasten (IMR-90) herangezogen, da diese nur eine gewisse Anzahl von Zellteilungen bis zum Erreichen der Postmitose durchlaufen und folglich auch als Modell der replikativen Seneszenz gelten (Hayflick and Moorhead, 1961). Vor diesem Hintergrund konnte somit auch eine Wirkung von EGb 761 auf die Aggregation von polyQ-Proteinen unter der Prämisse der replikativen Seneszenz untersucht werden. Darüber hinaus galt dieses Zellmodell im Hinblick auf die zellulären Mechanismen der Proteindegradation als gut beschrieben, wodurch die Interpretation der Experimente erleichtert wurde (Gamerding et al., 2009). Zur besseren Auswertung der Experimente und für die Interpretation der Ergebnisse wurden die Experimente mit IMR-90-Zellen analog zu den Experimenten mit klonalen HEK293-Zellen durchgeführt (Ergebnisse 3.3). Hierzu wurde die Wirkung von EGb 761 auf die polyQ-Aggregation zuerst in jungen Fibroblasten untersucht. Anschließend sollten einige Schlüsselexperimente in gealterten Zellen durchgeführt werden, um einen möglichen Alterseffekt zu eruieren.

3.5.1 EGb 761 reduziert die Anzahl von polyQ-Proteinaggregaten in jungen Fibroblasten

Für die Untersuchung der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine und polyQ-Aggregate wurden junge Fibroblasten sequentiell passagiert. Beim Erreichen einer Populationsverdopplungen von 32 (PD32), wurden in den Zellen die Proteine eGFP, htt_Q25, htt_Q46 und htt_Q103 transient zur Expression gebracht. Danach wurden die Zellen für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Abschließend erfolgte die Untersuchung der exprimierten Proteine anhand ihrer GFP-Fluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Wie die ersten mikroskopischen Analysen ergaben, kam es in eGFP- und htt_Q25-Zellen zu einer gleichförmigen Verteilung der GFP-Fluoreszenz mit ähnlichen Intensitäten (Abb. 3.17 A). Hierbei konnten zwischen der EGb 761-Behandlung und der Kontrollbehandlung keine merklichen Unterschiede in den Fluoreszenzeigenschaften festgestellt werden und somit anscheinend auch keine Unterschiede im Gehalt der exprimierten Proteine vorlagen (Abb. 3.17 A). Folglich waren diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Beobachtungen in HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.3.1).

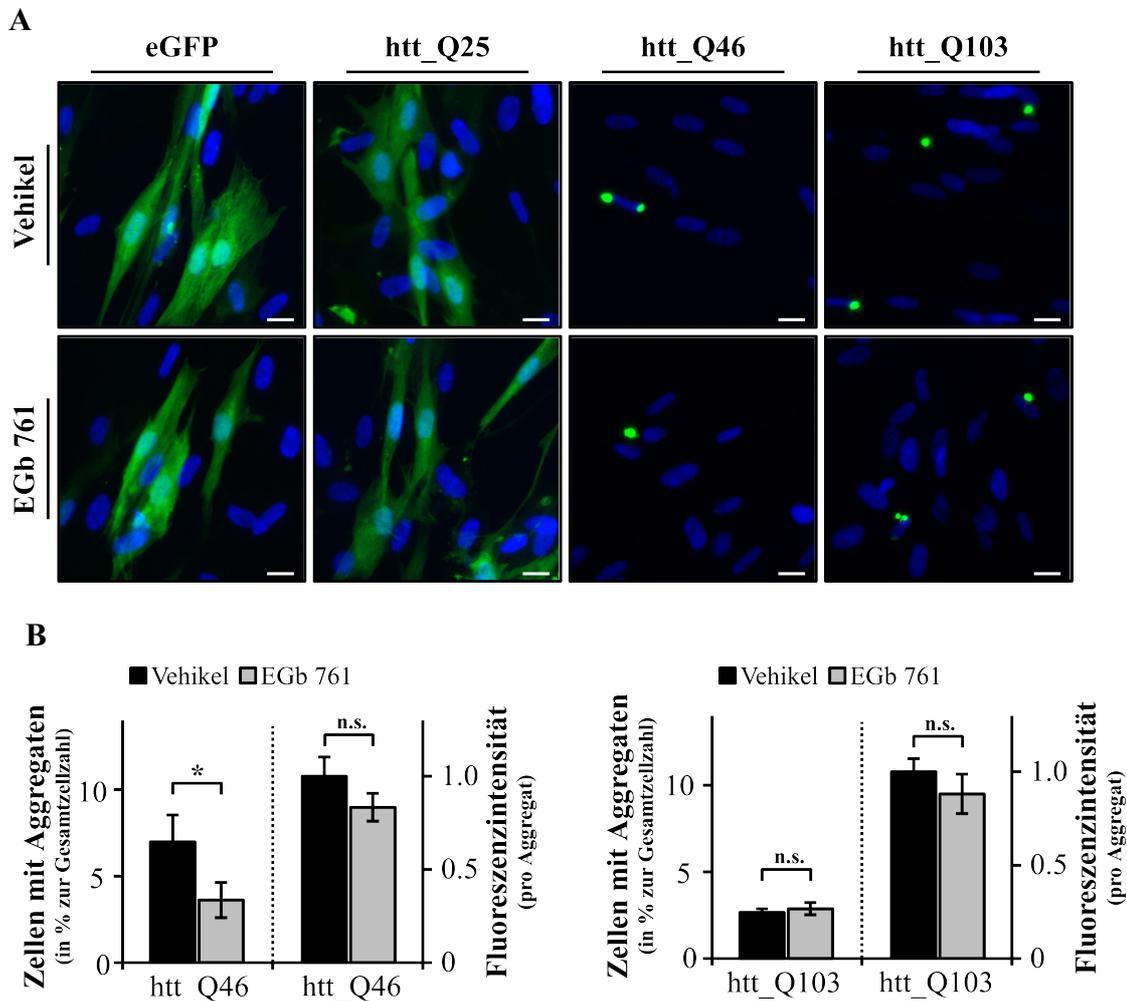


Abbildung 3.17: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine und polyQ-Aggregate in jungen Fibroblasten (IMR-90-Zellen). IMR-90-Zellen (PD32) mit transienten Expressionen der Proteine eGFP, htt_Q25, htt_Q46 und htt_Q103 wurden für 48 h mit 150 $\mu\text{g/ml}$ EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop untersucht. **(A)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Zellen. Die exprimierten Proteine wurden über GFP-Fluoreszenz, sowie die Zellkerne über DAPI-Fluoreszenz nachgewiesen. Repräsentative Bilder sind gezeigt. Zur Aufnahme der polyQ-Aggregate mussten verschiedene Belichtungszeiten verwendet werden. Maßstabsbalken: 20 μm . **(B)** Graphische Auswertung der GFP-Fluoreszenz von htt_Q46- und htt_Q103-Zellen. Dargestellt ist die Anzahl Aggregat-tragender Zellen (%), sowie die relative Fluoreszenzintensität der Aggregate. $n=3$. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: $p < 0.05$. n.s.: nicht signifikant.

Wie die weiteren Analysen zeigten, kam es auch in IMR-90-Zellen durch die Expression der htt_Q46- und htt_Q103-Proteine zu einer Akkumulation der GFP-Fluoreszenz bzw. Aggregation der polyQ-Proteine (Abb. 3.17 A). Hierbei ergab die quantitative Analyse der fluoreszierenden Proteinaggregate, dass nur 7 % der htt_Q46-Zellen und 2,7 % der htt_Q103-Zellen polyQ-Aggregate bildeten (Abb. 3.17 B), womit hier die Anzahl Aggregat-tragender Zellen deutlich

niedriger war als in den analysierten HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.3.1). Diese beobachtete reduzierte Anzahl an Aggregat-tragenden Zellen, in Korrelation mit der Länge der exprimierten polyQ-Proteine, wurde als zytotoxischer Effekt der Aggregatbildung gedeutet (Nucifora et al., 2001).

Interessanterweise führte die EGb 761-Behandlung in htt_Q46-Zellen zu einer signifikanten Reduzierung der Aggregat-tragenden Zellen von 7 % auf 3,6 % (0,51-fache der Kontrolle), sowie zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität der Aggregate um 17 % (0,83-fache der Kontrolle) (Abb. 3.17 B). Zudem konnte in EGb 761-behandelten htt_Q103-Zellen eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität der Aggregate um 12 % (0,88-fache der Kontrolle) beobachtet werden, mit keinen signifikanten Veränderungen in der Anzahl der Aggregat-tragenden Zellen (1,07-fache der Kontrolle) (Abb. 3.17 B). Demzufolge konnte die EGb 761-Behandlung auch in primären humanen Zellen (IMR-90), mit Expressionen aberrant verlängerter polyQ-Proteine, die Menge an aggregiertem polyQ-Protein reduzieren (Fluoreszenzintensität) und teilweise die Bildung von polyQ-Aggregaten vermindern (htt_Q46-Zellen). Folglich waren diese Beobachtungen vergleichbar mit den Ergebnissen aus klonalen HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.3.1), wodurch auch für die IMR-90-Zellen vermutet werden konnte, dass die EGb 761-Wirkung auf einer verbesserten Degradation von aberranten polyQ-Proteinen beruhte (Li et al., 2008).

3.5.2 EGb 761 vermindert den Gehalt von aggregierten polyQ-Proteinen in jungen Fibroblasten

Zur weiteren Untersuchung der molekularen Wirkung von EGb 761 auf polyQ-Proteine und polyQ-Aggregate in jungen Fibroblasten, wurden IMR-90-Zellen (PD32) mit Expressionen verschiedener polyQ-Protein mittels proteinbiochemischer Methoden untersucht.

Hierzu wurden IMR-90-Zellen mit transienten Expression der polyQ-Proteine htt_Q25, htt_Q46 und htt_Q103 für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt und anschließend Lysate der Zellen mittels Immunoblotting und Filterretardierungs-Test analysiert. Hierbei wurde, wie in den Untersuchungen mit HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.3.2), auf eine Analyse von eGFP-exprimierenden Zellen verzichtet, da die fluoreszenzmikroskopischen Analysen keine deutlichen Unterschiede zu htt_Q25-Zellen aufzeigten (Ergebnisse 3.5.1).

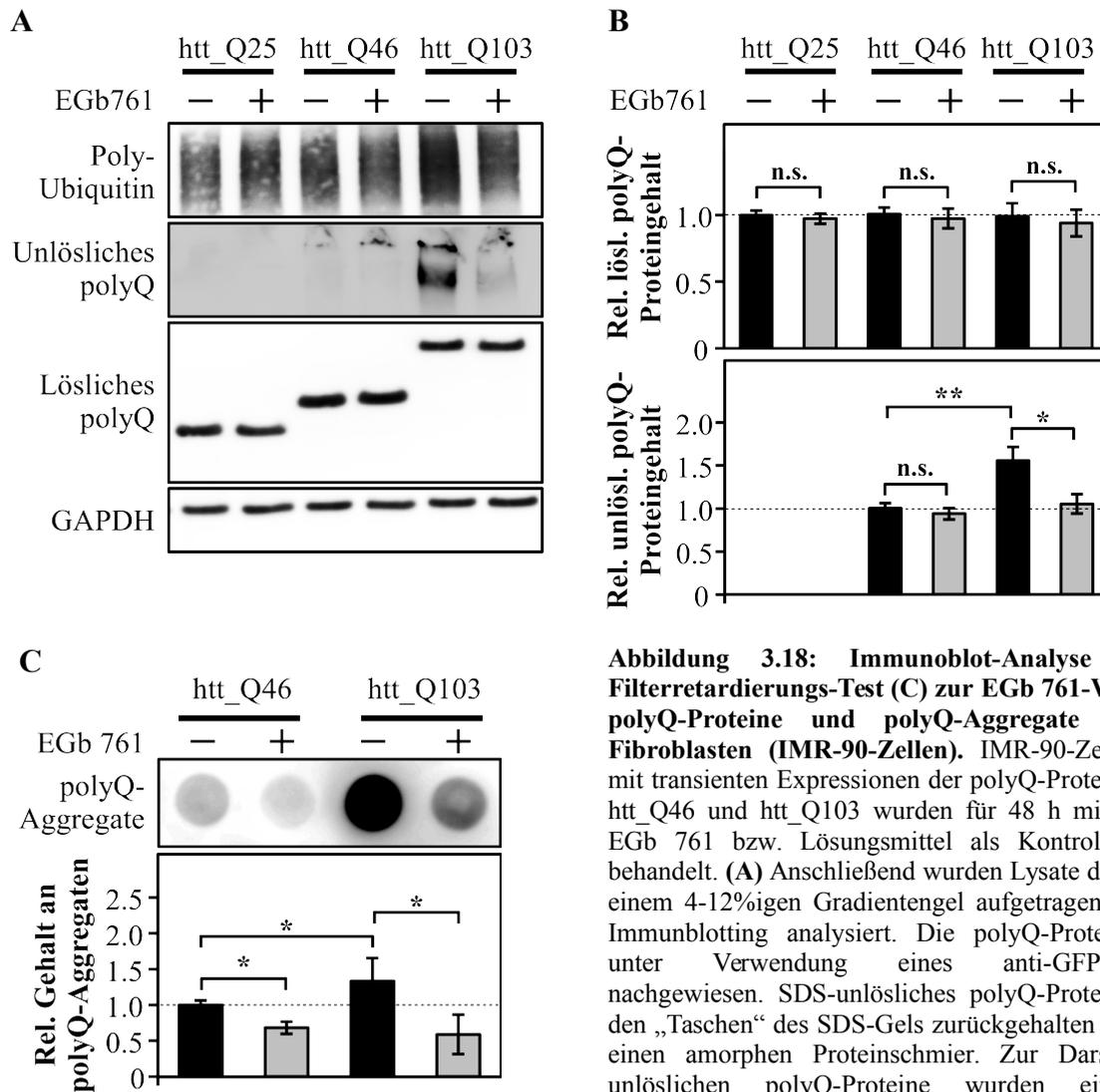


Abbildung 3.18: Immunoblot-Analyse (A) und Filterretardierungs-Test (C) zur EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine und polyQ-Aggregate in jungen Fibroblasten (IMR-90-Zellen). IMR-90-Zellen (PD32) mit transienten Expressionen der polyQ-Proteine htt_Q25, htt_Q46 und htt_Q103 wurden für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. (A) Anschließend wurden Lysate der Zellen auf einem 4-12%igen Gradientengel aufgetragen und mittels Immunblotting analysiert. Die polyQ-Proteine wurden unter Verwendung eines anti-GFP-Antikörpers nachgewiesen. SDS-unlösliches polyQ-Protein wurde in den „Taschen“ des SDS-Gels zurückgehalten und bildeten einen amorphen Proteinschmier. Zur Darstellung der unlöslichen polyQ-Proteine wurden eine längere Expositionszeit gewählt. Zusätzlich wurde der Gehalt an PolyUB-Proteinen untersucht.

(B) Der Gehalt an SDS-löslichen und SDS-unlöslichen polyQ-Proteinen wurde densitometrisch gemessen und quantifiziert. Zur quantitativen Darstellung des relativen Proteingehalts von löslichen polyQ-Proteinen, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) von htt_Q25-Zellen als 1 gesetzt. Zur quantitativen Darstellung des relativen Proteingehalts von unlöslichen polyQ-Proteinen, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) von htt_Q46-Zellen als 1 gesetzt. n=3. (C) Untersuchungen der Zellysate von htt_Q46- und htt_Q103-Zellen mittels Filterretardierungs-Test. PolyQ-Aggregate wurden mit einem anti-GFP-Antikörper visualisiert und der Gehalt an polyQ-Aggregaten analysiert. Zur quantitativen Darstellung des relativen Gehalts an polyQ-Aggregaten, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) von htt_Q46-Zellen als 1 gesetzt. n=3. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Wie die durchgeführten Immunoblot-Analysen der IMR-90-Zellen ergaben, konnten auch hier Proteinbanden von löslichem polyQ-Protein festgestellt werden, welche entsprechend ihrer molekularen Größe im SDS-Gel migrierten, sowie unlösliche polyQ-Proteine, welche in den Taschen der SDS-Gele akkumulierten (Abb. 3.18 A). Interessanterweise ergaben die

densitometrischen Analysen der löslichen polyQ-Proteine, dass keine signifikante Unterschiede im Gehalt an löslichem polyQ-Protein zwischen htt_Q25-Zellen (diese Werte wurden gleich 1 gesetzt), htt_Q46-Zellen und htt_Q103-Zellen existierten (Abb. 3.18 B). Diese Ergebnisse standen im Kontrast zu den Beobachtungen in HEK293-Zellen, in welchen der Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen mit zunehmender Länge der polyQ-Proteine signifikant abnahm (Ergebnisse 3.3.2). Hierfür wurde vermutet, dass ein verringerte Metabolismus der IMR-90-Zellen, gegenüber den HEK293-Zellen, zu mehr fehlerfrei gefalteten aberranten polyQ-Proteinen führte, wodurch auch die in der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet geringere Aggregatbildung (Ergebnisse 3.5.1) erklären würde (King et al., 2008). In Übereinstimmung mit den Beobachtungen in HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.3.2) konnten in allen untersuchten EGb 761-behandelten IMR-90-Zellen keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen im Vergleich zur Lösungsmittelbehandlung festgestellt werden und somit EGb 761 keine Wirkung auf die Expression der einzelnen Proteine hatte (Abb. 3.18 B).

Zusätzlich wurde der Gehalt von Polyubiquitin-Proteinen (PolyUB-Proteinen) untersucht, um die Proteasom-Aktivität in den behandelten IMR-90-Zellen zu analysieren (Abb. 3.18 A). Wie die Ergebnisse aus 3.4.1 zeigten, führte eine Proteasom-Inhibition zu einer Akkumulation der PolyUB-Proteine, wodurch sich die Untersuchung dieser Proteine sehr gut zur Analyse der Proteasom-Aktivität eignete (Myung et al., 2001). Hierbei wurde aus technischen Gründen auf eine quantitative Analyse des PolyUB-Proteinschmiers verzichtet. Wie die Analysen der Immunoblots zeigten, kam es zwischen htt_Q25-Zellen und htt_Q46-Zellen nur einer geringen Zunahme an PolyUB-Proteinen, wohingegen der Gehalt an PolyUB-Proteinen in htt_Q103-Zellen deutlich anstieg (Abb. 3.18 A). Hierdurch wurde demonstriert, dass es auch in IMR-90-Zellen, mit zunehmender Länge der exprimierten polyQ-Proteine, zu einer verringerten Proteasom-Aktivität kam (Verhoef et al., 2002). Im Gegensatz hierzu, führte die EGb 761-Behandlung in htt_Q46-Zellen zu einer leichten Reduzierung der PolyUB-Proteine, sowie in htt_Q103-Zellen zu einer sehr deutlichen Reduzierung der PolyUB-Proteine (Abb. 3.18 A). Dementsprechend demonstrierten diese Ergebnisse, dass auch in IMR-90-Zellen mit Expressionen aberranter polyQ-Proteinen die EGb 761-Behandlung zu einer Verbesserung der Proteasom-Aktivität führte.

Durch längere Expositionszeiten der Immunoblots, wurden in den Proben von htt_Q46- und htt_Q103-Zellen unlöslichen polyQ-Proteinen im SDS-Sammelgel sichtbar (Abb. 3.18 A). Wie die densitometrischen Analysen der unlöslichen polyQ-Proteine ergaben, stieg der Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen in htt_Q103-Zellen auf das 1,55-fache von htt_Q46-Zellen (Werte

wurden gleich 1 gesetzt) (Abb. 3.18 B), wodurch auch in IMR-90-Zellen die Korrelation zwischen der polyQ-Proteinlänge und der polyQ-Aggregation verdeutlicht wurde (Krobitsch and Lindquist, 2000). Hierbei konnte die EGb 761-Behandlung den Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen in htt_Q46-Zellen auf das 0,86-fache, sowie in htt_Q103-Zellen auf das 1,05-fache (32 %) der Kontrolle reduzieren (Abb. 3.18 B).

Vor diesem Hintergrund wurden zur besseren quantitativen Analyse der aggregierten polyQ-Proteine die Proben von htt_Q46- und htt_Q103-Zellen mittels Filterretardierungs-Test analysiert (Scherzinger et al., 1997). Hierbei konnten die durchgeführten Untersuchungen bestätigen, dass mit zunehmender Länge der polyQ-Proteine zu einer erhöhten Bildung von polyQ-Aggregaten kam (Abb. 3.18 C). Wie die quantitative Analyse ergab, wurde der Gehalt an polyQ-Aggregaten in htt_Q103-Zellen auf das 1,33-fache von htt_Q46-Zellen (Werte wurden gleich 1 gesetzt) gesteigert (Abb. 3.18 C). Entsprechend den Ergebnissen der Immunoblot-Analysen konnte durch die EGb 761-Behandlung der Gehalt an polyQ-Aggregaten in htt_Q46-Zellen auf das 0,68-fache, sowie in htt_Q103-Zellen auf das 0,59-fache der Kontrolle reduziert werden (Abb. 3.18 C). Folglich konnten diese Ergebnisse die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen einer EGb 761-induzierten Reduzierung der Fluoreszenzintensität, sowie Anzahl der Aggregate bestätigen (Ergebnisse 3.5.1). Interessanterweise korrelierten diese Ergebnisse auch mit den Beobachtungen in HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.3), wodurch auch für IMR-90-Zellen vermutet werden konnte, dass die EGb 761-Wirkung auf einer verminderten polyQ-Proteinaggregation durch eine erhöhte Degradation von fehlgefalteten, aberranten polyQ-Proteinen beruhte (Michalik and Van Broeckhoven, 2004).

3.5.3 EGb 761 reduziert die Anzahl und den Gehalt von polyQ-Aggregaten in seneszenten Fibroblasten

Wie die Untersuchungen in jungen Fibroblasten (IMR-90) demonstrierten, konnte durch die EGb 761-Behandlung ein positiver Effekt auf die Aggregation von aberranten polyQ-Proteinen erzielt werden (Ergebnisse 3.5.1 und 3.5.2). Da es in der HD zu altersassoziierte Veränderungen in der Bildung von polyQ-Aggregaten kommt (Bano et al., 2011), wurden für die Untersuchung einer möglichen therapeutischen Wirkung von EGb 761 in der HD weitere Untersuchungen in gealterten Fibroblasten durchgeführt. Darüber hinaus wurde in diesem Altersmodell der replikativen Seneszenz eine Verschiebung der Proteindegradation vom Proteasom zur Autophagie beschrieben (Gamerding et al., 2009), wodurch die Interpretation der durchgeführten Experimente erleichtert

wurde.

Auf Grund der Beobachtungen in jungen Fibroblasten (Ergebnisse 3.5.1 und 3.5.2), wurden für die Untersuchungen in seneszenten Fibroblasten nur einige Schlüsselexperimente durchgeführt und hierfür nur htt_Q103-exprimierende IMR-90-Zellen dargestellt. Zur Versuchsdurchführung wurden junge Fibroblasten bis zum Erreichen einer Populationsverdopplungen von 46 (PD46) sequentiell passagiert. Danach wurden in diesen gealterten Fibroblasten htt_Q103-Proteine transient zur Expression gebracht und die Zellen für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie auf die Bildung von polyQ-Aggregaten untersucht, sowie zusätzlich Lysate der Zellen mittels Filterretardierungs-Test auf ihren Gehalt an polyQ-Aggregate analysiert.

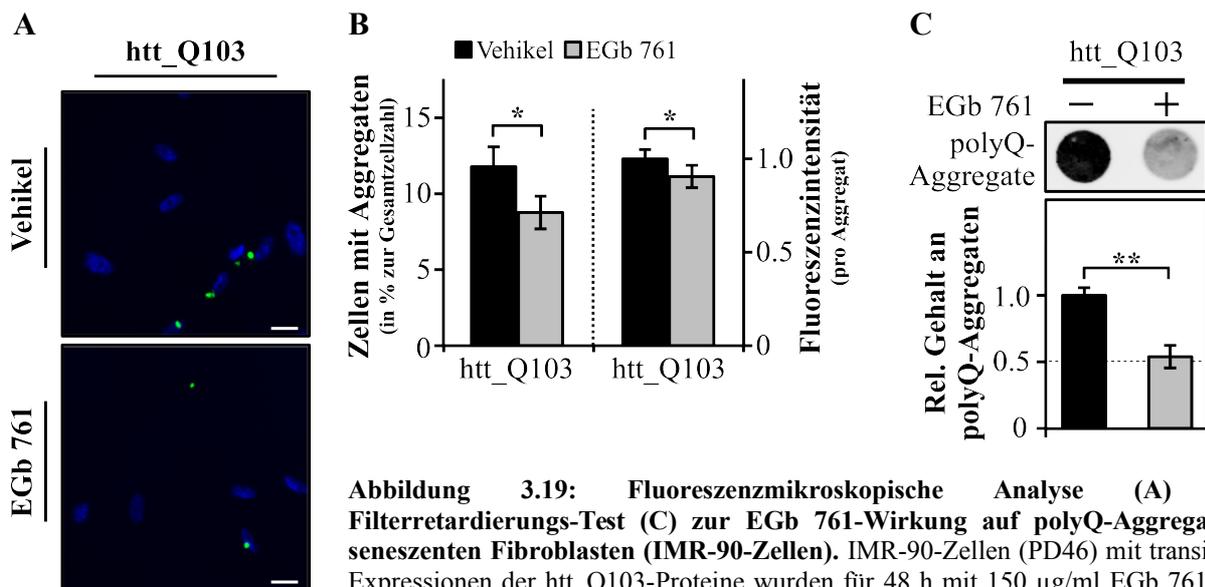


Abbildung 3.19: Fluoreszenzmikroskopische Analyse (A) und Filterretardierungs-Test (C) zur EGb 761-Wirkung auf polyQ-Aggregate in seneszenten Fibroblasten (IMR-90-Zellen). IMR-90-Zellen (PD46) mit transienten Expressionen der htt_Q103-Proteine wurden für 48 h mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) behandelt.

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Zellen. Die exprimierten Proteine wurden über GFP-Fluoreszenz, sowie die Zellkerne über DAPI-Fluoreszenz nachgewiesen. Repräsentative Bilder sind gezeigt. Maßstabsbalken: 20 µm. (B) Graphische Auswertung der GFP-Fluoreszenz von htt_Q103-Zellen. Dargestellt ist die Anzahl Aggregat-tragender Zellen (%), sowie die relative Fluoreszenzintensität der Aggregate. n=5. (C) Untersuchungen der Zellysate von htt_Q103-Zellen mittels Filterretardierungs-Test. PolyQ-Aggregate wurden mit einem anti-GFP-Antikörper visualisiert und der Gehalt an polyQ-Aggregaten analysiert. Zur quantitativen Darstellung des relativen Gehalts an polyQ-Aggregaten, wurden die Werte der Kontrolle (Vehikel) als 1 gesetzt. n=3. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01.

Wie die ersten mikroskopischen fluoreszenzmikroskopischen Analysen ergaben, kam es auch in

seneszenten Fibroblasten zu einer Akkumulation der GFP-Fluoreszenz bzw. Aggregation der exprimierten htt_Q103-Proteine (Abb. 3.19 A). Interessanterweise ergab die quantitative Analyse der fluoreszierenden Proteinaggregate, dass 11,8 % der Zellen polyQ-Aggregate bildeten (Abb. 3.19 B), womit hier die Anzahl Aggregat-tragender Zellen deutlich höher war, als in den untersuchten jungen Fibroblasten (Ergebnisse 3.5.1). Da es im Laufe der replikativen Seneszenz zu einer verringerten proteasomale Aktivität kommt (Gamerdinger et al., 2009), konnte für diese Beobachtungen vermutet werden, dass es in den seneszenten Zellen zu einem reduzierten proteasomalen Abbau von fehlgefalteten polyQ-Proteinen kam und hierdurch die Anzahl an Aggregat-tragenden Zellen anstieg (Li et al., 2010). Wie die weiteren mikroskopischen Analysen zeigten, führte die EGb 761-Behandlung zu einer signifikanten Reduzierung der Aggregat-tragenden Zellen auf das 0,74-fache der Kontrolle, sowie zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität der Aggregate auf das 0,85-fache der Kontrolle (Abb. 3.19 B).

Vor diesem Hintergrund ergab die Untersuchungen der Zellysate mittels Filterretardierungs-Assay, dass die EGb 761-Behandlung der Zellen zu einer signifikanten Reduzierung im Gehalt an polyQ-Aggregaten auf das 0,54-fache der Kontrolle führte (Abb. 3.19 C) und bestätigte die Beobachtungen der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 3.19 B). Folglich führte die EGb 761-Behandlung auch in seneszenten Fibroblasten zu einer Reduktion von aggregiertem polyQ-Protein, sowie zu einer reduzierten Bildung von polyQ-Aggregaten. Erstaunlicherweise waren diese Ergebnisse äquivalent zu den Beobachtungen in jungen Fibroblasten (Ergebnisse 3.5.2), sowie HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.3.3). Folglich wurde vermutet, dass die EGb 761-Behandlung auch in seneszenten Fibroblasten zu einer erhöhten Proteasom-Aktivität führte, hierdurch die Degradation von fehlgefalteten, aberranten polyQ-Proteinen verbessert wurde und somit die Aggregation der polyQ-Proteine vermindert wurde (Michalik and Van Broeckhoven, 2004).

3.5.4 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine in humanen Fibroblasten

Wie die durchgeführten Untersuchungen (Ergebnisse 3.5) in primären humanen Fibroblasten zeigen konnten, verursachte die Expression von aberrant verlängerten polyQ-Proteinen eine Akkumulation von SDS-resistenten, aggregierten polyQ-Proteinen, sowie die Bildung von polyQ-Aggregaten. Interessanterweise kam es in seneszenten IMR-90-Zellen zu einer erhöhten Bildung von polyQ-Aggregaten gegenüber jungen IMR-90-Zellen. Als Ursache hierfür wurde eine verringerte proteasomale Aktivität vermutet, welche im Lauf der replikativen Seneszenz auftritt (Gamerdinger

et al., 2009), wodurch es zu einem reduzierten proteasomalen Abbau von fehlgefalteten polyQ-Proteinen kam und hierdurch mehr polyQ-Aggregate gebildet wurden (Li et al., 2010). Erstaunlicherweise konnte gezeigt werden, dass eine EGb 761-Behandlung in jungen als auch in seneszenten Fibroblasten zu einer Reduzierung von aggregierten polyQ-Proteinen und polyQ-Aggregaten führte. Interessanterweise waren diese Beobachtungen äquivalent zu den Beobachtungen in HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.3), wodurch vermutet werden konnte, dass es auch in IMR-90-Zellen zu einer EGb 761-induzierten verbesserten proteasomalen Degradation von polyQ-Proteinen kam (Ergebnisse 3.4) und somit die polyQ-Proteinaggregation reduziert wurde (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Angesichts dieser Ergebnisse mit primären humanen Fibroblasten wurde postuliert, dass eine EGb 761-Behandlung eine mögliche Bedeutung in der Therapie der HD haben könnte.

3.6 Untersuchungen zur Wirkung von EGb 761 auf transgene *C. elegans* als *in vivo*-Model der HD

Anhand der durchgeführten Untersuchungen in zellulären Modellen der HD konnte beobachtet werden, dass eine EGb 761-Behandlung der Zellen zu einer verminderten Aggregation von polyQ-Proteinen führte. Folglich stellte sich die Frage, ob diese Wirkung von EGb 761 auch *in vivo* nachzuweisen wäre. Somit sollten hierfür transgene Stämme von *C. elegans* als Modellsystem der HD herangezogen werden, um die Wirkung von EGb 761 auf die Aggregation von polyQ-Proteinen *in vivo* zu testen.

Hierzu wurden transgene Wurmstämme über das „Caenorhabditis Genetic Center“ (USA) bezogen, welche Fusionsproteine aus kurzen polyQ-Peptiden und YFP (polyQ-YFP) im Muskelgewebe exprimierten (Morley et al., 2002). Hierbei handelte es sich um transgene Nematoden aus dem Stamm AM141, welche Fusionsproteine mit 40 Glutamin-Resten (Q40) exprimierten und im adulten Wurm fluoreszierende polyQ-Aggregate bildeten. Darüber hinaus verfügten Nematoden dieses Wurmstamms über einen ausgeprägten Phänotyp, in welchem die Bildung der polyQ-Proteinaggregate mit einer verminderten Beweglichkeit des Wurms korrelierte (Morley et al., 2002). Als Kontrolle wurden transgene Würmer aus dem Stamm AM134 untersucht, in welchen die exprimierten Fusionsproteine mit 0 Glutamin-Resten (Q0) vorlagen und es im adulten Wurm zu einer gleichförmigen Verteilung der Proteine im Muskelgewebe kam (Morley et al., 2002). Zur Applikation von EGb 761 in transgenen Nematoden wurden zuerst bakteriellen Kulturen mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) supplementiert und anschließend auf NGM-Platten verteilt, wo sie den Nematoden als Nahrung dienten. Dementsprechend wurden für die Versuchsdurchführung synchronisierte Nematoden bis zum Adultstadium von 3 Tagen (d3) auf präparierten NGM-Platten kultiviert und anschließend untersucht.

3.6.1 EGb 761 reduziert den Gehalt an aggregierten polyQ-Proteinen in transgenen *C. elegans*

Auf Grund der Transparenz der Nematoden konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie die Expression der Fusionsproteine und ihre Aggregation in der Körperwand nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der EGb 761-Wirkung auf die Aggregation von polyQ-Proteinen, wurden Q0- und Q40-exprimierende Nematoden bis zum Erreichen eines Adultstadiums von 3 Tagen (d3) auf NGM-Platten mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) kultiviert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der exprimierten polyQ-Proteine anhand ihrer YFP-Fluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskopie.

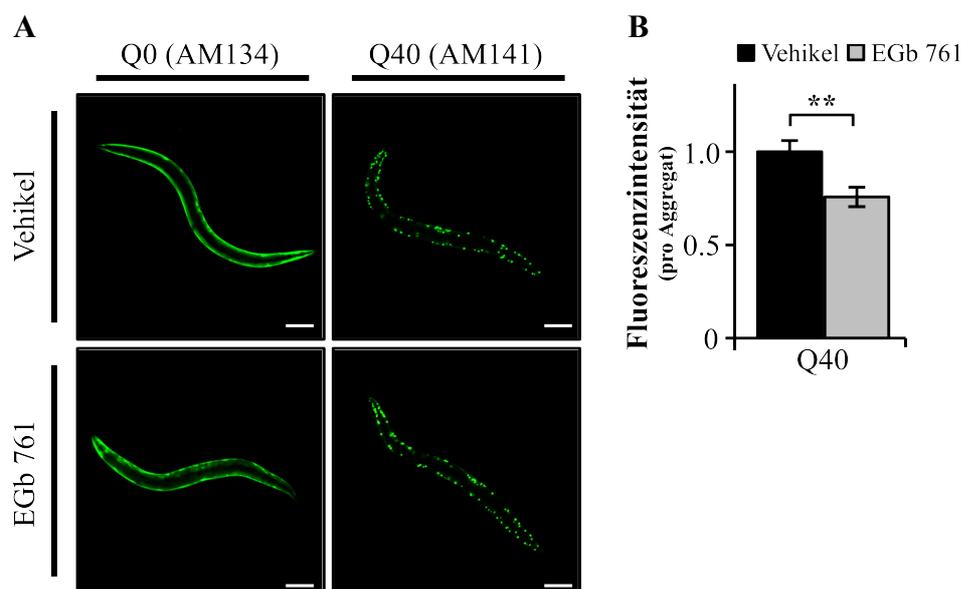


Abbildung 3.20: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine in transgenen *C. elegans*. Transgene *C. elegans* mit Expressionen von polyQ-Fusionsproteinen mit 40 Glutamin-Resten (Q40) bzw. 0 Glutamin-Resten (Q0) wurden dauerhaft mit 150 $\mu\text{g/ml}$ EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) kultiviert. Beim Erreichen eines Adultstadiums von 3 Tagen (d3) wurden einzelne Nematoden auf einen Objektträger transferiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. **(A)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Nematoden. Nachweis der polyQ-Proteine über YFP-Fluoreszenz (hier grün dargestellt). Repräsentative Bilder sind gezeigt. Maßstabsbalken: 0,1 mm. **(B)** Graphische Auswertung der Fluoreszenzintensität der polyQ-Aggregate in Q40-Nematoden. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität der Aggregate. $n=5$. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. **: $p<0.01$.

Wie die ersten Analysen der Fluoreszenzmikroskopie ergaben, kam es in Q0-Nematoden zu einer gleichförmig verteilten Fluoreszenz der exprimierten polyQ-Proteine in der Körperwand der Nematoden, während in Q40-Nematoden fluoreszierende polyQ-Proteinaggregate vorlagen (Abb. 3.20 A). Hierdurch wurde deutlich, dass die Expression von aberrant verlängerten polyQ-Proteinen auch in transgenen *C. elegans* zur Bildung von polyQ-Aggregaten führte (Satyal et al., 2000). Auf Grund eines beschriebenen Polymorphismus in der Anzahl der Aggregate einzelner Q40-Nematoden, konnte in diesem Experiment die Anzahl an Aggregaten leider nicht bestimmt werden (Morley et al., 2002). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die EGb 761-Kultivierung von Q0-Nematoden zu keinen deutlichen Veränderungen in der Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle führte (Abb.3.20 A). Im Gegensatz hierzu führte die EGb 761-Kultivierung von Q40-Nematoden zu einer signifikanten Reduzierung der Fluoreszenzintensität der Aggregate auf das 0,76-fache der Kontrolle (Abb. 3.20B). Folglich konnte auch *in vivo* gezeigt werden, dass es durch die Kultivierung der Nematoden mit EGb 761, zu einer Reduzierung von aggregiertem polyQ-Protein kam.

Interessanterweise waren diese Ergebnisse vergleichbar mit den Beobachtungen in zellulären Modellen der HD.

3.6.2 EGb 761 vermindert die Aggregation von polyQ-Proteinen in transgenen *C. elegans*

Zur weiteren Untersuchung der molekularen EGb 761-Wirkungen auf polyQ-Proteine in transgenen *C. elegans* wurden die Nematoden mittels proteinbiochemischer Methoden auf die exprimierten polyQ-Proteine untersucht.

Hierzu wurden Q0- und Q40-exprimierende Nematoden dauerhaft mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) kultiviert. Anschließend wurden Totallysate von 3 Tage alten Nematoden mittels Immunoblotting sowie mittels Filterretardierungs-Test untersucht und der Gehalt an polyQ-Proteinen, polyQ-Aggregaten und Polyubiquitin-Proteinen (PolyUB-Proteine) analysiert.

Wie die ersten durchgeführten Immunoblot-Analysen ergaben, konnten auch in den Proben der Nematoden lösliche polyQ-Protein festgestellt werden, welche entsprechend ihrer molekularen Größe im SDS-Gel migrierten, sowie unlösliche polyQ-Proteine, welche in den Taschen der Gele akkumulierten (Abb. 3.21 A). Interessanterweise ergaben die densitometrischen Analysen der löslichen polyQ-Proteine, dass es in Q40-Nematoden zu einer signifikanten Reduzierung von löslichem polyQ-Protein auf das 0,48-fache von Q0-Nematoden (Werte wurden gleich 1 gesetzt) kam (Abb. 3.21 B). Wie die weiteren quantitativen Analysen zeigten, führte die Kultivierung der Q0-Nematoden mit EGb 761 zu keinen signifikanten Veränderungen im Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.21 B). Folglich wurde ein Effekt von EGb 761 auf die Expression der polyQ-Proteine ausgeschlossen. Im Gegensatz hierzu führte die EGb 761-Kultivierung von Q40-Nematoden zu einer signifikanten Erhöhung löslicher polyQ-Proteine auf das 1,29-fache der Kontrolle (Abb. 3.21 B). Hierfür wurde vermutet, dass eine reduzierte Aggregation von polyQ-Proteinen zu weniger koaggregierten Chaperonen führte, wodurch der Gehalt an freien Chaperonen erhöht wurde und somit mehr fehlgefaltete polyQ-Proteine in einer löslicher Form gehalten wurden (Satyal et al., 2000). Vor diesem Hintergrund ergab die Analyse der EGb 761-kultivierten Q40-Nematoden einen reduzierten Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen auf das 0,83-fache der Lösungsmittel-Kultivierung (Abb. 3.21 B).

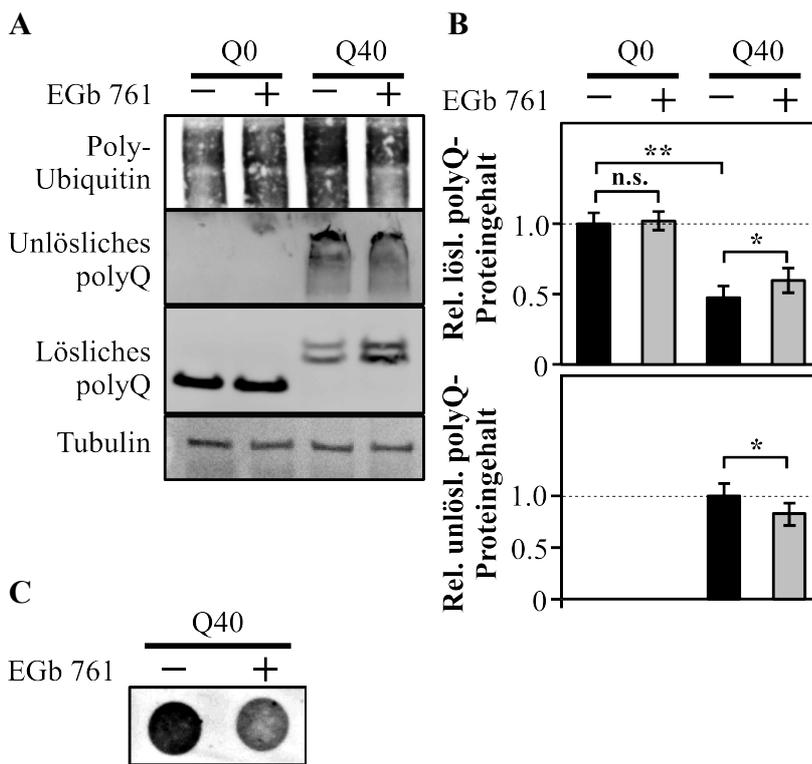


Abbildung 3.21: Immunoblot-Analyse (A) und Filterretardierungs-Test (C) der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine und polyQ-Aggregate in transgenen *C. elegans*. Transgene *C. elegans* mit Expressionen von Q40 und Q0 wurden dauerhaft mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) kultiviert. Beim Erreichen eines Adultstadiums von 3 Tagen (d3) wurden Totallysate von jeweils 5 adulte Würmern je Behandlung und Expression hergestellt. (A) Anschließend wurden Totallysate der Nematoden auf einem 4-12%igen Gradientengel aufgetragen und mittels Immunoblotting untersucht. Hierbei wurde der Gehalt an löslichem und unlöslichem polyQ-Protein, sowie PolyUB-Proteinen analysiert. PolyQ-Proteine wurden mittels eines anti-GFP-Antikörpers detektiert. SDS-unlösliches polyQ-Protein wurde in den „Taschen“ des SDS-Gels zurückgehalten und bildete einen amorphen Proteinschmier. Zur Darstellung der unlöslichen polyQ-Proteine wurden eine längere Expositionszeit gewählt.

(B) Quantitative Darstellung der densitometrisch gemessenen Protein-Level von löslichem und unlöslichem polyQ-Protein. Zur Quantifizierung der löslichen polyQ-Proteine wurden die Werte von Lösungsmittel-kultivierten (Vehikel) Q0-Nematoden gleich 1 gesetzt. Zur Quantifizierung der unlöslichen polyQ-Proteine wurden die Werte von Lösungsmittel-kultivierten (Vehikel) Q40-Nematoden gleich 1 gesetzt. n=4. (C) Untersuchungen der Totallysate von Q40-Nematoden mittels Filterretardierungs-Test. PolyQ-Aggregate wurden mit einem anti-GFP-Antikörper visualisiert. n=1. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. *: p<0.05 und **: p<0.01. n.s.: nicht signifikant.

Darüber hinaus wurde die Proteasom-Aktivität in den Nematoden untersucht und hierzu der Gehalt an PolyUB-Proteinen in den Immunoblots analysiert. Hierbei ergab die Analyse der Q40-Nematoden einen deutlich gesteigerten Gehalt an polyUB-Proteinen gegenüber Q0-Nematoden (Abb. 3.21 A). Folglich wurde vermutet, dass es auch in den transgenen *C. elegans*, mit der Expression von aberranten polyQ-Proteinen, zur einer verminderten Proteasom-Aktivität kam (Verhoef et al., 2002). Wie die weitere Analyse der PolyUB-Proteine zeigte, kam es in Q0-Nematoden durch die Kultivierung mit EGb 761 zu keinen deutlichen Veränderungen im Gehalt an PolyUB-Proteinen (Abb. 3.21 A). Im Gegensatz hierzu konnte in EGb 761-kultivierten Q40-Nematoden eine deutliche Reduzierung von PolyUB-Proteinen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 3.21 A). Folglich konnte auch für die untersuchten Nematoden eine EGb 761-induzierte verbesserte proteasomale Aktivität angenommen werden. Abschließend wurden zur

besseren Analyse der aggregierten polyQ-Proteine Totallysate von Q40-Nematoden mittels Filterretardierungs-Test untersucht. Hierbei konnte in den Proben von EGb 761-kultivierten Nematoden ein verminderter Gehalt an polyQ-Aggregaten festgestellt werden und somit die Beobachtungen der Immunoblot-Analysen bestätigt werden (Abb. 3.21 C). Da es im Filterretardierungs-Test zu Kutikula-Resten der analysierten Würmer auf der Zellulosemembran kam, wurden hierdurch keine weiteren Analysen mehr durchgeführt, da diese Reste die Quantifizierungen verfälscht hätten.

Zusammenfassend konnten die proteinbiochemischen Untersuchungen der transgenen *C. elegans* demonstrieren, dass es auch hier durch EGb 761 zu einer abmildernden Wirkung auf die Aggregation von polyQ-Proteinen kam.

3.6.3 EGb 761 verbessert pathologisch verminderte Bewegungen von transgenen *C. elegans*

Die untersuchten transgenen Stämme von *C. elegans* zeichneten sich durch einen charakteristischen Phänotyp aus, in welchem die Bildung und Toxizität von polyQ-Aggregaten direkt mit einer verminderten Beweglichkeit der Würmer korrelierten (Morley et al., 2002). Aufgrund dieser Korrelation ermöglichten die Untersuchungen der Beweglichkeit einzelner Nematoden, eine indirekte Information über die Aggregation der polyQ-Proteine und der damit einhergehenden Zytotoxizität. Auf diese Weise war es relativ einfach möglich, die EGb 761-Wirkungen auf die polyQ-Aggregation und Zytotoxizität zu untersuchen.

Zur Versuchsdurchführung wurden Q0- und Q40-exprimierende Nematoden dauerhaft mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) kultiviert. Beim Erreichen eines Adultstadium von 3 Tagen wurde jeweils ein Nematode in ein Uhrglas mit M9-Puffer transferiert, die Schlängelbewegungen innerhalb von 30 Sekunden protokolliert und in einen Beweglichkeits-Index eingetragen.

Wie die ersten Analysen des erstellten Beweglichkeits-Index zeigten, führte die Expression aberranter polyQ-Proteine in den Nematoden zu einer verminderten Motilität (Abb. 3.22). Hierbei wurde beobachtet, dass die Schlängelbewegungen der Q40-Nematoden durchschnittlich 56 Ausschläge betrug, wohingegen Q0-Nematoden durchschnittlich 68 Ausschläge aufwiesen (Abb. 3.22). Somit konnte in Q40-Nematoden eine um 18 % verringerte Motilität gegenüber Q0-Nematoden festgestellt werden, wodurch die Korrelation zwischen der Beweglichkeit und der polyQ-Aggregation deutlich wurde (Morley et al., 2002).

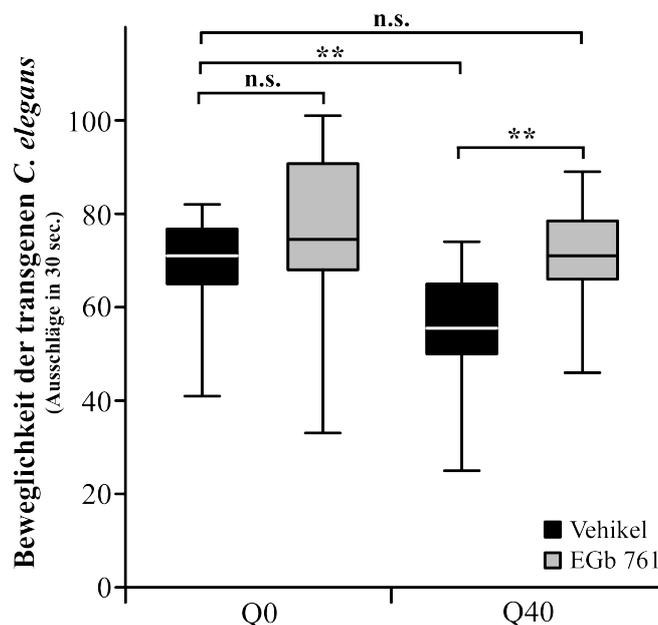


Abbildung 3.22: Beweglichkeits-Index zur Analyse der EGb 761-Wirkung auf transgenen *C. elegans*. Transgene *C. elegans* mit Expressionen von Q40 und Q0 wurden dauerhaft mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) kultiviert. Zur Untersuchungen der Beweglichkeit wurde jeweils ein 3 Tage alter adulter Nematode in ein Uhrglas mit M9-Puffer transferiert. Nach einer Eingewöhnungszeit von 60 sec. wurden die Ausschläge des Nematoden für 30 sec. gezählt und in einen Beweglichkeits-Index eingetragen. Zur Darstellung wurden für jede Behandlung jeweils 18 Q0-Nematoden und jeweils 60 Q40-Nematoden analysiert. Dargestellt wurden die Medianwerte mit obere und untere Perzentile in einem Box-Whisker-Diagramm (Box-Blot). **: $p < 0.01$. n.s.: nicht signifikant.

Interessanterweise konnte durch eine Kultivierung mit EGb 761 von Q40-Nematoden eine signifikante Verbesserung der Bewegungen um 27 % (71 Ausschläge) erreicht werden und war somit ähnlich hoch wie die Beweglichkeit von Lösungsmittel-kultivierten Q0-Nematoden (Abb. 3.22). Zudem konnte beobachtet werden, dass die EGb 761-Kultivierung von Q0-Nematoden zu keiner signifikant erhöhten Beweglichkeit führte (75 Ausschläge), wodurch die spezifische EGb 761-Wirkung auf die Reduzierung der polyQ-Aggregation deutlich wurde (Abb. 3.22). Diese Ergebnisse bestätigten die EGb 761-Wirkung auf die Bildung von polyQ-Aggregate, in dem die pathologisch verminderte Beweglichkeit der Q40-Nematoden abgemildert bzw. reversiert wurde.

3.6.4 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung auf *in vivo*-Modelle der HD

Wie die durchgeführten Untersuchungen (Ergebnisse 3.6) mit transgenen Stämme von *C. elegans* zeigen konnten, verursachte die Expression aberrant verlängerter polyQ-Proteine eine Aggregation

der polyQ-Proteine, welche in direkter Korrelation mit einer verschlechterten Beweglichkeit der Nematoden stand. Erstaunlicherweise konnte durch eine dauerhafte Kultivierung der Nematoden mit EGb 761 eine verringerten polyQ-Proteinaggregation erreicht werden, wodurch es auch zu einer Verbesserung der pathologisch verminderten Beweglichkeit der Nematoden kam. Erstaunlicherweise waren diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Beobachtungen in zellulären Modellen der HD. Dementsprechend konnte vermutet werden, dass die EGb 761-Wirkung auf die Aggregation von polyQ-Proteinen auch in den untersuchten *C. elegans*, durch eine verbesserte Degradation der polyQ-Proteine induziert wurde werden (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Interessanterweise konnte in Studien mit *C. elegans*-Modellen der AD ein ähnlicher Effekt von EGb 761 gezeigt werden, in dem es durch EGb 761 zu einer reduzierten Oligomerisierung von A β -Peptiden kam und der A β -induzierte Phänotyp verbessert wurde (Wu et al., 2006).

Angesichts dieser Ergebnisse mit transgenen *C. elegans* wurde ein möglicher therapeutischer Einsatz von EGb 761 in der HD gefestigt.

4 Diskussion

Im Laufe der letzten Jahre rückten Phytopharmaka immer mehr in den Fokus zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen und gelten als eine gute Alternative zu den klassischen pharmakologischen Therapien (Ramassamy, 2006).

So wurde in den letzten Jahrzehnten der *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb 761 als eine naturbelassene Medikation in einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt, mit einem Schwerpunkt in der Alzheimer-Krankheit (AD) und Demenz (Ramassamy et al., 2007). Bedauerlicherweise waren die Forschungsergebnisse zur Therapie dieser Erkrankungen oft inkonsistent in ihrer heilsamen Wirkung (Moosmann and Behl, 2002; DeKosky et al., 2008). Allerdings ist bekannt, dass die vielen Inhaltsstoffe von EGb 761 multiple Effekte auf eine Vielzahl von Proteinen und Genen ausüben, wodurch sich eine therapeutische Anwendung in Erkrankungen mit einer gestörten zellulären Homöostasis herleiten lässt (Mahadevan and Park, 2008; Bidon et al., 2009). Hierdurch ergab sich die Frage nach einem möglichen therapeutischen Effekt von EGb 761 in der Huntington-Krankheit (HD), vor allem im Hinblick auf die Proteinaggregation (Finkbeiner and Mitra, 2008).

Folglich sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie sich eine EGb 761-Behandlung auf die Aggregation pathogener polyQ-Proteine auswirken würde. Hierzu sollte die Wirkung von EGb 761 in zellulären Modellen der HD, sowie *C. elegans*-Modellen der HD näher untersucht werden. Da es in der HD auch zu einer pathologischen Abnahme in der proteasomalen Aktivität kommt (Davies et al., 2007), sollte darüber hinaus ein möglicher Effekt von EGb 761 auf die allgemeine Proteindegradation, sowie im Speziellen auf die Degradation von polyQ-Proteinen, näher analysiert werden. Hierzu wurde zuerst eine mögliche Modulation der Proteasom-Aktivität durch EGb 761 in klonalen HEK293-Zellen untersucht sowie in zellulären Modellen der HD. Anschließend sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der EGb 761-Wirkung auf die Proteasom-Aktivität und der Aggregation von polyQ-Proteinen hergestellt werden. Abschließend wurden Untersuchungen in polyQ-exprimierenden primären humanen Fibroblasten, sowie transgenen *C. elegans* durchgeführt, um eine mögliche therapeutische Wirkung der EGb 761-Behandlung zu evaluieren.

Im Folgenden werden zuerst die Wirkungen von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität, sowie die proteasomale Proteindegradation näher betrachtet.

4.1 Modulation der Proteasom-Aktivität durch EGb 761

4.1.1 Behandlungen mit EGb 761 steigern die Proteasom-Aktivität in nativen Zellen

Auf Grund vieler Studien über die Wirkung von EGb 761 in der AD wurde vermutet, dass hierbei auch ein Effekt von EGb 761 auf die proteasomale Aktivität eine Rolle spielte (Paul, 2008). Vor diesem Hintergrund konnten Studien zeigen, dass die Inkubationen mit verschiedenen Antioxidantien in Zellen zu einer Aktivierung des NRF2-KEAP1-Signalwegs führt, wodurch eine erhöhte Transkription proteasomaler Gene induziert wird und dies schlussendlich in einer erhöhten enzymatischen Proteasom-Aktivität resultiert (Arlt et al., 2009; Kwak et al., 2003). Somit wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst die EGb 761-Wirkung auf die enzymatische Aktivität des Proteasoms, sowie die proteasomale Proteindegradation intensiver untersucht.

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen einer EGb 761-Behandlung und einer erhöhten enzymatischen Proteasom-Aktivität gezeigt werden (Ergebnisse 3.1.2). Wie die ersten Messungen der Hydrolyse des künstlichen, fluorogenen Peptids Suc-LLVY-AMC (SUC-AMC-Test) demonstrierten, führte eine Inkubation mit EGb 761 zu einer erhöhten Aktivität der Chymotrypsin-ähnlichen-Peptidase des Proteasoms (Liggett et al., 2010), wobei sich eine Konzentration von 150 µg/ml EGb 761 als EC₅₀-Wert für die Erhöhung der Proteasom-Aktivität herausstellte. Da die Chymotrypsin-ähnliche-Peptidase als Hauptenzym der proteasomalen Proteindegradation gilt, belegte die beobachtete EGb 761-konzentrationsabhängige Steigerung der Enzymaktivität, die Spezifität der EGb 761-Wirkung auf die Proteasom-Aktivität (Ergebnisse 3.1.2).

Angesichts der Tatsache, dass die durchgeführten Untersuchungen zur enzymatischen Proteasom-Aktivität (SUC-AMC-Test) mit einem künstlichen Peptid (Suc-LLVY-AMC) durchgeführt wurden, konnten somit zwei Wirkungsweisen von EGb 761 postuliert werden: Erstens musste die EGb 761-Behandlung zu einer Erhöhung in der Konzentration von enzymatischen Proteasomproteinen führen, da die Substratkonzentration (Suc-LLVY-AMC) immer gleich blieb, aber die Peptidase-Aktivität anstieg (Sanchez et al., 2003). Zweitens konnte für die erhöhte Proteasom-Aktivität durch EGb 761 eine Wirkung auf proteasomale Helferproteine (z.B. Ubiquitin oder Hitze-Schock-Proteine) ausgeschlossen werden, da die Degradation des verwendeten künstlichen Peptids keine Helferproteine benötigt werden (Liggett et al., 2010). Die Tatsache, dass es schon mit einer EGb 761-Konzentration von 10 µg/ml zu einer erhöhten enzymatischen Aktivität kam, deutete hierbei auf eine erhöhte Anzahl funktioneller Proteasomeinheiten hin, wodurch ein Effekt von EGb 761 auf

die Transkription proteasomaler Gene vermutet werden konnte.

Anhand von durchgeführten qRT-PCR-Analysen konnte festgestellt werden, dass es durch eine Inkubation mit EGb 761 zu einer transkriptionellen Aktivierung proteasomaler Gene (PSMB5, PSMB6, PSMB7) kam (Ergebnisse 3.1.5). Hierbei bestätigten die erhöhten Transkripte des Proteasomgens PSMB5, welches für die Chymotrypsin-ähnliche-Peptidase kodiert, die beobachtete erhöhte Aktivität des proteasomalen Enzyms (Ergebnisse 3.1.2) (Vilchez et al., 2012). Zudem konnte durch die kurze Inkubationszeit von zwei Stunden die Spezifität von EGb 761 auf die Transkription bestätigt werden. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die EGb 761-induzierte Erhöhung der enzymatischen Proteasom-Aktivität mit einer erhöhten Transkription proteasomaler Gene korrelierte (Arlt et al., 2009).

Um einen physiologisch relevanten Bezug der gesteigerten enzymatischen Aktivität der proteasomalen Peptidasen herzustellen, wurde zusätzlich der proteasomale Proteinabbau untersucht. Hierzu wurden die Untersuchungen mit Hilfe eines proteasomalen Reporterproteins durchgeführt (d2GFP), welches ein kurzlebiges, destabilisiertes GFP-Protein ist und ein gut etabliertes Werkzeug für Untersuchungen der Proteasom-Aktivität in lebenden Zellen und Tieren darstellt (Dantuma et al., 2000). Hiermit kann durch Messungen der Fluoreszenzintensität die Proteindegradation durch das Proteasom bestimmt werden, da sich Modulationen in der proteasomalen Aktivität schnell auf den Gehalt an d2GFP-Proteinen auswirken und dieser direkt mit der Fluoreszenzintensität korreliert (Andreatta et al., 2001). Ein weiterer Vorteil des d2GFP-Proteins ist die Tatsache, dass für die Degradation dieses Proteins keine Ubiquitinierung oder Beteiligung externer Chaperone erforderlich ist und somit die Degradation dieses Proteins direkt mit der enzymatischen Proteasom-Aktivität zusammenhängt (Andreatta et al., 2001). Um Transfektionsartefakte auszuschließen, wurden die in dieser Arbeit ausgeführten Untersuchungen in HEK293-Zellen durchgeführt, in welchen das Reporterprotein d2GFP stabil zur Expression gebracht wurde (d2GFP-HEK-Zellen) (Gamerding et al., 2009).

Wie die Untersuchungen mit d2GFP-HEK-Zellen demonstrierten, führte die EGb 761-Behandlung der Zellen zu einer erhöhten proteasomalen Degradation des d2GFP-Proteins (Ergebnisse 3.1.3), wodurch die Untersuchungen der enzymatischen Proteasom-Aktivität (SUC-AMC-Test) bestätigt wurden. Wie die durchgeführten Fluoreszenzmessungen ergaben, kam es zu einer Abnahme in der GFP-Fluoreszenz in Abhängigkeit der eingesetzten EGb 761-Konzentration, wodurch die Spezifität des EGb 761-Effektes verdeutlicht wurde (Ergebnisse 3.1.3). Zudem konnte durch eine pharmakologische Inhibition des Proteasoms die Spezifität des EGb 761-Effektes bestätigt werden,

da diese Inhibition wieder zu erhöhten Fluoreszenzwerten führte (Ergebnisse 3.1.3).

Weiterhin konnten auch durchgeführte Fluoreszenzmessungen unter Inhibition der Proteinbiosynthese mittels Cycloheximid (CHX) die erhöhte proteasomale Degradation von d2GFP-Proteinen durch EGb 761 bestätigen. Hierbei ergaben die Fluoreszenzmessungen eine signifikant schneller Abnahme der GFP-Fluoreszenz in EGb 761-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, wodurch eine Wirkung von EGb 761 auf die Expression der d2GFP-Proteinen ausgeschlossen wurde (Ergebnisse 3.1.4). Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass es durch EGb 761 zu einer erhöhten proteasomale Proteindegradation kam, wodurch die Ergebnisse einer erhöhten enzymatische Proteasom-Aktivität gefestigt wurden.

Diese Ergebnisse werden durch Studien von Kapeta und Kollegen gestützt, welche eine erhöhte Proteasom-Aktivität durch Applikation von 18- α -Glycyrrhetinsäure, einem pentazyklischen Triterpenoid, zeigen konnten (Kapeta et al., 2010). Hierbei ist zu beachten, dass die 18- α -Glycyrrhetinsäure in ihrer chemischen Struktur ähnlich der im EGb 761 vorhandenen Triterpenelaktone ist (van Beek and Montoro, 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es durch Applikation von Quercetin bzw. tert-Butylhydroquinon zur einer Expression von Proteinen kommt, welche über ARE-Elemente im Promoterbereich ihrer Gene reguliert wurden (Lee et al., 2001b; Tanigawa et al., 2007). Auch diese Substanzen kommen in dem verwendeten *Ginkgo biloba*-Extrakt vor, wodurch hier ein ähnlicher Mechanismus erwartet werden kann (van Beek and Montoro, 2009). Zudem konnten Studien von Liu und Kollegen zeigen, dass es durch eine EGb 761-Behandlung zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktor NRF2 kommt (Liu et al., 2007), dieser an ARE-Elemente im Promoterbereich proteasomaler Gene bindet, hierdurch die Transkription der proteasomaler Gene erhöht wird und schließlich die Proteasom-Aktivität gesteigert wird (Kapeta et al., 2010; Kwak et al., 2003; Vilchez et al., 2012). Zudem belegten die durchgeführten Untersuchungen auch, dass für die erhöhte Proteasom-Aktivität kein direkter Effekt von EGb 761 auf andere Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) verantwortlich war (Mahadevan and Park, 2008), da sowohl die Degradation von d2GFP-Proteinen (Andreatta et al., 2001) als auch die Hydrolyse von Suc-LLVY-AMC nur eine reine Proteasom-Aktivität erforderten (Lindsten and Dantuma, 2003).

Anhand dieser Ergebnisse wurde für die EGb 761-induzierte Erhöhung der Proteasom-Aktivität folgender Mechanismus postuliert: Durch eine EGb 761-Behandlung kommt es zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktor NRF2 (Liu et al., 2007), welcher an ARE-Elemente im Promoterbereich proteasomaler Gene bindet und hierdurch die Transkription der Gene induziert

wird (Kwak et al., 2003). Hierdurch wird der Proteingehalt an enzymatisch aktiven Proteasomproteinen erhöht und die enzymatische Proteasom-Aktivität gesteigert und die proteasomale Proteindegradation verbessert (Arlt et al., 2009).

4.1.2 EGb 761 erhöht die pathologisch verminderte Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD

Angesichts der Ergebnisse einer EGb 761-induzierten gesteigerten Proteasom-Aktivität (Ergebnisse 3.1) stellte sich die Frage nach einer physiologischen Wirksamkeit dieses Effektes in der Huntington-Krankheit (HD).

In der HD führen Mutationen im Exon 1 des *huntingtin* Gens zu pathologischen Verlängerungen von Glutamin-Wiederholungen im N-Terminus des codierten Proteins (Goldberg et al., 1993). Diese Wiederholungen in der polyglutaminen Proteindomäne destabilisieren das Protein und führen zu Fehlfaltungen der Domäne hin zu einer β -Faltblattstruktur, wodurch es zu einem verminderten Abbau und Aggregation dieser Proteine kommt (Lakhani et al., 2010; Wetzel, 2012). Neben der Akkumulation und Aggregation von nicht-abgebauten fehlgefalteten polyQ-Proteinen kommt es in der HD auch zu einer reduzierten Proteasom-Aktivität (Bence et al., 2001), wodurch vermutet wird, dass eine gesteigerte proteasomale Aktivität heilsam sein könnte (Krobitsch and Kazantsev, 2011).

Folglich wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst die Wirkung von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD untersucht. Hierfür wurden Plasmide hergestellt, welche aus Genfusionen von GFP und Variation des Exon 1 aus dem *huntingtin* Gen bestanden. Hierdurch sollten GFP-Fusionsproteine (polyQ-Proteine), mit variierenden Längen an Glutamin-Wiederholungen in der polyQ-Domäne exprimiert werden. Für die Untersuchungen wurden hierzu nicht pathogene Fusionsproteine mit 25 Glutamine-Wiederholungen (htt_Q25), sowie pathogene Fusionsproteine mit 46 Glutamine-Wiederholungen (htt_Q46) bzw. 103 Glutamine-Wiederholungen (htt_Q103) in HEK293-Zellen transienten zur Expression gebracht (Krobitsch and Lindquist, 2000) und die enzymatische Proteasom-Aktivität der Zellen mittels SUC-AMC-Test ermittelt. Zur Kontrolle wurden Zellen mit einer eGFP-Expression mitgeführt.

Wie die durchgeführten Untersuchung der proteasomalen Peptidase-Aktivität ergaben, führte die Expression von nicht pathogenen htt_Q25-Proteinen zu keiner Änderung der Proteasom-Aktivität gegenüber der Expression von eGFP-Proteinen, wodurch verdeutlicht wurde, dass polyQ-Proteine

per se keine Auswirkung auf die Proteasom-Aktivität haben (Ergebnisse 3.2.1). Im Gegensatz hierzu konnte eine deutlich verringerte Proteasom-Aktivität mit der Expression aberrant veränderter polyQ-Proteinen (htt_Q46 und htt_Q103) (Ergebnisse 3.2.1) beobachtet werden und bestätigte die Literaturangaben (Park et al., 2005). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Aggregation von polyQ-Proteinen, wie sie bei den aberranten Formen (htt_Q46 und htt_Q103) vorkommt, einen Effekt auf die Aktivität des Proteasoms hat (Hipp et al., 2012).

Interessanterweise führte eine EGb 761-Behandlung in allen Zellen zu einer signifikanten Steigerung der proteasomalen Peptidase-Aktivität (Ergebnisse 3.2.1) und bestätigte die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit nativen Zellen (Ergebnisse 3.1.2). Folglich konnte durch eine EGb 761-Behandlung auch in Zellen mit einer krankheitsbedingten verminderten Proteasom-Aktivität, einer Erhöhung der proteasomalen Peptidase-Aktivität erzielt werden, wodurch eine universelle Wirkung von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität sichtbar wurde.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde nachfolgend die Degradation von d2GFP-Proteinen unter der Expression polyglutaminer Proteinen untersucht. Hierzu wurde die proteasomale Degradation von d2GFP-Proteinen mittels Immunblot-Analyse untersucht und zusätzlich der Gehalt an proteasomalem Protein (proteasomale Untereinheit $\alpha 1$, S20) bestimmt. Anhand der Immunoblot-Analyse wurde sichtbar, dass die Expression von aberranten polyQ-Proteinen zu einer Inhibition der proteasomalen Degradation führte (Park et al., 2005) und dies sich in einem leicht erhöhten Gehalt an d2GFP-Proteinen manifestierte (Ergebnisse 3.2.2). Zusätzlich konnten die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass es mit der Expression pathogener polyQ-Proteine zu einer basalen Akkumulation von proteasomalen Proteinen kam, wodurch vermutet wurde, dass eine Koaggregation von Proteasomeinheiten mit polyQ-Proteinaggregaten zu einer Deaktivierung führten (Hipp et al., 2012).

Demgegenüber konnte durch eine EGb 761-Behandlung in allen Zellen eine erhöhte Degradation von d2GFP-Proteinen festgestellt werden, welche sich in einem geringeren Proteingehalt von d2GFP-Proteinen manifestierte (Ergebnisse 3.2.2) (Andreatta et al., 2001). Zudem verursachte die EGb 761-Behandlung eine Zunahme im Gehalt an proteasomalen Proteinen, wodurch eine EGb 761-induzierte erhöhte Transkription proteasomaler Gene vermutet wurde (Ergebnisse 3.2.2). Diese Vermutung konnten anhand durchgeführter qRT-PCR-Analysen in Zellen mit Expressionen normaler (htt_Q25) und aberranter (htt_Q103) polyQ-Proteine validiert werden. Hierbei bestätigten die Analysen in allen Zellen eine erhöhte Expression proteasomaler Gene durch eine EGb 761-Behandlung (Ergebnisse 3.2.3), wodurch diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Resultaten

in nativen Zellen standen (Ergebnisse 3.1.5).

Erstaunlicherweise ergab eine separat durchgeführte qRT-PCR-Analyse mit Zellen ohne EGb 761-Behandlung, dass die Expression aberranter polyQ-Proteine zu einer signifikanten reduzierten Transkription proteasomaler Proteine führte (Ergebnisse 3.2.3). Hierdurch wurde deutlich, dass die beobachtete Akkumulation von proteasomalem Protein in Zellen mit Expressionen pathogener polyQ-Proteine (htt_Q46 und htt_Q103) (Ergebnisse 3.2.2) nicht von einer erhöhten Transkription dieser Proteine herrührte, sondern durch die Koaggregation mit polyQ-Aggregaten entstand (Hipp et al., 2012). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen einer reduzierten proteasomalen Peptidase-Aktivität konnte somit geschlossen werden, dass dies proteasomalen Proteine durch eine Koaggregation mit polyQ-Proteinen ihre Aktivität verlieren (Bennett et al., 2005) und der Gehalt an proteasomalem Protein nicht proportional zur Proteasom-Aktivität stand (Ergebnisse 3.2.1).

Folglich konnten die Untersuchungen in zellulären Modellen der HD demonstrieren, dass eine EGb 761-Behandlung auch in Zellen mit einer pathologisch verminderten Proteasom-Aktivität zu einer erhöhten Transkription proteasomaler Gene führt und hierdurch der Gehalt an proteasomalen Proteinen steigt. Dies hat zur Folge, dass die pathologisch reduzierte Proteasom-Aktivität gesteigert wird und sich die proteasomale Proteindegradation verbessert.

4.1.3 Zusammenfassung der Wirkung von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität

Wie die durchgeführten Untersuchungen in nativen HEK293-Zellen, sowie in zellulären Modellen der HD ergaben, führte eine EGb 761-Behandlung zu einer erhöhten Transkription proteasomaler Gene, sowie zu einer gesteigerten enzymatischen Proteasom-Aktivität und der damit einhergehenden verbesserten proteasomalen Proteindegradation. Hierdurch wurde nachgewiesen, dass EGb 761 eine universelle Wirkung auf die Proteasom-Aktivität bewirkte. Zudem konnten die Untersuchungen in zellulären Modellen der HD demonstrieren, dass eine EGb 761-Behandlung zu einer erhöhten Expression proteasomaler Proteine führt, dies aber nicht unbedingt mit einer erhöhten Gentranskription oder enzymatischen Proteasom-Aktivität einhergeht. Anhand der gewählten Analysemethoden mittels SUC-AMC-Test (Giguere and Schnellmann, 2008) sowie der Degradation von d2GFP-Proteinen (Andreatta et al., 2001) konnte hierfür ein direkter Effekt von EGb 761 auf andere Proteine des UPS, wie Ubiquitin und Chaperone, ausgeschlossen werden (Mahadevan and Park, 2008).

Interessanterweise wurde bisher eine erhöhte Proteasom-Aktivität durch transiente

Überexpressionen proteasomaler Proteinen erreicht (Stadtmueller and Hill, 2011), oder durch eine Inkubation mit phenolhaltigen Antioxidantien verursacht (Kapeta et al., 2010; Kwak et al., 2003). Hierbei kommt es zur Aktivierung des NRF2-KEAP1-Signalweges, wodurch eine erhöhte Transkription proteasomaler Gene induziert wird und dies schließlich in einer gesteigerten Proteasom-Aktivität resultiert (Kwak et al., 2003). Folglich kann für die Wirkung von EGb 761 auf die Proteasom-Aktivität folgender Mechanismus postuliert werden: Die Inkubation mit EGb 761 bewirkt die Bindung des Transkriptionsfaktor NRF2 an ARE-Elemente im Promoterbereich (Liu et al., 2007) von proteasomalen Genen, wodurch die Transkription dieser Gene erhöht wird (Kwak et al., 2003) und dies die Proteasom-Aktivität und Proteindegradation steigert (Arlt et al., 2009).

Vor diesem Hintergrund konnte zudem festgestellt werden, dass eine EGb 761-Behandlung in zellulären Modellen der HD die pathologisch verminderte Transkription proteasomaler Gene wieder erhöht, sowie die Proteasom-Aktivität wieder verbessert. Somit könnten die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse eventuell von therapeutischer Bedeutung in der HD sein (Truant et al., 2008).

4.2 EGb 761 reduziert polyQ-Aggregate durch eine verbesserte Degradation

Einer der wichtigsten Kennzeichen der HD ist das Vorkommen von Proteinaggregaten, welche aus Peptiden von N-terminalen Bereichen mutanter Huntingtin-Proteinen bestehen. Diese Peptide weisen abnormale Verlängerungen im N-Terminus auf, welche durch Wiederholungen der Aminosäure Glutamin (Q) verursacht werden (Goldberg et al., 1993). Durch diese abnormalen Verlängerungen kommt es zur Destabilisierung und Fehlfaltung des polyglutaminen Proteins (polyQ Protein) hin zu einer β -Faltblattstruktur, wodurch diese Proteine vom UPS erkannt werden und diese dann zum proteasomalen Abbau geführt werden (Lakhani et al., 2010). Durch die Fehlfaltung können diese Proteine nur sehr schwer entfaltet werden und somit vom Proteasom degradiert werden, wodurch es zu einer Akkumulation von nicht-abgebauten polyQ-Proteinen kommt und diese zu SDS-resistenten Proteinaggregaten aggregieren (Wetzel, 2012). Hierbei konnten Studien demonstrieren, dass mit pharmakologischen Proteasom-Inhibitionen die Anzahl an polyQ-Aggregaten zunimmt, wodurch der Zusammenhang zwischen proteasomaler Degradation der polyQ-Proteine und ihrer Aggregation verdeutlicht wurde (Cummings et al., 1999).

Folglich wurde vermutet, dass eine Erhöhung der proteasomalen Aktivität eine verbesserte polyQ-Proteindegradation durch das UPS bewirken könnte und somit zu einer Abmilderung der pathologischen Proteinaggregation in der HD führen würde (Krobitsch and Kazantsev, 2011).

4.2.1 Behandlungen mit EGb 761 reduzieren die Menge an polyQ-Proteinaggregaten

Wie Studien von Li und Kollegen in zellulären Modellen von Cardiomyopathien zeigen konnten, kommt es durch eine erhöhte Proteasom-Aktivität zu einem gesteigerten Abbau von aberranten Proteinen, wodurch die Aggregation der Proteine reduziert wird (Li et al., 2011). Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch eine EGb 761-Behandlung in zellulären Modellen der HD eine Erhöhung der proteasomalen Proteindegradation erreicht werden konnte (Diskussion 4.1.2). Folglich sollte hierdurch auch ein Effekt von EGb 761 auf die Aggregation von polyQ-Proteinen bewirkt werden. Demzufolge wurde zuerst die Wirkung von EGb 761 auf polyQ-Proteine und ihrer Aggregationstendenz in HEK293-Zellen mit transienter Expression von nicht-aggregierenden polyQ-Proteinen (htt_Q25) und aggregierenden polyQ-Proteinen (htt_Q46 und htt_Q103) analysiert (Krobitsch and Lindquist, 2000).

Wie die durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen demonstrieren, kam es durch

die Expression von htt_Q103-Proteinen zu deutlich mehr Aggregat-tragenden Zellen im Vergleich zu htt_Q46-Proteinen, wodurch die Korrelation zwischen der aberranten Verlängerung der polyQ-Proteine und ihrer Aggregationstendenz deutlich wurde (Hackam et al., 1998). Anhand von proteinbiochemischen Untersuchungen konnte diese Korrelation bestätigt werden, indem Proben von htt_Q103-exprimierenden Zellen signifikant mehr Gehalt an akkumulierten, SDS-resistenten bzw. SDS-unlöslichen polyQ-Proteinen (Im Folgenden nur noch als unlösliche polyQ-Proteine bezeichnet) aufwiesen, als Proben von htt_Q46-exprimierenden Zellen (Ergebnisse 3.3.2) (Saunders et al., 2011). Diese SDS-resistenten polyQ-Proteine wanderten während der Elektrophorese nicht in das SDS-Sammegel, wodurch es sich bei diesen Proteinen um größer, kovalent verbundene Proteinkomplexe handelte und folglich diese Proteine aus aggregierten polyQ-Proteinen bestanden (Krobitsch and Lindquist, 2000). Anhand von Untersuchungen mittels Filterretardierungs-Test konnte die Aggregation aberranter polyQ-Proteine mit zunehmender Proteinelänge validiert werden und demonstrierte zudem dass diese Proteine aus kovalent gebundenen Proteinkomplexen bestanden (Ergebnisse 3.3.3). Auf Grund der harschen Reaktionsbedingung des Filterretardierungs-Tests, wie das Aufkochen der Proben in einem reduzierendem Puffer, wurden hierbei alle nicht-kovalent gebundenen Proteine entfernt und somit reine polyQ-Proteinaggregate analysiert und quantifiziert werden (Scherzinger et al., 1997).

Im Gegensatz hierzu belegten die Proben von htt_Q25-exprimierenden Zellen, dass polyQ-Proteine mit normaler, nicht-pathogener Länge keine Aggregationstendenz aufwiesen und in diesen Proben nur SDS-lösliche Proteine (Im Folgenden nur noch als lösliche polyQ-Proteine bezeichnet) vorlagen (Verhoef et al., 2002). Hierzu konnten die weiteren Analysen zeigen, dass der Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen mit zunehmender aberranter Verlängerung der polyQ-Proteine (htt_Q46 und htt_Q103) signifikant reduziert wurde und stand im direkten Verhältnis mit der Aggregation der polyQ-Proteine (Ergebnisse 3.3.2). Hierdurch wurde deutlich, dass polyQ-Proteine mit aberranter Verlängerung zu vermehrter Fehlfaltung neigen und diese fehlgefalteten Proteine schließlich aggregierten. Zudem konnten Studien von Kaytor und Kollegen zeigen, dass fehlgefaltete polyQ-Proteine eine kürzere Halbwertszeit als korrekt gefaltete polyQ-Proteine aufweisen, wodurch mehr fehlgefaltete Proteine degradiert werden oder zu Proteinaggregaten oligomerisieren (Kaytor et al., 2004). Vor diesem Hintergrund ergaben zeitlich aufgelöste Untersuchungen in htt_Q103-exprimierenden Zellen, dass es mit zunehmender Expressionszeit des htt_Q103-Konstruktes zu einem starken Anstieg im Gehalt an unlöslichem polyQ-Protein kam, wohingegen der Gehalt an löslichem polyQ-Protein nur leicht anstieg (Ergebnisse 3.3.4). Anhand der stärkeren Akkumulation

der unlöslichen polyQ-Proteinen wurde deutlich, dass fehlgefaltete polyQ-Proteine einem höheren zellulären Umsatz unterliegen als korrekt gefaltete Proteine (Kaytor et al., 2004). Zudem wurde hierdurch auch deutlich, dass fehlgefaltete polyQ-Proteine nur schwer degradiert werden können, da nicht-abgebaute polyQ-Proteine zu unlöslichen polyQ-Proteinen aggregierten (Verhoef et al., 2002). Infolgedessen konnte durch die Analyse des Gehalts an unlöslichem polyQ-Protein bzw. des Gehalts an polyQ-Aggregaten eine indirekte Aussage über die Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen getätigt werden (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Angesichts dieser grundlegenden Beobachtungen wurde hierdurch die Analyse der EGb 761-Wirkung auf polyQ-Proteine in diesen Zellen vereinfacht.

Wie die durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, bewirkte eine EGb 761-Behandlung von htt_Q25-exprimierenden Zellen keine sichtbaren Unterschiede in der Verteilung und Fluoreszenzintensität der exprimierten Proteine (Ergebnisse 3.3.1). Zudem ergaben die proteinbiochemischen Untersuchungen dieser Zellen, dass die EGb 761-Behandlung keine Veränderungen im Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen verursachte (Ergebnisse 3.3.2). Hierdurch wurde geschlossen, dass EGb 761 keinen Einfluss auf die Expression von polyQ-Proteinen hatte und auch zu keinem erhöhten Abbau von löslichen Proteinen führte (Li et al., 2008). Im Gegensatz hierzu ergaben die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, dass es durch eine EGb 761-Behandlung von htt_Q46- und htt_Q103-Zellen zu einer deutlichen Reduzierung Aggregat-tragenden Zellen kam sowie zu einer verminderten Fluoreszenzintensität der Aggregate führte (Ergebnisse 3.3.1). Diese Beobachtungen wurden durch die proteinbiochemischen Untersuchungen bestätigt, indem in Proben von EGb 761-behandelten Zellen ein deutlich reduzierter Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen detektiert wurde (Ergebnisse 3.3.2) und der Gehalt an polyQ-Aggregaten signifikant reduziert wurde (Ergebnisse 3.3.3) (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Hierzu konnten durchgeführte SRB-Tests nachweisen, dass die eingesetzte EGb 761-Konzentration keine zytotoxische Wirkung auf Zellen mit Expressionen aberranter polyQ-Proteine hatte (Vichai and Kirtikara, 2006) und es durch einen zytotoxischen Effekt zur Reduzierung von aggregierten polyQ-Proteinen kam (Ergebnisse 3.3.3).

Zudem ergaben die durchgeführten Analysen mittels Immunoblotting, dass eine EGb 761-Behandlung keine Auswirkung auf den Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen von htt_Q46- und htt_Q103-Zellen hatte und somit äquivalent zu htt_Q25-Zellen war (Ergebnisse 3.3.2). Zusätzlich konnte in den zeitlich aufgelösten Untersuchungen mit htt_Q103-Zellen beobachtet werden, dass in EGb 761-behandelten Zellen der Gehalt an löslichem polyQ-Protein zu jedem Zeitpunkt gleich groß

war wie in den Kontrollzellen (Ergebnisse 3.3.4). Im Gegensatz hierzu kam es schon mit Beginn der EGb 761-Inkubation zu einem weniger starken Anstieg im Gehalt an unlöslichem polyQ-Protein, als durch die Kontrollbehandlung (Ergebnisse 3.3.4).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass es durch eine EGb 761-Behandlung zu einer Reduzierung von aggregierten polyQ-Proteinen bzw. polyQ-Aggregaten kommt. Infolgedessen konnte für die beobachtete Reduzierung der aggregierten polyQ-Proteine eine Wirkung von EGb 761 auf die Faltung der polyQ-Proteine oder auf molekulare Chaperone ausgeschlossen werden, da es ansonsten zu einem Anstieg im Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen hätte kommen müssen (Bailey et al., 2002). Zudem konnte ein Einfluss von EGb 761 auf die Expression aberranter polyQ-Proteine ausgeschlossen, da dies auch einen reduzierten Gehalt an löslichem polyQ-Protein bewirkt hätte (Martín-Aparicio et al., 2001). Folglich wurde angenommen, dass die EGb 761-Behandlung einen erhöhten bzw. verbesserten Abbau von fehlgefalteten polyQ-Proteinen bewirkte, somit die Menge an aggregationsfähigen Proteinen vermindert wurde und dies in die Aggregation der polyQ-Proteine reduzierte (Park et al., 2005).

4.2.2 EGb 761 bewirkt einen effizienteren Abbau fehlgefalteter polyQ-Proteine und reduziert hierdurch polyQ-Aggregate

Das Aufrechterhalten der zellulären Proteinhomöostasis wird zu einem großen Teil über den Mechanismus der Proteinqualitätskontrolle (PQC) erreicht (Koga et al., 2011). Die PQC beinhaltet hierbei zwei grundlegende Mechanismen für die Degradation von Proteinen: das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Autophagie (Ciechanover, 2005). Sowohl das UPS, wie auch die Autophagie sind in der PQC von essentieller Bedeutung in der Beseitigung von aberranten und pathologisch modifizierten Proteinen, um Fehlfunktionen dieser Proteine zu verhindern, aber auch mögliche Proteinaggregationen zu vermeiden (Ross and Poirier, 2004).

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es durch eine EGb 761-Behandlung in zellulären Modellen der HD, eine erhöhte proteasomale Proteindegradation bewirkte (Diskussion 4.1.2). Zudem konnte gezeigt werden, dass es durch eine EGb 761-Behandlung zu einer deutlichen Reduktion von unlöslichen, aggregierten polyQ-Proteinen kam, wohingegen die EGb 761-Behandlung keine deutliche Wirkung auf die löslichen polyQ-Proteine hatte (Diskussion 4.2.1). Somit wurde vermutet, dass es durch die EGb 761-Behandlung zu einem verbesserten Abbau von fehlgefalteten polyQ-Proteinen kommt und hierdurch die

Akkumulation der Proteine in unlösliche polyQ-Proteinaggregate vermindert wird (Chow et al., 2012). Hierdurch ergab sich aber die Frage, warum die EGb 761-induzierte erhöhte proteasomale Proteindegradation keine Effekte auf die löslichen polyQ-Proteinen verursachte (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Zur Klärung dieser anscheinenden Unstimmigkeit, wurde der Effekte von EGb 761 auf den proteasomalen Abbau von polyQ-Proteinen untersucht. Folglich wurde zuerst die Wirkung von EGb 761 auf den proteasomalen Abbau von nicht-aggregierenden polyQ-Proteinen (htt_Q25) im Vergleich zum Abbau von kurzlebigen d2GFP-Reporterproteinen untersucht (Andreatta et al., 2001). Hierzu wurden htt_Q25-Proteine transient in d2GFP-HEK-Zellen zu Expression gebracht. Anschließend wurde die EGb 761-Wirkung auf die proteasomale Degradation von aberranten polyQ-Proteinen (htt_Q103) untersucht und mit den Ergebnissen von normalen polyQ-Proteinen (htt_Q25) verglichen. Zudem wurden alle Untersuchungen unter einer zusätzlichen pharmakologischen Proteasom-Inhibition mit ansteigenden Konzentrationen von MG132 durchgeführt, um die Spezifität der EGb 761-Wirkung auf die proteasomale Proteindegradation zu validieren (Kisselev and Goldberg, 2001). Abschließend wurde noch eine mögliche Beteiligung der Autophagie in der EGb 761-induzierten Degradation von polyQ-Aggregaten untersucht (Filimonenko et al., 2010).

Wie die durchgeführten proteinbiochemischen Untersuchungen von htt_Q25-Zellen demonstrierten, kam es durch die EGb 761-Behandlung der Zellen zu einer signifikanten Reduzierung im Gehalt der Proteine d2GFP und Polyubiquitin (PolyUB), welche in Abhängigkeit der eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen wieder anstiegen (Ergebnisse 3.4.1). Anhand der schnellen und starken Akkumulation der PolyUB-Proteine mit der durchgeführten Proteasom-Inhibition wurde deutlich, dass der Gehalt an PolyUB-Proteinen als guter Marker der Proteasom-Aktivität ansehen werden kann (Ciechanover, 2005). Weiterhin konnte bestätigt werden, dass der EGb 761-induzierte verminderte Gehalt an d2GFP-Proteinen spezifisch durch eine erhöhte proteasomale Proteindegradation verursacht wurde (Ergebnisse 3.4.1) (Andreatta et al., 2001). Zudem veranschaulichte die schnelle Akkumulation der d2GFP-Proteinen mit der pharmakologischen Proteasom-Inhibition, dass diese destabilisierten Proteine einer schnellen proteasomalen Degradation unterlagen und somit ihre Halbwertszeit sehr gering war (Sorokin et al., 2009).

Im Gegensatz hierzu bewirkte weder die EGb 761-Behandlung noch die zusätzliche Proteasom-Inhibition signifikante Veränderungen im Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen (Ergebnisse 3.4.1). Hieraus wurde deutlich, dass lösliche polyQ-Proteine mit einer korrekten Proteinfaltung kein starkes Signal für den proteasomalen Abbau aufzeigten und somit nur langsam vom Proteasom

abgebaut wurden, wodurch ihre Halbwertszeit stark erhöht war (Kaytor et al., 2004). Anhand dieser Ergebnisse wurden weitere Untersuchungen mit htt_Q103-exprimierenden Zellen durchgeführt, um die EGb 761-Wirkung auf den proteasomalen Abbau von löslichen und unlöslichen polyQ-Proteinen näher zu analysieren. Zur Vergleichbarkeit der Untersuchungen, wurde auch in diesen Experimenten eine zusätzliche pharmakologische Proteasom-Inhibition durchgeführt.

Wie die durchgeführten proteinbiochemischen Untersuchungen der htt_Q103-Zellen zeigten, bewirkte die EGb 761-Behandlung der Zellen eine Abnahme im Gehalt an PolyUB-Proteinen, welche durch die Proteasom-Inhibition wieder anstieg (Ergebnisse 3.4.2), wodurch der spezifische Effekt von EGb 761 auf die proteasomale Proteindegradation demonstriert wurde. Die weiteren Analysen der htt_Q103-Zellen ergaben, führte weder die EGb 761-Behandlung, noch die zusätzliche Proteasom-Inhibition zu signifikanten Unterschieden im Proteingehalt der löslichen polyQ-Proteine (Ergebnisse 3.4.2) und waren somit vergleichbar mit den Ergebnissen aus htt_Q25-Zellen (Ergebnisse 3.4.1). Folglich konnte somit demonstriert werden, dass auch lösliche, aberrante polyQ-Proteine (htt_Q103) mit einer korrekten Proteinfaltung nur langsam vom Proteasom abgebaut wurden und somit eine hohe Halbwertszeit besaßen (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Folglich konnte die EGb 761-induzierte erhöhte proteasomale Proteindegradation auch keine deutlichen Auswirkungen auf den Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen haben (Ergebnisse 3.3.2).

Da aber festgestellt wurde, dass der Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen mit der Länge der Glutamin-Wiederholungen abnahm (Ergebnisse 3.3.2), musste ein Teil der aberranten polyQ-Proteine (htt_Q103) nur eine kurze Halbwertszeit aufweisen und somit schnell degradiert werden oder in unlösliche polyQ-Proteine akkumulieren (Kaytor et al., 2004). Hierzu ergaben die weiteren Analysen der htt_Q103-exprimierenden Zellen, dass die EGb 761-Behandlung zu einer signifikanten Reduzierung im Gehalt der unlöslichen polyQ-Proteine führte und mit der durchgeführten Proteasom-Inhibition wieder anstieg (Ergebnisse 3.4.2). Hierdurch wurde bestätigt, dass der EGb 761-induzierte verminderte Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen durch eine erhöhte proteasomale Degradation verursacht wurde (Ergebnisse 3.4.2) (Li et al., 2010). Zudem belegten diese Beobachtungen, dass die Akkumulation unlöslicher polyQ-Proteine durch nicht-abgebaute polyQ-Proteine verursacht wurde. Weiterhin konnten diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die unlöslichen polyQ-Proteine in Abhängigkeit der eingesetzte Inhibitor-Konzentration schnell und stark akkumulierten, wie die kurzlebigen, destabilisierten d2GFP-Proteine in htt_Q25-exprimierenden Zellen (Ergebnisse 3.4.1). Folglich wurde hiermit demonstriert, dass diese nicht-abgebauten polyQ-Protein eine kurze Halbwertszeit aufwiesen, ähnliche der Halbwertszeiten von

destabilisierten d2GFP-Proteinen (Kaytor et al., 2004). Hierzu wurde vermutet, dass diese kurzen Halbwertszeiten durch die Fehlfaltungen der aberranten polyQ-Proteine verursacht wurden (Lakhani et al., 2010). Da es auf Grund von fehlerhafter Proteinfaltung zur Exposition von Aminosäuregruppen in der Proteinstruktur kommt, kann dies als Degradationssignal von molekularen Chaperonen erkannt und diese Proteine sofort zum proteasomalen Abbau geführt werden (Pratt et al., 2010). Zudem können diese Fehlfaltungen aber auch die proteasomale Entfaltung der Proteine erschweren, wodurch der proteasomale Abbau vermindert wird und somit nicht-abgebaute fehlgefaltete Proteine akkumulieren können, wodurch es zur Bildung von Proteinaggregaten kommen kann (Lee et al., 2001a). Somit zeigten diese Ergebnisse aus den Untersuchungen mit htt_Q103-Zellen, dass die Fehlfaltung von polyQ-Proteinen als starkes Degradationssignal fungierte, diese Proteine aber nur schwer abgebaut wurden und es somit durch die Proteasom-Inhibition zu einer schnellen Akkumulation in unlösliche, aggregierte polyQ-Proteine kam (Ergebnisse 3.4.2).

Gemäß dieses Mechanismus konnte der Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen bzw. polyQ-Proteinaggregaten als indirekte Anzeige für die Effizienz der proteasomalen Degradation fehlgefalteter polyQ-Proteine genutzt werden (Li et al., 2010). Folglich wurde die Effizienz der EGb 761-Wirkung auf den proteasomalen Abbau von fehlgefalteten polyQ-Proteinen quantitativ bestimmt. Hierzu wurden EGb 761-behandelte und Lösungsmittel-behandelte htt_Q103-Zellen zusätzlich mit ansteigenden MG132-Konzentrationen inkubiert und der Gehalt an polyQ-Aggregaten mittels Filterretardierungs-Test quantifiziert (Ergebnisse 3.4.3) (Scherzinger et al., 1997). Wie die ersten Analysen der Filterretardierungs-Tests ergaben, kam es in beiden Behandlungen in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen des Proteasom-Inhibitors zu einem signifikanten Anstieg im Gehalt an polyQ-Aggregaten (Ergebnisse 3.4.3). Hierdurch wurde deutlich, dass die Bildung der polyQ-Aggregate mit der Proteasom-Aktivität gekoppelt war und nicht-abgebaute polyQ-Proteine zur Aggregation führten (Li et al., 2010). Zudem bestätigten diese Beobachtungen die aufgestellte Hypothese (Diskussion 4.1), dass die EGb 761-induzierte Abnahme im Gehalt an polyQ-Aggregaten gegenüber der Kontrolle durch eine verbesserte proteasomale Degradation der polyQ-Proteine bewirkt wurde (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Interessanterweise ergaben die weiteren quantitativen Analysen, dass eine vierstündige Inkubation mit 10 μ M MG132 in EGb 761-behandelten Zellen einen Anstieg der polyQ-Aggregate von 22 % bewirkte und hierdurch das Niveau der Kontrolle erreicht wurde. Somit erhöhte die EGb 761-Behandlung die Degradation von polyQ-Proteinen die proteasomale Leistung, welche durch eine 4-

stündige Inhibition mit 10 μ M MG132 gesenkt wurde (Ergebnisse 3.4.3). Hierzu ergaben die Analysen der Lösungsmittel-behandelten Zellen, dass die Inkubation mit 10 μ M MG132 nur zu einem 15 %-igen Anstieg der polyQ-Aggregate führte (Ergebnisse 3.4.3). Folglich erhöhte eine EGb 761-Behandlung die Degradationseffizienz von fehlgefalteten polyQ-Proteinen um 7 % pro 4 Stunden, wodurch nach 48 h eine Reduzierung der polyQ-Aggregate auf das 0,78-fache der Kontrolle erreicht wurde (Ergebnisse 3.4.3) (Li et al., 2011).

Abschließend wurde noch eine mögliche Beteiligung der Autophagie in der EGb 761-induzierten Reduzierung von polyQ-Proteinaggregaten untersucht, da aberrante Proteine und Proteinaggregate auch über diesen Mechanismus degradiert werden können (Menzies et al., 2010). Folglich wurde die EGb 761-Wirkung auf den autophagosomalen Abbau von aberranten polyQ-Proteinen und Aggregaten in htt_Q103-Zellen untersucht und hierzu eine zusätzliche pharmakologische Autophagie-Inhibition mittels Bafilomycin A1 induziert (Rubinsztein et al., 2009). Wie die ersten Immunoblot-Analysen zeigten, verursachte die pharmakologische Inhibition der Autophagie in beiden Behandlungen eine Akkumulation von LC3-II-Proteinen, wodurch deutlich wurde, dass in beiden Behandlungen die Autophagie aktiv war (Ergebnisse 3.4.4) (Mizushima and Yoshimori, 2007). Hierbei ergaben die genaueren Analysen, dass in beiden Behandlungen der basale Gehalt an LC-Proteinen gleich groß war und die Inhibition zu einer gleich starken Akkumulation der LC3-II-Proteine führte (Ergebnisse 3.4.4). Folglich demonstrierten diese Ergebnisse, dass es durch eine EGb 761-Behandlung nicht zu einer verstärkten Autophagie kam (Barth et al., 2010). Weiterhin ergaben die weiteren Immunoblot-Analysen, dass in beiden Behandlungen die zusätzliche Autophagie-Inhibition keine deutlichen Unterschiede im Proteingehalt der löslichen polyQ-Proteine bewirkte. Zudem ergaben die Immunoblot-Analysen, dass in beiden Behandlungen die Inhibition der Autophagie, keine Auswirkungen auf den Gehalt an unlöslichen polyQ-Proteinen hatte (Ergebnisse 3.4.3). Hierzu ergaben durchgeführte Filterretardierungs-Tests, dass auch hier die Autophagie-Inhibition keine Veränderungen im Gehalt an polyQ-Aggregaten bewirkte (Ergebnisse 3.4.3). Diese Ergebnisse demonstrierten, dass in den untersuchten Zellen kein autophagosomaler Abbau von polyQ-Proteinen, sowie von polyQ-Aggregaten stattfand (Li et al., 2010). Folglich konnte festgestellt werden, dass es in der EGb 761-induzierten Reduzierung von polyQ-Proteinaggregaten zu keiner Beteiligung der Autophagie kam (Filimonenko et al., 2010). Zusammenfassend bestätigten die Untersuchungen zur Autophagie, dass die beobachtete Reduzierung von polyQ-Aggregaten in EGb 761-behandelten Zellen durch eine verbesserte proteasomale Degradation von fehlgefalteten, aberranten polyQ-Proteinen bewirkt wurde.

4.2.3 Zusammenfassung der Wirkung von EGb 761 auf die Aggregation von polyQ-Proteinen

Anhand der Ergebnisse über die EGb 761-Wirkung auf die Aggregation aberranter polyQ-Proteine, konnte ein Zusammenhang mit den Ergebnissen einer EGb 761-induzierten erhöhten Proteasom-Aktivität in zellulären Modellen der HD (Diskussion 4.1) hergestellt werden.

Hierzu konnte die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass es durch eine EGb 761-Behandlung in zellulären Modellen der HD zu einer Reduzierung von polyQ-Aggregaten sowie zu einem verminderten Gehalt an aggregiertem polyQ-Protein kam. In diesem Mechanismus spielte die aberrante Verlängerung der untersuchten polyQ-Proteine eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass eine abnormale Länge der polyQ-Proteine (htt_Q46 und htt_Q103) zur Bildung von SDS-resistenten polyQ-Aggregaten führten und hierbei der Gehalt an SDS-löslichen polyQ-Proteinen im Vergleich zu normalen polyQ-Proteinen (htt_Q25) abnahm (Krobitsch and Lindquist, 2000). Hiermit wurde deutlich, dass aberrante Längen der polyQ-Proteine zu einer fehlerhaften β -Faltblattstruktur in der polyglutaminen Proteindomäne führten (Abb. 4.1) (Lakhani et al., 2010), wodurch sich die Stabilität und Halbwertszeit der exprimierten polyQ-Proteine wesentlich veränderte. So konnte gezeigt werden, dass lösliche polyQ-Proteine mit einer normalen Proteinfaltung eine lange Halbwertszeit aufwiesen (Kaytor et al., 2004), wohingegen Fehlfaltungen der polyQ-Proteine als starkes Degradationssignal fungierten und diese Proteine ähnlich kurze Halbwertszeiten (Abb. 4.1) wie destabilisierte Reporterproteine aufwiesen (Saunders et al., 2011). Hierzu konnte zudem gezeigt werden, dass die verminderte Degradation der fehlgefalteten polyQ-Proteine zur Akkumulation und Oligomerisierung der Proteine in SDS-resistente polyQ-Proteinaggregaten führte (Abb. 4.1) (Pratt and Rechsteiner, 2008). Demzufolge bewirkte eine EGb 761-Behandlung in Zellen mit Expressionen aberranter polyQ-Proteine eine effizientere bzw. erhöhte proteasomale Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen, wodurch weniger polyQ-Proteine aggregieren konnten und somit eine Reduzierung von polyQ-Aggregaten erreicht wurde (Abb. 4.1) (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Zudem konnten die durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die EGb 761-induzierte Reduzierung von polyQ-Aggregate nicht durch Effekte von EGb 761 auf die Expression oder die Faltung der polyQ-Proteine verursacht wurde, da der Gehalt an löslichen Proteinen nicht verändert wurde (Cashikar et al., 2005). Weiterhin ergaben durchgeführte Untersuchungen zur autophagosomalen Degradation, dass in der Degradation der polyQ-Proteine und Aggregate die Autophagie keine Funktion ausübte, wodurch

die Ergebnisse zur EGb 761-Wirkung über den proteasomalen Abbau bekräftigt wurden (Li et al., 2010).

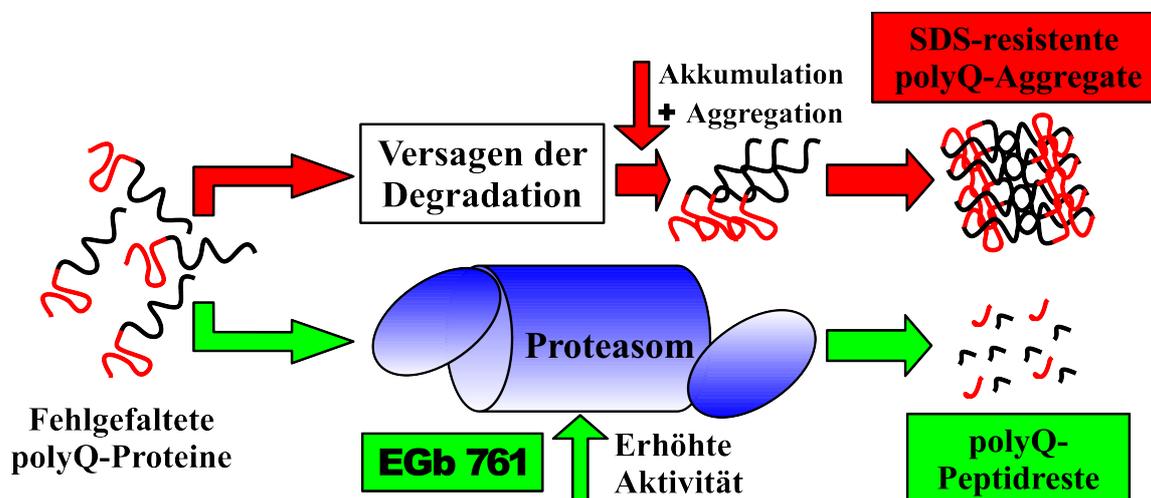


Abbildung 4.1: Wirkung von EGb 761 auf die Aggregation von polyQ-Proteinen. Die pathologische Verlängerung von polyQ-Proteinen erhöht die Rate an Fehlfaltungen der polyglutaminen Proteindomäne zur aggregationsfähigen β -Faltblattstruktur. Diese wird als Degradationssignal für einen schnellen proteasomalen Abbau erkannt, wobei die Fehlfaltungen den Proteinabbau erschweren. Folglich führt die verminderte Degradation zu einer Akkumulation und Aggregation der Proteine in SDS-resistente polyQ-Proteinaggregate. Hierbei bewirkt die EGb 761-Behandlung eine verbesserte bzw. erhöhte proteasomale Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen. Dies resultiert in einem verminderten Gehalt an aggregationsfähigen polyQ-Proteinen und führt somit zu einer Reduzierung von polyQ-Aggregaten.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten Studien von Li und Kollegen demonstrieren, dass in Modellen der Cardiomyopathien eine gesteigerte Proteasom-Aktivität die Menge an Proteinaggregaten reduziert (Li et al., 2011). Zudem belegten andere Studien, dass ein verbesserter proteasomaler Abbau von aberranten polyQ-Proteinen eine Reduzierung von polyQ-Aggregaten bewirkt (Michalik and Van Broeckhoven, 2004; Chow et al., 2012). Schließlich resultiert eine verminderte Aggregation von polyQ-Proteinen in weniger koaggregierten Proteinen des UPS, wodurch es zu einer allgemein verbesserten Proteindegradation kommt (Verhoef et al., 2002; Bennett et al., 2005) und hiermit die zelluläre Proteinhomöostasis stabilisiert wird (Ross and Tabrizi, 2011).

4.3 EGb 761 reduziert polyQ-Aggregate in erweiterten Modellen der HD *in vitro* und *in vivo*

Vor dem Hintergrund, dass die Ergebnisse einer EGb 761-induzierten Reduzierung von polyQ-

Aggregaten anhand von Untersuchungen mit klonalen HEK293-Zellen zu Stande kamen, sollte durch weitere Untersuchungen in erweiterten Modellen der HD, ein möglicher therapeutischer Einsatz von EGb 761 in der HD evaluiert werden. Hierzu wurden Untersuchungen mit primären humanen Fibroblasten sowie *in vivo* mittels transgener *C. elegans* durchgeführt.

4.3.1 EGb 761 vermindert den Gehalt an polyQ-Aggregaten in primären humanen Zellen

Zur Untersuchung einer möglichen therapeutischen Wirkung von EGb 761 in der HD wurden normale humane Fibroblasten (IMR-90) herangezogen, da diese Zellen auch als Modell der replikativen Seneszenz galten (Hayflick and Moorhead, 1961) und somit die EGb 761-Wirkung auch unter seneszenten Bedingungen untersucht werden konnte. Zudem war bekannt, dass es mit zunehmender Seneszenz der Zellen zu einer verminderte proteasomalen Proteindegradation kommt, während die autophagosomale Degradation zunimmt (Gamerding et al., 2009). Folglich wurde die EGb 761-Wirkung auf polyQ-Aggregate zuerst in jungen IMR-90-Zellen mit transienter Expression der polyQ-Proteine htt_Q25, htt_Q46, sowie htt_Q103 untersucht (Krobitsch and Lindquist, 2000). Anschließend wurden einige Schlüsselexperimente in gealterten Zellen durchgeführt, um einen möglichen Alterseffekt zu eruieren.

Wie die durchgeführten Untersuchungen ergaben, kam es in jungen IMR-90-Zellen durch die Expression von aberranten polyQ-Proteinen (htt_Q46 und htt_Q103) zur Bildung von fluoreszenten polyQ-Aggregaten (Ergebnisse 3.5.1) sowie zu einer Akkumulation von SDS-resistenten, aggregierten polyQ-Proteinen (Ergebnisse 3.5.2). Zudem ergaben die quantitative Analysen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, dass in jungen IMR-90-Zellen deutlich weniger polyQ-Aggregate gebildet wurden als in den untersuchten klonalen HEK293-Zellen. Hierzu konnte vermutet werden, dass diese Ergebnisse durch einen langsameren Stoffwechsel (King et al., 2008) und bzw. oder verbesserte Faltungsmechanismen (Jana et al., 2005) in den IMR-90-Zellen verursacht wurden. Diese Vermutung konnte anhand der Immunoblot-Analysen bekräftigt werden, da es im Unterschied zu den untersuchten HEK293-Zellen, in den jungen IMR-90-Zellen zu keinen signifikanten Unterschieden im Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen zwischen den exprimierten polyQ-Proteinen kam (Ergebnisse 3.5.2). Folglich lagen in den jungen IMR-90-Zellen mehr polyQ-Proteine mit einer normalen Proteinfaltung vor als in den HEK293-Zellen, und diese eine verbesserte Proteinfaltung durch molekulare Chaperone aufwiesen (Chafekar et al., 2012; Bailey et al., 2002), wodurch somit auch weniger polyQ-Aggregate entstanden (Ergebnisse 3.5.1). Weiterhin

konnten die Immunoblot-Analysen zeigen, dass die Expression aberranter polyQ-Proteine auch in den IMR-90-Zellen eine verminderte Proteasom-Aktivität verursachte, da hierbei der Gehalt an PolyUB-Proteinen signifikant anstieg (Hipp et al., 2012).

Interessanterweise konnte durch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen auch festgestellt werden, dass es in seneszenten IMR-90-Zellen zu einer erhöhten Bildung von polyQ-Aggregaten gegenüber jungen IMR-90-Zellen kam (Ergebnisse 3.5.2). Vor diesem Hintergrund konnten Studien zeigen, dass es im Laufe der replikativen Seneszenz zu einer verminderten proteasomalen Proteindegradation kommt (Gamerdinger et al., 2009), wodurch vermutet wurde, dass es in seneszenten Zellen zu einem reduzierten proteasomalen Abbau von fehlgefalteten polyQ-Proteinen kam und hierdurch mehr polyQ-Aggregate gebildet wurden (Li et al., 2010). Zudem bestätigten diese Ergebnisse, dass die Autophagie in keinen Einfluss auf die Degradation der polyQ-Aggregate hatte (Diskussion 4.2.2) (Filimonenko et al., 2010), da in seneszenten Zellen die Degradation über die Autophagie erhöht sein sollte (Gamerdinger et al., 2009).

Erstaunlicherweise konnten die durchgeführten Untersuchungen demonstrieren, dass eine EGb 761-Behandlung in jungen als auch in seneszenten Fibroblasten zu einer Reduzierung von polyQ-Proteinaggregaten führte (Ergebnisse 3.5.2 und 3.5.3) sowie die Anzahl Aggregat-tragender Zellen verminderte (Ergebnisse 3.5.1 und 3.5.3). Hierzu ergaben die durchgeführten Immunoblot-Analysen, dass die EGb 761-Behandlung keine Auswirkungen auf den Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen hatte (Ergebnisse 3.5.2), folglich auch keine verbesserte Faltung der Proteine induziert wurde (Cashikar et al., 2005) und auch die Expression der polyQ-Proteine nicht durch EGb 761 beeinflusst wurde (Martín-Aparicio et al., 2001). Zudem konnten die Immunoblot-Analysen zeigen, dass die EGb 761-Behandlung in Zellen mit Expressionen aberranter polyQ-Proteine zu einer signifikanten Abnahme im Gehalt an PolyUB-Proteinen führte und somit eine verbesserte Proteasom-Aktivität bewirkt wurde (Ergebnisse 3.5.2) (Kisselev and Goldberg, 2001). Folglich demonstrieren diese Ergebnisse, dass die EGb 761-Behandlung auch in primären humanen Fibroblasten Auswirkungen auf die Aggregation der polyQ-Proteine hatte. Interessanterweise waren diese beobachteten Wirkungen von EGb 761 äquivalent zu den Ergebnissen mit HEK293-Zellen (Diskussion 4.2), wodurch eine universelle Wirkung von EGb 761 auf die Aggregation aberranter polyQ-Proteine validiert wurde. Dementsprechend wurde vermutet, dass es auch in IMR-90-Zellen zu einer EGb 761-induzierten verbesserten proteasomalen Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen kam (Ergebnisse 3.5) und somit die polyQ-Proteinaggregation reduziert wurde (Abb. 4.1) (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Darüber hinaus demonstrieren die Ergebnisse aus

seneszenten Fibroblasten, dass die EGb 761-Behandlung sich positiv auf eine altersabhängige erhöhte Proteinaggregation auswirkte (Koga et al., 2011).

Angesichts dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass eine EGb 761-Behandlung eine mögliche Bedeutung in der Therapie der HD haben könnte (Krobitsch and Kazantsev, 2011), sowie in Erkrankungen mit altersabhängigen Störungen der Proteinhomöostasis (Mattson and Magnus, 2006).

4.3.2 EGb 761 reduziert polyQ-Aggregate und verbessert pathologische Phänotypen in transgenen *C. elegans*

Der Nematode *C. elegans* wird häufig für *in vivo* Untersuchungen der HD herangezogen (Satyal et al., 2000), da dieser Organismus eine kurze Generationszeit besitzt, biochemisch gut analysiert werden kann und Mutationen sich phänotypisch ausprägen (Brenner, 1974). Wie einige Studien zeigen konnten, kommt es in *C. elegans*-Modellen der Alzheimer-Krankheit (AD) durch eine Applikation von EGb 761 zu einigen positiven Effekten wie einer verminderten Proteinaggregation, verbesserten Phänotypen und verminderter Toxizität (Yuan, 2006).

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in zellulären Modellen der HD konnte beobachtet werden, dass eine EGb 761-Behandlung in Zellen zu einer verminderten Aggregation von polyQ-Proteinen führte. Folglich stellte sich die Frage, ob diese Wirkung von EGb 761 auch *in vivo* nachzuweisen wäre und EGb 761 auch einen Effekt auf *C. elegans*-Modelle der HD haben könnte. Hierzu wurden transgene Wurmstämme von *C. elegans* als Modellsystem der HD herangezogen, welche polyQ-Fusionsproteine, bestehend aus kurzen polyQ-Peptiden (40 Glutamin-Reste=Q40; 0 Glutamin-Reste=Q0 als Kontrolle) fusioniert mit YFP (polyQ-YFP) im Muskelgewebe exprimieren (Morley et al., 2002). Zusätzlich war bekannt, dass es bei untersuchten transgenen *C. elegans* zu einem charakteristischen Phänotyp kam, in welchem die aberrante Verlängerung der polyQ-Proteine auf 40 Glutamine (Q40) zur Proteinaggregation führte, welche direkt mit in einer verminderten Beweglichkeit der Nematoden korrelierte (Morley et al., 2002). Zur Durchführung der Untersuchungen wurden die Nematoden bis zum Adultsstadium von 3 Tagen (d3) dauerhaft auf NGM-Platten kultiviert, welche mit bakteriellen Kulturen versehen wurden, die zuvor mit 150 µg/ml EGb 761 bzw. Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel) supplementiert wurden.

Wie die durchgeführten Untersuchungen ergaben, kam es in adulten *C. elegans* durch die Expression von aberranter polyQ-Proteinen (Q40) zur Bildung von fluoreszente polyQ-Aggregate

in der Körperwand des Wurmes (Ergebnisse 3.6.1) sowie zu einer Akkumulation von SDS-resistenten, aggregierten polyQ-Proteinen (Ergebnisse 3.6.2). Im Gegensatz hierzu konnte in den Kontroll-Nematoden (Q0) eine gleichförmige Verteilung der Proteine beobachtet werden (Ergebnisse 3.6.1), sowie in proteinbiochemischen Untersuchungen nur lösliche polyQ-Proteine festgestellt werden (Ergebnisse 3.6.2). Interessanterweise führte die Aggregation der polyQ-Proteine auch in den Nematoden zu einem verminderten Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen im Vergleich zur Kontrolle (Satyal et al., 2000) sowie zu einem erhöhten Gehalt an PolyUB-Proteinen (Ergebnisse 3.6.2). Hierdurch wurde deutlich, dass die Expression aberranter polyQ-Proteine auch in transgenen *C. elegans* zu einer verminderten Proteasom-Aktivität führte (Hipp et al., 2012). Somit waren diese Beobachtungen einer Aggregation von aberranten polyQ-Proteinen (Ergebnisse 3.6) äquivalent zu den Beobachtungen in HEK293-Zellen (Ergebnisse 3.4) und IMR-90-Zellen (Ergebnisse 3.5), wodurch in transgenen *C. elegans* ein ähnlicher Mechanismus für die Aggregation der polyQ-Proteine, durch nicht-abgebaute, fehlgefaltete polyQ-Proteine dargestellt wurde (Cummings et al., 1999). Zudem konnte durch Analyse der Nematoden-Beweglichkeit mittels eines erstellten Beweglichkeits-Index verdeutlicht werden, dass die Bildung von polyQ-Aggregaten zu einer verminderten Beweglichkeit der Nematoden führte (Ergebnisse 3.6.3) und bestätigte die Zytotoxizität der Aggregate *in vivo* (Hackam et al., 1998).

Bemerkenswerterweise führte die dauerhafte Kultivierung der Nematoden mit EGb 761 zu einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität der polyQ-Aggregate (Ergebnisse 3.6.1), sowie einem vermindertem Gehalt an unlöslichen, aggregierten polyQ-Proteinen (Ergebnisse 3.6.2). Zudem kam es durch die EGb 761-Kultivierung zu einer Abnahme im Gehalt an PolyUB-Proteinen (Ergebnisse 3.6.2), wodurch eine verbesserte Proteasom-Aktivität durch die EGb 761-Behandlung vermutet wurde (Lindsten and Dantuma, 2003). Diese Ergebnisse waren ähnlich zu den Ergebnissen der untersuchten zellulären Modellen der HD (Ergebnisse 3.4), wodurch auch für die beobachtete Reduzierung der polyQ-Aggregate in transgenen *C. elegans* eine verbesserte Degradation der polyQ-Proteine vermutete wurde (Li et al., 2008).

Interessanterweise konnte mit der EGb 761-Kultivierung in Q40-exprimierenden Nematoden aber auch eine signifikante Erhöhung der löslichen polyQ-Proteine beobachtet werden (Ergebnisse 3.6.2). Dieser Effekt wurde mit der Reduzierung an polyQ-Proteinaggregaten und der einhergehenden Koaggregation von molekularen Chaperonen erklärt (Satyal et al., 2000), wodurch die löslichen polyQ-Proteine stabilisiert wurden (Morley et al., 2002). Hierzu konnten weitere Analysen zeigen, dass die EGb 761-Kultivierung in Kontroll-Nematoden (Q0) keine Auswirkungen

auf den Gehalt an löslichen polyQ-Proteinen hatte (Ergebnisse 3.6.2), wodurch auch hier ein genereller Effekt von EGb 761 auf die Expression von polyQ-Proteinen ausgeschlossen wurde (Martín-Aparicio et al., 2001). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die EGb 761-Kultivierung der Q40-exprimierenden Nematoden in einer signifikanten Erhöhung der Motilität resultiert, während die Beweglichkeit der Kontroll-Nematoden unverändert blieb (Ergebnisse 3.6.3). Folglich zeigten diese Ergebnisse, dass die Wirkung von EGb 761 spezifische auf der Reduzierung der polyQ-Aggregate beruhte (Morley et al., 2002) und hierdurch auch die Zytotoxizität der Aggregate vermindert wurde (Zhang et al., 2005).

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass es durch eine EGb 761-Kultivierung der transgenen Nematoden zu einer verringerten Aggregation aberranter polyQ-Proteine kam und dies zu einer verbesserten Motilität, sowie einer Abmilderung der Zytotoxizität führte. Folglich waren diese Ergebnisse äquivalent zu den Ergebnissen aus zellulären Modellen der HD, wodurch auch für die transgenen *C. elegans* eine erhöhte Degradation fehlgefalteter polyQ-Proteine durch eine verbesserten Proteasom-Aktivität postuliert wurde (Abb. 4.1) (Michalik and Van Broeckhoven, 2004).

Interessanterweise konnten Studien von Wu und Kollegen in *C. elegans*-Modellen der AD ähnliche Effekte durch eine EGb 761-Behandlung auf die pathologischen Phänotypen sowie die Reduzierung von A β -Oligomeren feststellen (Wu et al., 2006). Somit zeigten die Ergebnisse mit transgenen *C. elegans*, dass eine Behandlung mit EGb 761 auch *in vivo* zu positiven Wirkungen führte. Somit könnten EGb 761-Behandlungen in der Therapie der HD und anderen neurodegenerativer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen (Lanucara et al., 2010).

4.3.3 Zusammenfassung der EGb 761-Wirkung in erweiterten Modellen der HD *in vitro* und *in vivo*

Anhand der Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen in erweiterten Modellen der HD konnte eine EGb 761-Wirkung auf die Aggregation aberranter polyQ-Proteine *in vitro* und *in vivo* dargestellt werden. Zudem zeigten diese Ergebnisse, dass hierbei ein Zusammenhang mit der EGb 761-induzierten erhöhten Proteasom-Aktivität (Diskussion 4.1) bestand. Hierzu konnte die durchgeführten Untersuchungen in erweiterten Modellen der HD zeigen, dass es durch eine EGb 761-Behandlung sowohl in den analysierten Fibroblasten-Modellen (*in vitro*) als auch in den untersuchten *C. elegans*-Modellen (*in vivo*) zu einer Reduzierung von polyQ-Aggregaten sowie zu

einem verminderten Gehalt an aggregiertem polyQ-Protein kam. Zusammen mit den Ergebnissen aus klonalen HEK293-Zellen ließ sich hierdurch ein universeller Effekt von EGb 761 auf die Proteinaggregation ableiten. Hierbei wurde vermutet, dass die EGb 761-Behandlung zu einer verbesserten proteasomalen Degradation aberranter polyQ-Proteine führte und somit die Aggregation der polyQ-Proteine vermindert wurde (Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Zusätzlich konnten gezeigt werden, dass es in seneszenten Fibroblasten auf Grund einer altersabhängigen Verminderung der Proteasom-Aktivität zu einer erhöhten Aggregation von polyQ-Proteinen kam (Kourtis and Tavernarakis, 2011) und auch hier eine EGb 761-Behandlung diesen Effekt abmildern konnte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die polyQ-Proteinaggregate zytotoxische Effekte verursachten und dies sich in einer verminderten Motilität von Nematoden ausprägte (Morley et al., 2002). Auch hier konnte die EGb 761-Behandlung durch Reduzierung der Proteinaggregation eine Abmilderung der zytotoxischen Effekte induzieren und verbesserte die Motilität der pathologisch eingeschränkten Bewegungen der Nematoden (Morley et al., 2002). Folglich validierten die durchgeführten Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*, dass die EGb 761-Behandlung eine universelle Wirkung auf die Aggregation aberranter polyQ-Proteine hatte. Angesichts dieser Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* wurde postuliert, dass EGb 761 eine verbesserte proteasomale Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen bewirkte und somit eine verminderte Aggregation von polyQ-Proteinen induziert wurde (Abb. 4.1) (Chow et al., 2012). Darüber hinaus demonstrierten die Ergebnisse, dass sich die EGb 761-Behandlung positiv auf eine altersabhängige erhöhte Proteinaggregation auswirkte (Koga et al., 2011) und zytotoxische Effekte der polyQ-Aggregate abmilderte (Stack et al., 2008).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten Studien von Wu und Kollegen demonstrieren, dass eine EGb 761-Behandlung von *C. elegans*-Modellen der AD, die Oligomerisierung von A β -Peptiden verminderte und pathologisch-induzierte Phänotypen abmilderte (Wu et al., 2006). Zudem belegten andere *in vivo* Studien, dass eine gesteigerte Aktivität des Proteasoms (Seo et al., 2007) sowie eine Reduzierung von polyQ-Aggregaten (Martín-Aparicio et al., 2001) zu erhöhten Überlebensraten in Maus-Modellen der HD führten. In diesem Zusammenhang konnten Zhang und Kollegen in *Drosophila*-Modellen der HD zeigen, dass die Reduzierung von polyQ-Aggregaten die Zytotoxizität reduzierte (Zhang et al., 2005).

Hiermit ergaben die durchgeführten Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*, dass die Behandlung mit EGb 761 eine potentielle Anwendung in der Therapie der HD (Ross and Tabrizi, 2011) sowie in

anderen Erkrankungen mit gestörter Proteinhomöostasis haben könnte (Lanucara et al., 2010).

4.4 Relevanz der Ergebnisse und Ausblick

Die therapeutische Anwendung von sogenannten Phytopharmaka wird immer häufiger als Alternative zu den etablierten Pharmakons in Betracht gezogen, da die Zugänglichkeit dieser

pflanzlichen Substanzen häufig einfacher und kostengünstiger ist (Eussen et al., 2011; Wurtman, 2011). Die in diesen natürlichen Substanzen vorkommenden Antioxidantien könnten in vielen neurodegenerativen Erkrankungen eine therapeutische Wirkung auf oxidativen Stress und die zelluläre Homöostasis haben (Moosmann and Behl, 2002; Halliwell, 2002). In der großen Masse an Phytopharmaka spielt der *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb 761 eine zentrale Rolle, da dieser Extrakt als gut untersucht gilt und nur geringe Nebenwirkungen zeigt (Mahadevan and Park, 2008). Hierbei wurde die Wirkung von EGb 761 vor allem in der Alzheimer-Krankheit (AD) untersucht, die Ergebnisse zur Wirkung auf die AD aber sehr unterschiedlich ausfielen (DeKosky et al., 2008; Amieva et al., 2013). Trotz dieser unzureichenden Ergebnisse, könnten die diversen Inhaltsstoffe von EGb 761 eine positive Wirkung in anderen neurodegenerativen Erkrankungen haben (Mahadevan and Park, 2008), welche durch die Aggregation von mutanten Proteinen gekennzeichnet sind (Chen et al., 2011).

Wie die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit ergaben, konnte *in vitro* und *in vivo* durch eine Behandlung mit EGb 761, eine Reduzierung in der Aggregation von mutanten polyQ-Proteinen erreicht werden (Goldberg et al., 1993). Hierfür wurde gezeigt, dass die EGb 761-Behandlung eine verbesserte proteasomale Degradation von fehlgefalteten polyQ-Proteinen induzierte (Scherzinger et al., 1997; Michalik and Van Broeckhoven, 2004). Diese Ergebnisse werden durch Studien gestützt, welche zeigen konnten, dass ein erhöhter Abbau von aberranten polyQ-Proteinen zu weniger polyQ-Aggregaten führt und die Überlebensraten *in vivo* erhöhen kann (Chow et al., 2012; Seo et al., 2007). Zudem konnten einige Studien in Modellen der AD, ähnliche Effekte durch eine EGb 761-Behandlung auf die Aggregation von A β -Peptiden und der pathologischen Phänotypen feststellen (Wu et al., 2006; Rhein et al., 2010; Ramassamy et al., 2007). Folglich konnten ein universeller Mechanismus von EGb 761 auf die Aggregation von aberranten Proteinen postuliert werden, welcher vermutlich über die verbesserte Degradation der pathogenen Proteine induziert wird. Hiermit ergaben die erhaltenen *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Frage nach einer potentiellen Anwendung von EGb 761 in der Therapie der HD (Ross and Tabrizi, 2011).

Zudem zeigten die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit, dass die EGb 761-Behandlung zu einer allgemeinen Erhöhung der Proteasom-Aktivität und proteasomalen Proteindegradation führt. Diese Ergebnisse wurden durch Studien gestützt, welche eine NRF2-induzierte erhöhte Proteasom-Aktivität durch diverse Antioxidantien demonstrieren konnten, welche auch im *Ginkgo biloba*-Extrakt zu finden sind (Kwak et al., 2003; Arlt et al., 2009; Kapeta et al., 2010). Hierbei ist zu

beachten, dass eine Erhöhung der Proteasom-Aktivität *per se* aber nicht unbedingt immer von Nutzen ist, da es in Krebszellen auch zu einer erhöhten proteasomalen Aktivität kommt und somit die Aktivierung des Proteasoms in gesunden Zellen auch kritisch gesehen werden kann (Burger and Seth, 2004). Weiterhin sollte in zukünftigen Studien auch die Wirkung von EGb 761 auf Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems, wie Ubiquitin und Chaperone, erweitert werden, da diese für diese Proteine essentiell wichtig für die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostasis sind (Alvarez-Castelao et al., 2012; Roth and Balch, 2011).

Abschließend bilden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen zur Wirkung von EGb 761 auf die zelluläre Proteinhomöostasis. Da es in vielen Erkrankungen mit einer gestörten Proteinhomöostasis zu einem verminderten proteasomalen Abbau von aberranten Proteinen kommt, könnte hierbei eine verbesserte proteasomale Degradation dieser aberranten Proteine zu einer verringerten Proteinaggregation und verbesserten Proteinhomöostasis führen (Paul, 2008). Somit könnte die EGb 761-Behandlung auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu einer Verbesserung der proteasomalen Aktivität führen und somit eine erhöhte Degradation von aberranter Proteine induzieren, was schließlich in einer Abmilderung der pathologischen Kennzeichen dieser Erkrankungen führen könnte (Mahadevan and Park, 2008). Somit könnten die erhaltenen Ergebnisse zur Wirkungsweise von EGb 761 eventuell von therapeutischer Bedeutung in neurodegenerativen Erkrankungen sein sowie im Hinblick auf eine altersabhängige Abnahme der Proteasom-Aktivität und proteasomale Proteindegradation (Mattson and Magnus, 2006; Koga et al., 2011).

5 Zusammenfassung

Der *Ginkgo biloba*-Extrakt EGb 761 besteht aus einer Reihe pharmakologisch wirksamer Substanzen, welche gut beschriebene Wirkungen auf verschiedene potentiell zytoprotektive Signalwege ausüben und unter anderem antioxidative Wirksamkeit haben. Folglich wurde EGb 761 bisher als eine natürliche Behandlung bei neurodegenerativen Erkrankungen mit zellulären oxidativen Stress angewendet, einschließlich der Alzheimer-Krankheit (AD). Aufgrund von vielen gemeinsamen Merkmalen zwischen der AD und der Huntington-Krankheit (HD) wurde vermutet, dass EGb 761 eventuell auch positive Wirksamkeit bei der HD aufweisen könnte.

Die Neuropathologie der HD wird durch pathologische Verlängerung an Glutamin-Wiederholungen im Huntingtin-Protein (polyQ-Protein) verursacht, wodurch es zu Fehlfaltungen im Protein kommt und hierdurch der proteasomale Abbau aberranter Proteine erschwert wird. Somit kommt es zu einer verminderten Degradation dieser fehlgefalteten Proteine, wodurch diese akkumulieren und aggregieren und schließlich Proteinaggregate bilden. Somit sollten in der vorliegenden Arbeit die EGb 761-Wirkungen auf die Proteasom-Aktivität und die Proteinaggregation in zellulären Modellen der HD untersucht werden.

Wie die ersten Untersuchungen in nativen HEK293-Zellen ergaben, bewirkte die Behandlung der Zellen mit EGb 761 eine Steigerung der basalen Proteasom-Aktivität sowie des proteasomalen Proteinabbaus und erhöhte die Transkription proteasomaler Gene. Hieraus ergaben sich Untersuchungen in Zellen mit Expressionen pathologischer Varianten von polyQ-Proteinen als zelluläre Modelle der HD. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Expression aberranter polyQ-Proteine eine verminderte Proteasom-Aktivität bewirkte. Interessanterweise verursachte EGb 761 eine Abmilderung der pathologisch-induzierten verminderten Proteasom-Aktivität, in dem die EGb 761-Behandlung der Zellen zu einer erhöhten Proteasom-Aktivität, einem verbesserten proteasomalen Proteinabbau, sowie zu einer erhöhten Transkription proteasomaler Gene führte. Da diese EGb 761-Effekte unabhängig von der Expression aberranter polyQ-Proteine waren, demonstrierten diese Ergebnisse eine allgemeine EGb 761-Wirkungen auf die Proteasom-Aktivität. Somit wurde für die EGb 761-Wirkung ein Mechanismus postuliert, in dem EGb 761 die Aktivierung des NRF2-KEAP1-Signalwegs bewirkte, dies die Transkription der katalytischen proteasomaler Gene induzierte und schließlich zur höheren Proteasom-Aktivität führte. Anhand dieser Ergebnisse sollten anschließend weitere Untersuchungen mit zellulären Modellen der HD die genaue Wirkung von EGb 761 auf die Degradation von abnormal verlängerten polyQ-Proteinen sowie auf die Bildung von polyQ-Aggregaten klären.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Expression aberranter polyQ-Proteinen zu einer Akkumulation von SDS-resistenten bzw. SDS-unlöslichen, aggregierten polyQ-Proteinen führte, sowie die Bildung von sichtbaren polyQ-Aggregaten in Zellen bewirkte. Hierbei verursachte eine EGb 761-Behandlung der Zellen eine signifikante Verminderung im Gehalt an SDS-resistenten polyQ-Proteinen sowie eine Reduzierung von Aggregat-tragenden Zellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition des Proteasoms in EGb 761-behandelten Zellen, den Gehalt an SDS-unlöslichen polyQ-Proteinaggregaten wieder erhöhte und somit den Effekt von EGb 761 aufhob. Folglich zeigten diese Ergebnisse, dass die EGb 761-induzierte Reduzierung der polyQ-Proteinaggregate durch einen effizienteren proteasomalen Abbau von fehlgefalteten, aberranten polyQ-Proteinen bewirkt wurde.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde eine experimentell-therapeutische Anwendung von EGb 761 in Modellen der HD *in vitro* und *in vivo* überprüft und hierzu primäre humane Fibroblasten sowie transgene *C. elegans* Würmer mit Expressionen aberranter polyQ-Proteine untersucht. Interessanterweise konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass die EGb 761-Behandlung auch hier eine Reduzierung von SDS-unlöslichen polyQ-Proteinen bewirkte sowie die Anzahl an sichtbaren polyQ-Aggregaten verminderte und zudem eine Reduzierung des pathologisch erhöhten Gehalts an Polyubiquitin-Proteinen bewirkte. Folglich wurde auch hier vermutet, dass EGb 761 einen verbesserten proteasomalen Abbau von polyQ-Proteinen induzierte und dies eine Verminderung der polyQ-Proteinaggregate verursachte. Darüber hinaus führte die EGb 761-Behandlung von seneszenten Fibroblasten zur Reduzierung von altersabhängig erhöhten Mengen von polyQ-Aggregaten, wodurch ein therapeutischer Effekt auf den proteasomalen Abbau der polyQ-Proteine verdeutlicht wurde. Zusätzlich konnte in polyQ-transgenen *C. elegans* demonstriert werden, dass eine EGb 761-Behandlung die Abmilderung eines typischen pathologischen Phänotyps bewirkte, indem eine polyQ-induzierte verminderte Motilität der Nematoden verbessert wurde und hierdurch eine positive EGb 761-Wirkung auf die Pathologie der HD *in vivo* dargestellt wurde.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit neue Wirkungen von EGb 761 in der HD demonstriert werden. Hierbei wurde gezeigt, dass EGb 761 die Aggregation von pathogenen aberranten polyQ-Proteinen *in vitro* und *in vivo* reduziert, indem eine effizientere Degradation von polyQ-Proteinen erfolgt. Somit könnten diese Wirkungen von EGb 761 eine potentiell therapeutische Anwendung in der HD und ähnliche neurodegenerativen Erkrankungen darstellen.

5 Summary

The *Ginkgo biloba* extract EGb 761 is a multifaceted composition of pharmacological effective substances, with well-described effects on different cytoprotective signaling pathways and antioxidative activities. Consequently, EGb 761 has been used as a natural treatment for a variety of disorders associated with cellular oxidative stress, as well as in the neurodegenerative Alzheimer's disease (AD). Based on many common hallmarks between AD and Huntington's disease (HD), it was suggested that EGb 761 could also have beneficial effects in HD. The neuropathology of HD is caused by pathological expansions repeats of glutamines in the huntingtin protein (polyQ protein), leading to misfolding of the protein and hereby exacerbating the proteasomal degradation of the aberrant protein. Thus, degradation of the misfolded protein is reduced, resulting in an accumulation and aggregation of these proteins, finally yielding in SDS-resistant protein aggregates. Therefore, the aim of this study was to investigate the properties of EGb 761 on proteasome activity and protein aggregation, in cellular models of HD.

The first conducted experiments in native HEK293 cells revealed that the treatment with EGb 761 increased the basal proteasome activity, enhanced protein degradation and induced a higher transcription of proteasome genes. As a consequence, further experiments were performed in cells expressing pathologic variants of polyQ proteins, as cellular models of HD. Thus, it was demonstrated that the expression of aberrant polyQ proteins resulted in a reduced proteasome activity. Interestingly, EGb 761 attenuated the pathologic decrease of proteasome activity by an induced increase of proteasome activity, enhanced proteasomal protein degradation and an elevated transcription of proteasome genes. Hence, as these effects of EGb 761 occurred in all cells despite their expression of polyQ proteins, these results indicated a ubiquitous impact of EGb 761 on proteasome activity. Therefore, a mechanism for the activity of EGb 761 was proposed, in which EGb 761 activated the NRF2-KEAP1 pathway and thereby inducing the transcription of catalytic proteasome genes, resulting in a higher proteasome activity. Based on these findings, further experiments were conducted in cellular models of HD to clarify the effects of EGb 761 on the degradation of aberrant expanded polyQ proteins and the formation of polyQ aggregates.

Consequently, the performed experiments demonstrated that the expression of aberrant polyQ proteins resulted in the accumulation of SDS-resistant or SDS-insoluble aggregated polyQ proteins and caused the formation of visible polyQ aggregates in cells. Thus, the treatment of cells with EGb 761 induced significantly lower levels of SDS-insoluble polyQ proteins and a reduced the amount of cells bearing polyQ aggregates. Hence, it was shown that a pharmacological proteasome

inhibition of EGb 761 treated cells led to an increase of SDS-insoluble aggregated polyQ proteins, thereby abolishing the effect of EGb 761. Therefore these data showed that EGb 761 induced reduction of polyQ protein aggregates was mediated through a more efficient proteasomal degradation of misfolded aberrant polyQ proteins.

In addition, a potential therapeutic usage of EGb 761 in HD was tested *in vitro* and *in vivo*, by investigating human fibroblasts, as well as transgenic *C. elegans*, expressing aberrant polyQ proteins. Interestingly, it was shown *in vitro* and *in vivo* that the EGb 761-treatment was also effective in reducing SDS-insoluble polyQ proteins, in the alleviation of visible polyQ aggregates and in reducing pathologic elevated levels of polyubiquitin proteins. Thus, it was presumed that EGb 761 induced an enhanced proteasomal degradation of polyQ proteins thereby reducing polyQ aggregates. Moreover, the EGb 761-treatment of senescent fibroblasts reduced age-dependent elevated amounts of polyQ aggregates, revealing a therapeutic effect on the proteasomal degradation of polyQ proteins. Furthermore, the treatment with EGb 761 ameliorated a pathologic phenotype in transgenic *C. elegans* through enhancing a reduced motility of the nematodes, showing a beneficial effect of EGb 761 on the HD pathology *in vivo*.

In summary, this study demonstrated new effects of EGb 761 in HD. Hence, it was shown that EGb 761 reduces the aggregation of pathogenic aberrant polyQ proteins *in vitro* and *in vivo*, by enhancing the proteasomal degradation of polyQ proteins. Conclusively, these effects of EGb 761 could have a therapeutic relevance in HD and similar neurodegenerative diseases.

6 Literaturverzeichnis

Ahlemeyer, B., and Krieglstein, J. (2003). Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. *Cell. Mol. Life Sci* 60, 1779–1792.

Alvarez-Castelao, B., Ruiz-Rivas, C., and Castaño, J.G. (2012). A Critical Appraisal of Quantitative Studies of Protein Degradation in the Framework of Cellular Proteostasis. *Biochemistry Research International* 2012, 1–11.

Amieva, H., Meillon, C., Helmer, C., Barberger-Gateau, P., and Dartigues, J.F. (2013). Ginkgo Biloba Extract and Long-Term Cognitive Decline: A 20-Year Follow-Up Population-Based Study. *PLoS ONE* 8, e52755.

Amri, H., Ogwuegbu, S.O., Boujrad, N., Drieu, K., and Papadopoulos, V. (1996). In vivo regulation of peripheral-type benzodiazepine receptor and glucocorticoid synthesis by Ginkgo biloba extract EGb 761 and isolated ginkgolides. *Endocrinology* 137, 5707–5718.

Andreatta, C., Nahreini, P., Hovland, A.R., Kumar, B., Edwards-Prasad, J., and Prasad, K.N. (2001). Use of short-lived green fluorescent protein for the detection of proteasome inhibition. *BioTechniques* 30, 656–660.

Arlt, A., Bauer, I., Schafmayer, C., Tepel, J., Mürköster, S.S., Brosch, M., Röder, C., Kalthoff, H., Hampe, J., Moyer, M.P., et al. (2009). Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene* 28, 3983–3996.

Bailey, C.K., Andriola, I.F.M., Kampinga, H.H., and Merry, D.E. (2002). Molecular chaperones enhance the degradation of expanded polyglutamine repeat androgen receptor in a cellular model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 11, 515–523.

Bano, D., Zanetti, F., Mende, Y., and Nicotera, P. (2011). Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell Death Dis* 2, e228.

Barth, S., Glick, D., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: assays and artifacts. *The Journal of Pathology* 221, 117–124.

- Bastianetto, S., Zheng, W., and Quirion, R. (2000). The Ginkgo biloba Extract (EGb 761) Protects and Rescues Hippocampal Cells Against Nitric Oxide-Induced Toxicity. *Journal of Neurochemistry* 74, 2268–2277.
- Baumeister, W., Cejka, Z., Kania, M., and Seemüller, E. (1997). The proteasome: a macromolecular assembly designed to confine proteolysis to a nanocompartment. *Biol. Chem.* 378, 121–130.
- Van Beek, T.A. (2002). Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts. *Journal of Chromatography A* 967, 21–55.
- Van Beek, T.A., and Montoro, P. (2009). Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *J Chromatogr A* 1216, 2002–2032.
- Van Beek, T.A., and Wintermans, M.S. (2001). Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from Ginkgo biloba. *Journal of Chromatography A* 930, 109–117.
- Bence, N.F., Sampat, R.M., and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System by Protein Aggregation. *Science* 292, 1552–1555.
- Bennett, E.J., Bence, N.F., Jayakumar, R., and Kopito, R.R. (2005). Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol. Cell* 17, 351–365.
- Bennett, E.J., Shaler, T.A., Woodman, B., Ryu, K.-Y., Zaitseva, T.S., Becker, C.H., Bates, G.P., Schulman, H., and Kopito, R.R. (2007). Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* 448, 704–708.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). Protein Turnover Is Tightly Regulated.
- Bidon, C., Lachuer, J., Molgó, J., Wierinckx, A., de la Porte, S., Pignol, B., Christen, Y., Meloni, R., Koenig, H., Biguet, N.F., et al. (2009). The Extract of Ginkgo biloba EGb 761 Reactivates a Juvenile Profile in the Skeletal Muscle of Sarcopenic Rats by Transcriptional Reprogramming. *PLoS One* 4.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.

- Brunetti, L., Orlando, G., Menghini, L., Ferrante, C., Chiavaroli, A., and Vacca, M. (2006). Ginkgo biloba Leaf Extract Reverses Amyloid β -Peptide-Induced Isoprostane Production in Rat Brain *in vitro*. *Planta Med* 72, 1296–1299.
- Burger, A.M., and Seth, A.K. (2004). The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *European Journal of Cancer* 40, 2217–2229.
- Cashikar, A.G., Duennwald, M., and Lindquist, S.L. (2005). A Chaperone Pathway in Protein Disaggregation HSP26 ALTERS THE NATURE OF PROTEIN AGGREGATES TO FACILITATE REACTIVATION BY HSP104. *J. Biol. Chem.* 280, 23869–23875.
- Caviston, J.P., Ross, J.L., Antony, S.M., Tokito, M., and Holzbaur, E.L.F. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10045–10050.
- Chafekar, S.M., Wisén, S., Thompson, A.D., Echeverria, A., Walter, G.M., Evans, C.G., Makley, L.N., Gestwicki, J.E., and Duennwald, M.L. (2012). Pharmacological Tuning of Heat Shock Protein 70 Modulates Polyglutamine Toxicity and Aggregation. *ACS Chem. Biol.* 7, 1556–1564.
- Chan, P.-C., Xia, Q., and Fu, P.P. (2007). Ginkgo biloba leave extract: biological, medicinal, and toxicological effects. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 25, 211–244.
- Chen, Z., and Pickart, C.M. (1990). A 25-kilodalton ubiquitin carrier protein (E2) catalyzes multi-ubiquitin chain synthesis via lysine 48 of ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 265, 21835–21842.
- Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., and Frydman, J. (2011). Cellular Strategies of Protein Quality Control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Chen, S., Berthelie, V., Hamilton, J.B., O’Nuallain, B., and Wetzel, R. (2002). Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. *Biochemistry* 41, 7391–7399.
- Chow, W.N.V., Luk, H.W., Chan, H.Y.E., and Lau, K. (2012). Degradation of mutant huntingtin via the ubiquitin/proteasome system is modulated by FE65. *Biochemical Journal* 443, 681–689.
- Ciechanover, A. (2005). Intracellular Protein Degradation: From a Vague Idea, through the Lysosome and the Ubiquitin–Proteasome System, and onto Human Diseases and Drug Targeting

(Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 44, 5944–5967.

Corish, P., and Tyler-Smith, C. (1999). Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.* 12, 1035–1040.

Cummings, C.J., Reinstein, E., Sun, Y., Antalffy, B., Jiang, Y., Ciechanover, A., Orr, H.T., Beaudet, A.L., and Zoghbi, H.Y. (1999). Mutation of the E6-AP Ubiquitin Ligase Reduces Nuclear Inclusion Frequency While Accelerating Polyglutamine-Induced Pathology in SCA1 Mice. *Neuron* 24, 879–892.

Dantuma, N.P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M., and Masucci, M.G. (2000). Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat Biotech* 18, 538–543.

Davies, J.E., Sarkar, S., and Rubinsztein, D.C. (2007). The ubiquitin proteasome system in Huntington's disease and the spinocerebellar ataxias. *BMC Biochem* 8, S2.

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.

DeFeudis, F.V. (2002). Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on gene expression: Possible relevance to neurological disorders and age-associated cognitive impairment. *Drug Development Research* 57, 214–235.

DeFeudis, F.V., and Drieu, K. (2000). Ginkgo biloba extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr Drug Targets* 1, 25–58.

DeKosky, S.T., Williamson, J.D., Fitzpatrick, A.L., Kronmal, R.A., Ives, D.G., Saxton, J.A., Lopez, O.L., Burke, G., Carlson, M.C., Fried, L.P., et al. (2008). Ginkgo biloba for Prevention of Dementia: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 300, 2253–2262.

Díaz-Hernández, M., Torres-Peraza, J., Salvatori-Abarca, A., Morán, M.A., Gómez-Ramos, P., Alberch, J., and Lucas, J.J. (2005). Full motor recovery despite striatal neuron loss and formation of irreversible amyloid-like inclusions in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J.*

Neurosci. 25, 9773–9781.

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

Ding, W.-X. (2010). Role of autophagy in liver physiology and pathophysiology. *World Journal of Biological Chemistry* 1, 3.

Dobson, C.M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 3–16.

Eussen, S.R.B.M., Verhagen, H., Klungel, O.H., Garssen, J., van Loveren, H., van Kranen, H.J., and Rompelberg, C.J.M. (2011). Functional foods and dietary supplements: Products at the interface between pharma and nutrition. *European Journal of Pharmacology* 668, Supplement 1, S2–S9.

Farlow, M.R., Miller, M.L., and Pejovic, V. (2008). Treatment Options in Alzheimer's Disease: Maximizing Benefit, Managing Expectations. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 25, 408–422.

Filimonenko, M., Isakson, P., Finley, K.D., Anderson, M., Jeong, H., Melia, T.J., Bartlett, B.J., Myers, K.M., Birkeland, H.C.G., Lamark, T., et al. (2010). The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Mol. Cell* 38, 265–279.

Finkbeiner, S., and Mitra, S. (2008). The ubiquitin-proteasome pathway in Huntington's disease. *ScientificWorldJournal* 8, 421–433.

Fourtillan, J.B., Brisson, A.M., Girault, J., Ingrand, I., Decourt, J.P., Drieu, K., Jouenne, P., and Biber, A. (1995). [Pharmacokinetic properties of Bilobalide and Ginkgolides A and B in healthy subjects after intravenous and oral administration of Ginkgo biloba extract (EGb 761)]. *Therapie* 50, 137–144.

Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell* 19, 2092–2100.

- Fukui, H., and Moraes, C.T. (2007). Extended polyglutamine repeats trigger a feedback loop involving the mitochondrial complex III, the proteasome and huntingtin aggregates. *Hum. Mol. Genet* 16, 783–797.
- Gafni, J., Hermel, E., Young, J.E., Wellington, C.L., Hayden, M.R., and Ellerby, L.M. (2004). Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 279, 20211–20220.
- Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Hartl, F.U., and Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J* 28, 889–901.
- Gatchel, J.R., and Zoghbi, H.Y. (2005). Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat. Rev. Genet.* 6, 743–755.
- Gertz, H.-J., and Kiefer, M. (2004). Review about Ginkgo biloba special extract EGb 761 (Ginkgo). *Curr. Pharm. Des.* 10, 261–264.
- Giguere, C.J., and Schnellmann, R.G. (2008). Limitations of SLLVY-AMC in calpain and proteasome measurements. *Biochem Biophys Res Commun* 371, 578–581.
- Gil-Parrado, S., Fernández-Montalván, A., Assfalg-Machleidt, I., Popp, O., Bestvater, F., Holloschi, A., Knoch, T.A., Auerswald, E.A., Welsh, K., Reed, J.C., et al. (2002). Ionomycin-activated Calpain Triggers Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 277, 27217–27226.
- Glass, J.R., and Gerner, E.W. (1987). Spermidine mediates degradation of ornithine decarboxylase by a non-lysosomal, ubiquitin-independent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 130, 133–141.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., et al. (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol. Biol. Rep.* 26, 21–28.
- Goh, L.M.L., and Barlow, P.J. (2004). Flavonoid recovery and stability from Ginkgo biloba subjected to a simulated digestion process. *Food Chemistry* 86, 195–202.
- Goldberg, Y.P., Kremer, B., Andrew, S.E., Theilmann, J., Graham, R.K., Squitieri, F., Telenius, H.,

- Adam, S., Sajoo, A., and Starr, E. (1993). Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nat. Genet.* 5, 174–179.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463–471.
- Haas, A.L., Warmus, J.V., Hershko, A., and Rose, I.A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* 257, 2543–2548.
- 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.
- Halliwell, B. (2002). Hypothesis: Proteasomal Dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 962, 182–194.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585–621.
- HDCRG (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72, 971–983.
- He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93.
- Hersch, S.M., and Rosas, H.D. (2001). Neuroprotective therapy for Huntington's disease: new prospects and challenges. *Expert Rev Neurother* 1, 111–118.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The Ubiquitin System. *Annual Review of Biochemistry* 67, 425–479.
- Hershko, A., Heller, H., Eytan, E., and Reiss, Y. (1986). The protein substrate binding site of the ubiquitin-protein ligase system. *J. Biol. Chem.* 261, 11992–11999.
- Hipp, M.S., Patel, C.N., Bersuker, K., Riley, B.E., Kaiser, S.E., Shaler, T.A., Brandeis, M., and Kopito, R.R. (2012). Indirect inhibition of 26S proteasome activity in a cellular model of

Huntington's disease. *J Cell Biol* 196, 573–587.

Hodges, A., Strand, A.D., Aragaki, A.K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., Elliston, L.A., Hartog, C., Goldstein, D.R., Thu, D., et al. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Human Molecular Genetics* 15, 965–977.

Hoffner, G., Island, M., and Djian, P. (2005). Purification of neuronal inclusions of patients with Huntington's disease reveals a broad range of N-terminal fragments of expanded huntingtin and insoluble polymers. *Journal of Neurochemistry* 95, 125–136.

Imarisio, S., Carmichael, J., Korolchuk, V., Chen, C.-W., Saiki, S., Rose, C., Krishna, G., Davies, J.E., Ttofi, E., Underwood, B.R., et al. (2008). Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *Biochem. J.* 412, 191.

Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K., and Nukina, N. (2005). Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J. Biol. Chem.* 280, 11635–11640.

Jaracz, S., Nakanishi, K., Jensen, A.A., and Strømgaard, K. (2004). Ginkgolides and Glycine Receptors: A Structure–Activity Relationship Study. *Chemistry - A European Journal* 10, 1507–1518.

Jariel-Encontre, I., Bossis, G., and Piechaczyk, M. (2008). Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim. Biophys. Acta* 1786, 153–177.

Johnson, E.S., Bartel, B., Seufert, W., and Varshavsky, A. (1992). Ubiquitin as a degradation signal. *EMBO J* 11, 497–505.

Kaempfer, E., and Muntschick, W. (1712). Engelbert Kaempfer: *Flora Japonica* (1712) (Steiner).

Kapeta, S., Chondrogianni, N., and Gonos, E.S. (2010). Nuclear Erythroid Factor 2-mediated Proteasome Activation Delays Senescence in Human Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 285, 8171–8184.

Katunuma, N., and Kominami, E. (1985). Lysosomal sequestration of cytosolic enzymes and lysosomal thiol cathepsins. *Adv. Enzyme Regul.* 23, 159–168.

- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., and Glabe, C.G. (2003). Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science* 300, 486–489.
- Kaytor, M.D., Wilkinson, K.D., and Warren, S.T. (2004). Modulating huntingtin half-life alters polyglutamine-dependent aggregate formation and cell toxicity. *Journal of Neurochemistry* 89, 962–973.
- Kiewert, C., Kumar, V., Hildmann, O., Rueda, M., Hartmann, J., Naik, R.S., and Klein, J. (2007). Role of GABAergic antagonism in the neuroprotective effects of bilobalide. *Brain Research* 1128, 70–78.
- Kiewert, C., Kumar, V., Hildmann, O., Hartmann, J., Hillert, M., and Klein, J. (2008). Role of glycine receptors and glycine release for the neuroprotective activity of bilobalide. *Brain Research* 1201, 143–150.
- Kim, H., Park, B.-S., Lee, K.-G., Choi, C.Y., Jang, S.S., Kim, Y.-H., and Lee, S.-E. (2005). Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8537–8541.
- King, M.A., Hands, S., Hafiz, F., Mizushima, N., Tolkovsky, A.M., and Wytttenbach, A. (2008). Rapamycin Inhibits Polyglutamine Aggregation Independently of Autophagy by Reducing Protein Synthesis. *Mol Pharmacol* 73, 1052–1063.
- Kisselev, A.F., and Goldberg, A.L. (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology* 8, 739–758.
- Klionsky, D.J., Elazar, Z., Seglen, P.O., and Rubinsztein, D.C. (2008). Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* 4, 849–850.
- Koch, E. (2005). Inhibition of platelet activating factor (PAF)-induced aggregation of human thrombocytes by ginkgolides: considerations on possible bleeding complications after oral intake of Ginkgo biloba extracts. *Phytomedicine* 12, 10–16.
- Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2011). Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Research Reviews* 10, 205–215.

- Korolchuk, V.I., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2009a). A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy* 5, 862–863.
- Korolchuk, V.I., Mansilla, A., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2009b). Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates. *Mol Cell* 33, 517–527.
- Kourtis, N., and Tavernarakis, N. (2011). Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *EMBO J* 30, 2520–2531.
- Krauze-Baranowska, M., and Wiwart, M. (2003). Antifungal activity of biflavones from *Taxus baccata* and *Ginkgo biloba*. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 58, 65–69.
- Kremer, B., Goldberg, P., Andrew, S.E., Theilmann, J., Telenius, H., Zeisler, J., Squitieri, F., Lin, B., Bassett, A., and Almqvist, E. (1994). A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N. Engl. J. Med.* 330, 1401–1406.
- Krobitsch, S., and Kazantsev, A.G. (2011). Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 43, 20–24.
- Krobitsch, S., and Lindquist, S. (2000). Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 1589–1594.
- Kwak, M.-K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J.L., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. (2003). Antioxidants Enhance Mammalian Proteasome Expression through the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8786–8794.
- Lakhani, V.V., Ding, F., and Dokholyan, N.V. (2010). Polyglutamine Induced Misfolding of Huntingtin Exon1 is Modulated by the Flanking Sequences. *PLoS Comput Biol* 6, e1000772.
- Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., and Pickart, C.M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763–767.
- Lang, Q., and Wai, C.M. (2003). Pressurized water extraction (PWE) of terpene trilactones from *Ginkgo biloba* leaves. *Green Chemistry* 5, 415.
- Lanucara, F., Brownridge, P., Young, I.S., Whitfield, P.D., and Doherty, M.K. (2010). Degradative

proteomics and disease mechanisms. *PROTEOMICS – Clinical Applications* 4, 133–142.

Lasker, K., Förster, F., Bohn, S., Walzthoeni, T., Villa, E., Unverdorben, P., Beck, F., Aebersold, R., Sali, A., and Baumeister, W. (2012). Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1380–1387.

Lee, D.H., and Goldberg, A.L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8, 397–403.

Lee, C., Schwartz, M.P., Prakash, S., Iwakura, M., and Matouschek, A. (2001a). ATP-Dependent Proteases Degrade Their Substrates by Processively Unraveling Them from the Degradation Signal. *Molecular Cell* 7, 627–637.

Lee, J.-M., Moehlenkamp, J.D., Hanson, J.M., and Johnson, J.A. (2001b). Nrf2-Dependent Activation of the Antioxidant Responsive Element by tert-Butylhydroquinone Is Independent of Oxidative Stress in IMR-32 Human Neuroblastoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280, 286–292.

Li, J., Horak, K.M., Su, H., Sanbe, A., Robbins, J., and Wang, X. (2011). Enhancement of proteasomal function protects against cardiac proteinopathy and ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest* 121, 3689–3700.

Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.-C., and Kain, S.R. (1998). Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein as a Transcription Reporter. *Journal of Biological Chemistry* 273, 34970–34975.

Li, X., Li, H., and Li, X.-J. (2008). Intracellular degradation of misfolded proteins in polyglutamine neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews* 59, 245–252.

Li, X., Wang, C.-E., Huang, S., Xu, X., Li, X.-J., Li, H., and Li, S. (2010). Inhibiting the ubiquitin–proteasome system leads to preferential accumulation of toxic N-terminal mutant huntingtin fragments. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2445–2455.

Liggett, A., Crawford, L.J., Walker, B., Morris, T.C.M., and Irvine, A.E. (2010). Methods for measuring proteasome activity: current limitations and future developments. *Leuk. Res* 34, 1403–1409.

- Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795.
- Lindsten, K., and Dantuma, N.P. (2003). Monitoring the ubiquitin/proteasome system in conformational diseases. *Ageing Research Reviews* 2, 433–449.
- Liu, X.-P., Goldring, C.E.P., Copple, I.M., Wang, H.-Y., Wei, W., Kitteringham, N.R., and Park, B.K. (2007). Extract of Ginkgo biloba induces phase 2 genes through Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway. *Life Sciences* 80, 1586–1591.
- Longpré, F., Garneau, P., Christen, Y., and Ramassamy, C. (2006). Protection by EGb 761 against beta-amyloid-induced neurotoxicity: involvement of NF-kappaB, SIRT1, and MAPKs pathways and inhibition of amyloid fibril formation. *Free Radic. Biol. Med* 41, 1781–1794.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., and Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533–539.
- Lund, P.K., Moats-Staats, B.M., Simmons, J.G., Hoyt, E., D’Ercole, A.J., Martin, F., and Van Wyk, J.J. (1985). Nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding human ubiquitin reveals that ubiquitin is synthesized as a precursor. *J. Biol. Chem.* 260, 7609–7613.
- Luo, Y., and Smith, J.V. (2004). Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 465–472.
- Luo, Y., Smith, J.V., Paramasivam, V., Burdick, A., Curry, K.J., Buford, J.P., Khan, I., Netzer, W.J., Xu, H., and Butko, P. (2002). Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 12197–12202.
- MacDonald, M.E., Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Myers, R.H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes, G., Taylor, S.A., James, M., Groot, N., et al. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington’s disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983.
- Mahadevan, S., and Park, Y. (2008). Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: chemistry, efficacy, safety, and uses. *J. Food Sci* 73, R14–19.
- Mahady, G.B. (2002). Ginkgo Biloba for the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease:

- A Review of the Literature. [Miscellaneous Article]. *Journal of Cardiovascular Nursing* July 2002 *16*, 21–32.
- Maitra, I., Marcocci, L., Droy-Lefaix, M.T., and Packer, L. (1995). Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem. Pharmacol.* *49*, 1649–1655.
- Major, R.T., and Thomas, M. (1972). Formation of 2-hexenal from linolenic acid by macerated Ginkgo leaves. *Phytochemistry* *11*, 611–617.
- Marcocci, L., Maguire, J.J., Droy-Lefaix, M.T., and Packer, L. (1994). The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *201*, 748–755.
- Martín-Aparicio, E., Yamamoto, A., Hernández, F., Hen, R., Avila, J., and Lucas, J.J. (2001). Proteasomal-Dependent Aggregate Reversal and Absence of Cell Death in a Conditional Mouse Model of Huntington's Disease. *J. Neurosci.* *21*, 8772–8781.
- Mattson, M.P., and Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci* *7*, 278–294.
- Maxwell, M.M. (2009). RNAi applications in therapy development for neurodegenerative disease. *Curr. Pharm. Des.* *15*, 3977–3991.
- McKenna, D.J., Jones, K., and Hughes, K. (2001). Efficacy, safety, and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med* *7*, 70–86, 88–90.
- Menéndez-Benito, V., Heessen, S., and Dantuma, N.P. (2005). Monitoring of ubiquitin-dependent proteolysis with green fluorescent protein substrates. *Meth. Enzymol.* *399*, 490–511.
- Menzies, F.M., Hourez, R., Imarisio, S., Raspe, M., Sadiq, O., Chandraratna, D., O'Kane, C., Rock, K.L., Reits, E., Goldberg, A.L., et al. (2010). Puromycin-sensitive aminopeptidase protects against aggregation-prone proteins via autophagy. *Hum Mol Genet* *19*, 4573–4586.
- Michalik, A., and Van Broeckhoven, C. (2004). Proteasome degrades soluble expanded polyglutamine completely and efficiently. *Neurobiology of Disease* *16*, 202–211.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* *147*, 728–741.

- Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542–545.
- Mogk, A., Schmidt, R., and Bukau, B. (2007). The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol.* 17, 165–172.
- Moosmann, B., and Behl, C. (2002). Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 11, 1407–1435.
- Morley, J.F., Brignull, H.R., Weyers, J.J., and Morimoto, R.I. (2002). The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10417 – 10422.
- Muchowski, P.J. (2002). Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones? *Neuron* 35, 9–12.
- Myeku, N., and Figueiredo-Pereira, M.E. (2011). Dynamics of the Degradation of Ubiquitinated Proteins by Proteasomes and Autophagy ASSOCIATION WITH SEQUESTOSOME 1/p62. *J. Biol. Chem.* 286, 22426–22440.
- Myung, J., Kim, K.B., and Crews, C.M. (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev* 21, 245–273.
- Nagy, V., and Dikic, I. (2010). Ubiquitin ligase complexes: from substrate selectivity to conjugational specificity. *Biol. Chem.* 391, 163–169.
- Neurath, H. (1999). Proteolytic Enzymes, Past and Future. *PNAS* 96, 10962–10963.
- Van Nocker, S., and Vierstra, R.D. (1993). Multiubiquitin chains linked through lysine 48 are abundant in vivo and are competent intermediates in the ubiquitin proteolytic pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 24766–24773.
- Nucifora, F.C., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L., et al. (2001). Interference by Huntingtin and Atrophin-1 with CBP-Mediated Transcription Leading to Cellular Toxicity. *Science* 291, 2423 –2428.

- Palazzolo, I., Burnett, B.G., Young, J.E., Brenne, P.L., La Spada, A.R., Fischbeck, K.H., Howell, B.W., and Pennuto, M. (2007). Akt blocks ligand binding and protects against expanded polyglutamine androgen receptor toxicity. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 1593–1603.
- Park (2009). The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep* *22*.
- Park, Y., Hong, S., Kim, S.-J., and Kang, S. (2005). Proteasome function is inhibited by polyglutamine-expanded ataxin-1, the SCA1 gene product. *Mol. Cells* *19*, 23–30.
- Paul, S. (2008). Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. *Bioessays* *30*, 1172–1184.
- Paulson, H., Perez, M., Trottier, Y., Trojanowski, J., Subramony, S., Das, S., Vig, P., Mandel, J.-L., Fischbeck, K., and Pittman, R. (1997). Intranuclear Inclusions of Expanded Polyglutamine Protein in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuron* *19*, 333–344.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.* *30*, e36–e36.
- Pietri, S., Maurelli, E., Drieu, K., and Culcasi, M. (1997). Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *J. Mol. Cell. Cardiol.* *29*, 733–742.
- Poirier, M.A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M., and Ross, C.A. (2002). Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J. Biol. Chem.* *277*, 41032–41037.
- Poon, L.H., Kang, G.A., and Lee, A.J. (2010). Role of tetrabenazine for Huntington's disease-associated chorea. *Ann Pharmacother* *44*, 1080–1089.
- Pratt, G., and Rechsteiner, M. (2008). Proteasomes Cleave at Multiple Sites within Polyglutamine Tracts ACTIVATION BY PA28 γ (K188E). *J. Biol. Chem.* *283*, 12919–12925.
- Pratt, W.B., Morishima, Y., Peng, H.-M., and Osawa, Y. (2010). Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo

oxidative and toxic damage. *Experimental Biology and Medicine* 235, 278–289.

Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol* 545, 51–64.

Ramassamy, C., Longpré, F., and Christen, Y. (2007). Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: is there any evidence? *Curr Alzheimer Res* 4, 253–262.

Rhein, V., Giese, M., Baysang, G., Meier, F., Rao, S., Schulz, K.L., Hamburger, M., and Eckert, A. (2010). Ginkgo Biloba Extract Ameliorates Oxidative Phosphorylation Performance and Rescues A β -Induced Failure. *PLoS ONE* 5, e12359.

Rivett, A.J. (1989). The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J. Biol. Chem.* 264, 12215–12219.

Rosas, H.D., Salat, D.H., Lee, S.Y., Zaleta, A.K., Hevelone, N., and Hersch, S.M. (2008). Complexity and heterogeneity: what drives the ever-changing brain in Huntington's disease? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 196–205.

Rosenzweig, R., Osmulski, P.A., Gaczynska, M., and Glickman, M.H. (2008). The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 573–580.

Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. , Published Online: 01 July 2004; | Doi:10.1038/nm1066 10, S10–S17.

Ross, C.A., and Tabrizi, S.J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 10, 83–98.

Roth, D.M., and Balch, W.E. (2011). Modeling general proteostasis: proteome balance in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology* 23, 126–134.

Rubinsztein, D.C., Cuervo, A.M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V.I., Kaushik, S., and Klionsky, D.J. (2009). In search of an “autophagometer.” *Autophagy* 5, 585–590.

Saeki, Y., Sone, T., Toh-e, A., and Yokosawa, H. (2002). Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 813–819.

- Saleem, S., Zhuang, H., Biswal, S., Christen, Y., and Doré, S. (2008). Ginkgo Biloba Extract Neuroprotective Action Is Dependent on Heme Oxygenase 1 in Ischemic Reperfusion Brain Injury. *Stroke* 39, 3389–3396.
- Sanchez, I., Mahlke, C., and Yuan, J. (2003). Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421, 373–379.
- Satyral, S.H., Schmidt, E., Kitagawa, K., Sondheimer, N., Lindquist, S., Kramer, J.M., and Morimoto, R.I. (2000). Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 5750–5755.
- Saunders, H.M., Gilis, D., Rooman, M., Dehouck, Y., Robertson, A.L., and Bottomley, S.P. (2011). Flanking domain stability modulates the aggregation kinetics of a polyglutamine disease protein. *Protein Science* 20, 1675–1681.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (1997). Huntingtin-Encoded Polyglutamine Expansions Form Amyloid-like Protein Aggregates In Vitro and In Vivo. *Cell* 90, 549–558.
- Seo, H., Sonntag, K.-C., Kim, W., Cattaneo, E., and Isacson, O. (2007). Proteasome Activator Enhances Survival of Huntington's Disease Neuronal Model Cells. *PLoS ONE* 2, e238.
- Shao, J., and Diamond, M.I. (2007). Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum. Mol. Genet. 16 Spec No. 2*, R115–123.
- Sharon, M., Taverner, T., Ambroggio, X.I., Deshaies, R.J., and Robinson, C.V. (2006). Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol.* 4, e267.
- Smith, J.V., and Luo, Y. (2004). Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 465–472.
- Sorokin, A.V., Kim, E.R., and Ovchinnikov, L.P. (2009). Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry Mosc* 74, 1411–1442.
- Sou, Y., Tanida, I., Komatsu, M., Ueno, T., and Kominami, E. (2006). Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3,

GABARAP, and GATE-16. *J. Biol. Chem.* *281*, 3017–3024.

Stack, E.C., Matson, W.R., and Ferrante, R.J. (2008). Evidence of Oxidant Damage in Huntington's Disease: Translational Strategies Using Antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1147*, 79–92.

Stadtmueller, B.M., and Hill, C.P. (2011). Proteasome activators. *Mol. Cell* *41*, 8–19.

Stafford, H.A., Kreitlow, K.S., and Lester, H.H. (1986). Comparison of Proanthocyanidins and Related Compounds in Leaves and Leaf-Derived Cell Cultures of *Ginkgo Bioloba* L., *Pseudotsuga Menziesii* Franco, and *Ribes Sanguineum* Pursh. *Plant Physiol.* *82*, 1132–1138.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 6763–6768.

Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y.-Z., Cattaneo, E., et al. (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* *304*, 100–104.

Strømgaard, K., and Nakanishi, K. (2004). Chemistry and Biology of Terpene Trilactones from *Ginkgo Biloba*. *Angewandte Chemie International Edition* *43*, 1640–1658.

Subramaniam, S., Sixt, K.M., Barrow, R., and Snyder, S.H. (2009). Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science* *324*, 1327–1330.

Takahashi, T., Kikuchi, S., Katada, S., Nagai, Y., Nishizawa, M., and Onodera, O. (2008). Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Human Molecular Genetics* *17*, 345–356.

Takahashi, T., Katada, S., and Onodera, O. (2010). Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J Mol Cell Biol* *2*, 180–191.

Tang, T.-S., Slow, E., Lupu, V., Stavrovskaya, I.G., Sugimori, M., Llinás, R., Kristal, B.S., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2005). Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny

- neurons in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 2602–2607.
- Tanigawa, S., Fujii, M., and Hou, D.-X. (2007). Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radical Biology and Medicine* *42*, 1690–1703.
- Terashima, T., Kawai, H., Fujitani, M., Maeda, K., and Yasuda, H. (2002). SUMO-1 co-localized with mutant atrophin-1 with expanded polyglutamines accelerates intranuclear aggregation and cell death. *Neuroreport* *13*, 2359–2364.
- Theodoraki, M.A., and Caplan, A.J. (2012). Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1823*, 683–688.
- Truant, R., Atwal, R.S., Desmond, C., Munsie, L., and Tran, T. (2008). Huntington's disease: revisiting the aggregation hypothesis in polyglutamine neurodegenerative diseases. *FEBS Journal* *275*, 4252–4262.
- Ueno, T., and Takahashi, K. (2009). A cathepsin L-specific inhibitor preferentially inhibits degradation of autophagosomal LC3 and GABARAP in HeLa and Huh-7 cells. *Autophagy* *5*, 878–879.
- Uversky, V.N. (2003). Protein folding revisited. A polypeptide chain at the folding – misfolding – nonfolding cross-roads: which way to go? *Cellular and Molecular Life Sciences* *60*, 1852–1871.
- Vellas, B., Coley, N., Ousset, P.-J., Berrut, G., Dartigues, J.-F., Dubois, B., Grandjean, H., Pasquier, F., Piette, F., Robert, P., et al. (2012). Long-term use of standardised ginkgo biloba extract for the prevention of Alzheimer's disease (GuidAge): a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* *11*, 851–859.
- Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N., and Goldberg, A.L. (2004). Eukaryotic Proteasomes Cannot Digest Polyglutamine Sequences and Release Them during Degradation of Polyglutamine-Containing Proteins. *Molecular Cell* *14*, 95–104.
- Verhoef, L.G.G.C., Lindsten, K., Masucci, M.G., and Dantuma, N.P. (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2689–2700.
- Vichai, V., and Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity

screening. *Nat. Protocols* 1, 1112–1116.

Vilchez, D., Boyer, L., Morantte, I., Lutz, M., Merkwirth, C., Joyce, D., Spencer, B., Page, L., Masliah, E., Berggren, W.T., et al. (2012). Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11. *Nature* 489, 304–308.

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid [beta] protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.

WANG, F., JIANG, K., and LI, Z. (2007). Purification and Identification of Genistein in Ginkgo biloba Leaf Extract. *Chinese Journal of Chromatography* 25, 509–513.

Weissman, A.M., Shabek, N., and Ciechanover, A. (2011). The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 605–620.

Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Gutekunst, C.-A., Rogers, D., Warby, S., Graham, R.K., Loubser, O., Van Raamsdonk, J., Singaraja, R., Yang, Y.-Z., et al. (2002). Caspase Cleavage of Mutant Huntingtin Precedes Neurodegeneration in Huntington's Disease. *J. Neurosci.* 22, 7862–7872.

Wetzel, R. (2012). Physical Chemistry of Polyglutamine: Intriguing Tales of a Monotonous Sequence. *Journal of Molecular Biology* 421, 466–490.

Witan, H., Kern, A., Koziollek-Drechsler, I., Wade, R., Behl, C., and Clement, A.M. (2008). Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation. *Human Molecular Genetics* 17, 1373–1385.

Wolf, D.H., and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1695, 19–31.

Wu, Y., Wu, Z., Butko, P., Christen, Y., Lambert, M.P., Klein, W.L., Link, C.D., and Luo, Y. (2006). Amyloid- β -Induced Pathological Behaviors Are Suppressed by Ginkgo biloba Extract EGb 761 and Ginkgolides in Transgenic *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience* 26, 13102–13113.

- Wurtman, R.J. (2011). Non-nutritional uses of nutrients. *European Journal of Pharmacology* 668, *Supplement 1*, S10–S15.
- Wytenbach, A., Sauvageot, O., Carmichael, J., Diaz-Latoud, C., Arrigo, A.-P., and Rubinsztein, D.C. (2002). Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Human Molecular Genetics* 11, 1137 – 1151.
- Yamada, M., Tsuji, S., and Takahashi, H. (2000). Pathology of CAG repeat diseases. *Neuropathology* 20, 319–325.
- 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, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 124–131.
- Yao, Z., Drieu, K., and Papadopoulos, V. (2001). The Ginkgo biloba extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from beta-amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of beta-amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands. *Brain Res* 889, 181–190.
- Yuan, L. (2006). Alzheimer's disease, the nematode *Caenorhabditis elegans*, and ginkgo biloba leaf extract. *Life Sciences* 78, 2066–2072.
- Zeron, M.M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C.L., Leavitt, B.R., Brundin, P., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. (2002). Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33, 849–860.
- Zhang, X., Smith, D.L., Meriin, A.B., Engemann, S., Russel, D.E., Roark, M., Washington, S.L., Maxwell, M.M., Marsh, J.L., Thompson, L.M., et al. (2005). A potent small molecule inhibits polyglutamine aggregation in Huntington's disease neurons and suppresses neurodegeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 892–897.
- Zhuang, H., Pin, S., Christen, Y., and Doré, S. (2002). Induction of heme oxygenase 1 by Ginkgo biloba in neuronal cultures and potential implications in ischemia. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 48, 647–653.

Zwickl, P., Seemüller, E., Kapelari, B., and Baumeister, W. (2001). The proteasome: a supramolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Adv. Protein Chem.* 59, 187–222.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer-Krankheit (engl. Alzheimer's disease)
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	7-Amino-4-Methylcourmarin
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	Antioxidant/Electrophilic Response Element
ATP	Adenosintriphosphat
A β	beta-Amyloidpeptid
BCA	Bicinchoninsäure (engl. Bicinchoninic acid)
bidest.	bidestilliertes
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ca	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumdichlorid
cDNA	Komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie (engl. Chaperone mediated autophagy)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Schwellenwertzyklus
Cu	Kupfer
CuSO ₄	Kupfersulfid
d.h.	das heißt
d2GFP	destabilisiertes GFP-Protein
d3	Adultstadium nach 3 Tagen
Da	Dalton

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtrisulphat
dPBS	Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline
E. coli	Escherichia coli
EC ₅₀ -Wert	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und weitere (lat. et alia)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FBS	fötale Kälberserum
Fe	Eisen
g	Normfallbeschleunigung (Erdbeschleunigung)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl. Green fluorescent protein)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HD	Huntington-Krankheit (engl. Huntington's disease)
HEK293	klonale Zelllinien (engl. Human Embryonic Kidney)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. Horse-Radish-Peroxidase)
HSP	Hitzeschock-Protein (engl. Heat shock protein)
Htt	Huntingtin-Protein
htt_Q103	polyQ-Fusionsprotein mit 103 Glutaminen

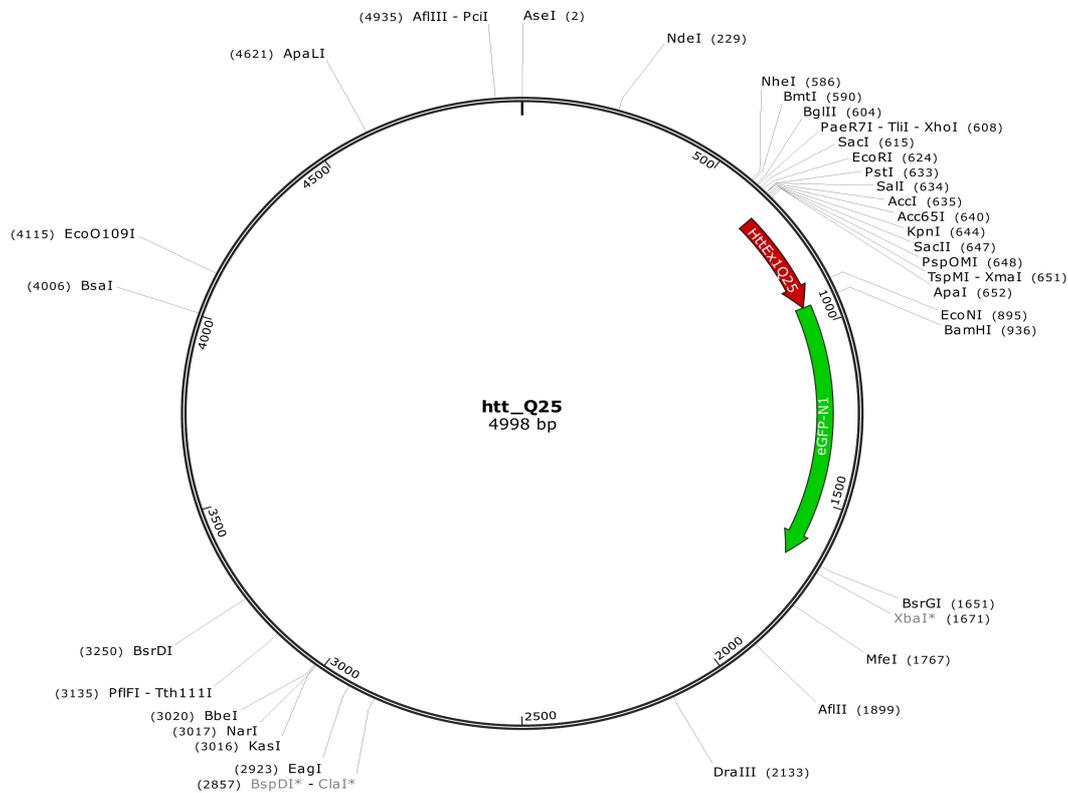
htt_Q25	polyQ-Fusionsprotein mit 25 Glutaminen
htt_Q46	polyQ-Fusionsprotein mit 46 Glutaminen
htt_QX	Htt-Protein (Exon 1) mit X-Glutamin-Wiederholungen
Hz	Hertz
IMR-90	primäre humane Fibroblasten
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
LB-Medium	Luria Broth–Bakteriennährmedium
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 protein
M	Molar
M9	Phosphatpuffer der Nematodenkultivierung
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mHtt	mutantes Form des Huntingtin-Proteins
min.	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MnCl ₂	Mangandichlorid
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGM	Nematode Growth Medium

NH ₃	Ammoniak
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffoxid
NRF2	Nuclear-factor-erythroid-derived-like 2 protein
O ₂	Molekularer Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBS-T	PBS versetzt Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Parkinson-Krankheit (engl. Parkinson's disease)
PD	Populationsverdopplungen
PEST	Prolin (P), Glutaminsäure(E), Serin(S), Threonin(T)
PFA	Paraformaldehyd
pH	Wasserstoffionenexponenten (Potentia Hydrogenii)
polyQ	Polyglutamin-Protein
PolyUB	Polyubiquitin-Protein
ppm	Teile von einer Million (engl. parts per million)
PQC	Proteinqualitätskontrolle
Q	Aminosäure Glutamin
qRT-PCR	Quantitative-Real-Time-Reverse-Transkriptions-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions PCR
S.O.C.	Super Optimal Broth
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-PAGE

SDS-unlöslich	SDS-resistent
sec	Sekunde
sog.	sogenannte
SRB	Sulforhodamin B
SUC-AMC	Suc-LLVY-AMC
Suc-LLVY	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
VitE	α -Tocopherol
w/v	Gewicht pro Volumen
x	mehrfache
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

7.2 Vektorkarten und Sequenzen

Vektorkarte von *htt_Q25* (HttEx1Q25-peGFP-N1):



Sequenz von *htt_Q25* (HttEx1Q25-peGFP-N1):

```

1  attaatagta atcaattac gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgтта
61  cataacttac ggtaaattgc cgcctggct gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt
121 caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg
181 tggagtatth acggtaaact gccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta
241 cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaht ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga
301 ccttatggga ctttctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg
361 tgatgagggt ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc
421 caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcaccaaahat caacgggact
481 ttcaaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggт
541 gggaggтcta tataagcaga gctggtttag tgaaccgtca gatccgctag cgctaccgga
601 ctcagatctc gagctcaagc ttcgaattct gcagtcgacg gtaccgcggg cccgggatca
661 tggcgaccct ggaaaagctg atgaaggcct tcgagtcctt caaaagcttc caacagcagc
721 aacagcaaca acagcagcaa cagcaacaac agcagcaaca gcaacaacag cagcaacagc
781 aacaaccgcc accacctccc cctccacccc cacctcctca acttctctcaa cctcctccac
841 aggcacagcc tctgctgcct cagccacaac ctctccacc tccacctcca cctcctccag
901 gccagctgt ggctgaggag cctctgcacc gacctggatc cctgggtgagc aagggcgagg
961 agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca
1021 agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg accctgaagt
1081 tcattctcac caccggcaag ctgcccgтgc cctggcccac cctcgtgacc accctgacct
1141 acggcgтgca gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt
1201 ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact

```

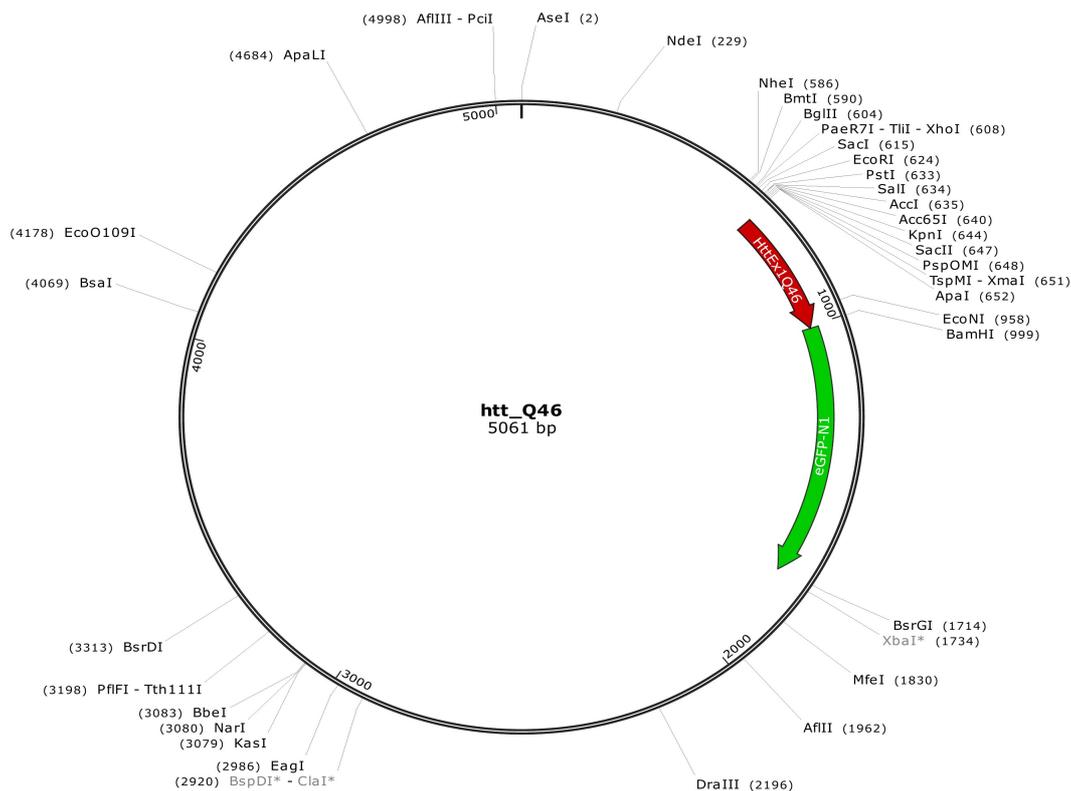
1261 acaagaccgc cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga
1321 agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca
1381 acagccacaa cgtctatatac atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca
1441 agatccgcca caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca
1501 cccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc acccagtcgg
1561 ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg
1621 ccgcccgggat cactctcggc atggacgagc tgtacaagta aggccgagc tctagatcat
1681 aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc
1741 cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta ttgcagctta
1801 taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact
1861 gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct taaggcgtaa attgtaagcg
1921 ttaatatattt gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaata cagctcattt tttaaccaat
1981 aggccgaaat cggcaaaatc ccttataaat caaagaata gaccgagata gggttgagtg
2041 ttgttccagt ttggaacaag agtccactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc
2101 gaaaaaccgt ctatcagggc gatggcccac tacgtgaacc atcacccata tcaagttttt
2161 tggggtcgag gtgccgtaaa gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag
2221 cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg
2281 gcgctagggc gctggcaagt gtagcgggtca cgctgcgcgt aaccaccaca cccgccgagc
2341 ttaatgcgcc gctacagggc gcgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacct
2401 ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataacctt
2461 gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtcctga ggcggaagaa accagctgtg
2521 gaatgtgtgt cagttagggt gtggaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatga
2581 aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaag tccccaggct cccagcagg
2641 cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc
2701 gccatcccc cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg gctgactaat
2761 tttttttatt tatgcaagg ccgaggccgc ctccgctct tcaagattca agaagtatg
2821 aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaagatcga tcaagagaca ggtagaggat
2881 cgtttcgcat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga
2941 ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc
3001 ggctgtcagc gcaggggagc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgcccctga
3061 atgaactgca agacgaggca gcgaggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgag
3121 cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc
3181 cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgcccga gaaagtatcc atcatggctg
3241 atgcaatgca gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga
3301 aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggagccgg tcttgtcgat caggatgatc
3361 tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgagca
3421 tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg
3481 tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct
3541 atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg
3601 accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc
3661 gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg accaagcgac
3721 gcccaacctg ccatcacgag atttcgattc caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt
3781 cggaatcgtt ttccgggagc ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga
3841 gttcttcgcc caccctaggg ggaggctaac tgaaacacgg aaggagacaa taccggaagg
3901 aaccgagcgt atgacggcaa taaaagaca gaataaacg cacggtgttg ggtcgtttgt
3961 tcataaacgc ggggttcggt cccagggctg gcaactctgc gataccccac cgagacccca
4021 ttggggccaa tacgcccgcg tttcttctt tttcccacc cccccccaa gttcgggtga
4081 aggccaggg ctgcagcca acgtcggggc ggcaggccct gccatagcct caggttactc
4141 atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat
4201 cttttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgctcc actgagcgtc
4261 agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg
4321 ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggt tgtttgcccg atcaagagct
4381 accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct
4441 tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct
4501 cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg
4561 gttgactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cggggggttc
4621 gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga

```

4681 gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcgg
4741 cagggtcgga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggatatttta
4801 tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg
4861 ggggcgagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg
4921 ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat
4981 taccgcatg cattagtt

```

Vektorkarte von *htt_Q46* (HttEx1Q46-peGFP-N1):



Sequenz von *httQ46* (HttEx1_Q46-peGFP-N1):

```

1  attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagcc atatatggag ttccgcgtta
61  cataacttac ggtaaattgc cgcctggct gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt
121 caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg
181 tggagtattt acggtaaact gccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta
241 cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga
301 ctttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg
361 tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc
421 caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacaaaat caacgggact
481 ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggg
541 gggaggctta tataagcaga gctggtttag tgaaccgtca gatccgctag cgctaccgga
601 ctcagatctc gagctcaagc ttcgaattct gcagtcgacg gtaccgcggg cccgggatca
661 tggcgaccct ggaaaagctg atgaaggcct tcgagtcctt caaaagcttc caacagcagc
721 aacagcaaca acagcagcaa cagcaacaac agcagcaaca gcaacaacag cagcaacagc
781 agcaacagca acaacagcag caacagcaac aacagcagca acagcaacaa cagcagcaac
841 agcaacaacc gccaccacct cccctccac cccacctcc tcaacttctt caacctcctc
901 cacaggcaca gcctctgctg cctcagccac aacctcctc acctccacct ccacctcctc
961 caggcccagc tgtggctgag gagcctctgc accgacctgg atccctgggt agcaagggcg

```

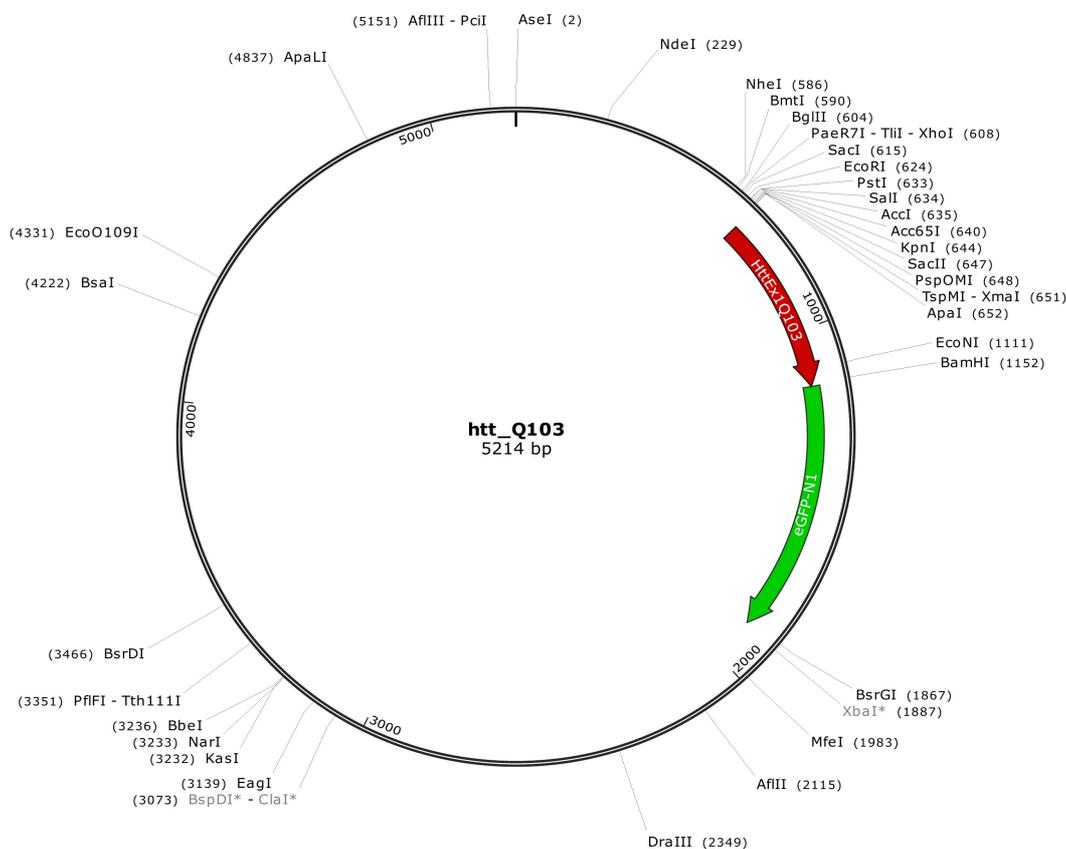
1021 aggagctggt caccggggtg gtgccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaaccggcc
1081 acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga
1141 agttcatctg caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctga
1201 cctacggcgt gcagtgttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca
1261 agtccgcat gcccgaggc tacgtccagg agcgcacat cttcttcaag gacgacggca
1321 actacaagac ccgcccggag gtgaagttcg agggcgacac cctgggtaac cgcacgagc
1381 tgaaggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gactacaact
1441 acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aagggtgaact
1501 tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cggcaccac taccagcaga
1561 acacccccat cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agcaccctga
1621 ccgcccctgag caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga
1681 ccgcccggg gatcactctc ggcatggagc agctgtacaa gtaaggccgc gactctagat
1741 cataatcagc cataccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct
1801 ccccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt ttattgcagc
1861 ttataatggt tacaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag ctttttttc
1921 actgattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttaaggcg taaattgtaa
1981 gcgttaatat tttgttaaaa ttcgctgtaa atttttgtta aatcagctca ttttttaacc
2041 aataggccga aatcggcaaa atcccctata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga
2101 gtgttgttcc agtttggaa acgagtcac tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaa
2161 ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcacc taatcaagtt
2221 ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaacc taaagggagc ccccgattta
2281 gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag
2341 cggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc acaccgccc
2401 cgcttaatgc gccgctacag ggcgctcag gtggcacttt tcggggaat gtgcccggaa
2461 cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac
2521 cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtcc tgaggcgaa agaaccagct
2581 gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtgaaa gtcaccaggc tcccagcag gcagaagat
2641 gcaaagcatg catctcaatt agtcgcaac caggtgtgga aagtcaccag gctcccagc
2701 aggcagaagt atgcaaagca tgcactcaa tttagtcagca accatagtcc cgcccctaac
2761 tccgcccac ccccccctaa ctccgcccag tccgcccac tctccgcccc atggctgact
2821 aatttttttt atttatgacg aggcccaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta
2881 gtgaggaggc tttttggag gcctaggctt ttgcaaagat cgatcaagag acaggatgag
2941 gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg
3001 agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgcccgtg
3061 tccggtgtc agcgcagggg cggccggttc tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgcc
3121 tgaatgaact gcaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttctt
3181 gcgagctgt gctcagctt gtcactgaag cgggaagggg ctggctgcta ttgggcgaag
3241 tgccggggca ggatctcctg tcactcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg
3301 ctgatgcaat gcggcggctg catacgttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag
3361 cgaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg
3421 atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcggcagg ctcaaggcga
3481 gatgcccga cggcgaggat ctgctcgtga cccatggcga tgctgcttg ccgaatatca
3541 tgggtgaaaa tggccgctt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc
3601 gctatcagga catagcgtt gctaccctg atattgctga agagcttggc ggcgaatggg
3661 ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttcgagcgc atcgcttct
3721 atcgcttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc
3781 gacgccaac ctgccatcac gagatttcca ttccaccgcc gccttctatg aaagggtggg
3841 cttcggaatc gttttccggg acgcccgtg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct
3901 ggagttcttc gccacccta gggggaggct aactgaaaca cggaggaga caataccgga
3961 aggaaccgc gctatgacgg caataaaaag acagaataaa acgcaggtg ttgggtcgtt
4021 tgttcataaa cgcggggttc ggtcccagg ctggcactct gtcgataccc caccgagacc
4081 ccattggggc caatacggcc gcgtttcttc cttttcccca cccacccc caagttcggg
4141 tgaagccca gggctcgcag ccaacgtcgg ggcggcaggc cctgcatag cctcaggtta
4201 ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctagggtga
4261 gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc
4321 gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgccgtaat
4381 ctgctgcttg caaacaaaa aaccaccgt accagcgggt gttgttttc cggatcaaga

```

4441 gctaccaact cttttccga aggtaactgg cttcagcaga ggcgagatac caaatactgt
4501 ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata
4561 cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac
4621 cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg
4681 ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacacgg
4741 tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag ggggacaggt atccggtaag
4801 cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct
4861 ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc
4921 aggggggagg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggg tctctgcctt
4981 ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg
5041 tattaccgcc atgcattagt t

```

Vektorkarte von *httQ103* (HttEx1_Q103-peGFP-N1):



Sequenz von *httQ103* (HttEx1_Q103-peGFP-N1):

```

1  attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta
61  cataacttac ggtaaattgc cgcctggct gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt
121 caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg
181 tggagtattt acggtaaact gccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta
241 cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga
301 ccttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg
361 tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc
421 caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacccaaat caacggggact

```

481 ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt
541 gggagggtcta tataagcaga gctggtttag tgaaccgtca gatccgctag cgctaccgga
601 ctcatgatctc gagctcaagc ttcgaattct gcagtcgacg gtaccgcggg cccgggatca
661 tggcgaccct ggaaaagctg atgaaggcct tcgagtcctt caaaagcttc caacagcagc
721 aacagcaaca acagcagcaa cagcaacaac agcagcaaca gcaacaacag cagcaacagc
781 aacaacagca gcaacagcaa caacagcagc aacagcaaca acagcagcaa cagcaacaac
841 agcagcaaca gcaacaacag cagcaacagc aacaacagca gcaacagcaa caacagcagc
901 aacagcaaca acagcagcaa cagcaacaac agcagcaaca gcaacaacag cagcaacagc
961 aacaacagca gcaacagcaa caacagcagc aacagcaaca accgccacca cctccccctc
1021 cccccacc tcctcaactt cctcaacctc ctccacagggc acagcctctg ctgcctcagc
1081 cacaacctcc tccacctcca cctccacctc ctccaggccc agctgtggct gaggagcctc
1141 tgcaccgacc tggatccctg gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgcca
1201 tcctggtcga gctggacggc gacgtaaagc gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgaggcg
1261 agggcgatgc cacctacggc aagctgacc tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc
1321 ccgtgccctg gccaccctc gtgaccacc tgacctacgg cgtgcagtgc ttcagccgct
1381 accccgacca catgaagcag cacgacttct tcaagtccgc catgcccga ggtacgtcc
1441 aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactacaa gaccgcgcc gagggtgaagt
1501 tcgagggcga caccctggtg aaccgcatcg agctgaagg catcgacttc aaggaggacg
1561 gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg
1621 ccgacaagca gaagaacggc atcaagggtg acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg
1681 gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc
1741 tgctgcccga caaccactac ctgagcacc agtccgccct gagcaaagac cccaacgaga
1801 agcgcgatca catggtcctg ctggagtctg tgaccgccg cgggatcact ctcgcatgg
1861 acgagctgta caagtaaggc cgcgactcta gatcataatc agccatacca cattttaga
1921 ggttttactt gtttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa
1981 tgcaattgtt gttgtaact tgtttattgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag
2041 catcacaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagtgtg tttgtccaa
2101 actcatcaat gtatcttaag gcgtaaattg taagcgtaa tattttgta aaatcgcg
2161 taaatTTTTg ttaaatcagc tcatttttta accaataggc cgaatcggc aaaatccctt
2221 ataatcaaa agaatagacc gagatagggt tgagtgtgtg tccagtttg aacaagagtc
2281 cactatataa gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat caggcgatg
2341 gccactacg tgaacatca ccctaataca gttttttggg gtcgagggtc cgtaaagcac
2401 taaatcgga ccctaaagg agccccgat ttagagcttg acgggaaag ccggcgaacg
2461 tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaag gagcgggagc tagggcgctg gcaagtgtag
2521 cggtcacgct gcgcgtaacc accacacccg ccgcgcttaa tgcgccgcta caggcgctg
2581 cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgag gaaccctat ttgtttattt ttctaaatac
2641 attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa
2701 aaaggaagag tcctgaggcg gaaagaacca gctgtggaat gtgtgtcagt tagggtgtg
2761 aaagtccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc
2821 aaccaggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaa gcatgcatct
2881 caattagtca gcaaccatag tcccgccct aactccgcc atcccgcc taactccgcc
2941 cagttccgc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga
3001 ggccgctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggctttttg gaggcctagg
3061 ctttgcaaa gatcgatcaa gagacaggat gaggatcggt tcgcatgatt gaacaagatg
3121 gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac
3181 aacagacaat cggctgctct gatgccgagc tgttccggct gtcagcgag ggcgcccgg
3241 ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaagac gaggcagcg
3301 ggctatcgtg gctggccacg acgggcttc cttgcgagc tgtgctcgac gttgtcactg
3361 aagcgggaag ggactggctg ctattggcg aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc
3421 acctgtctc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcg ctgcatacgc
3481 ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta
3541 ctggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg
3601 gccagccga actgttcgcc aggtcaagg cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg
3661 tgacctatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aatggccgc ttttctggat
3721 tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcg accgctatca ggacatagc ttggctacc
3781 gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgacc cttcctcgtg ctttacgga
3841 tcgccgctcc cgattcgcag cgcacgcct tctatgcct tcttgacgag tcttctgag

3901 cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgacgccc aacctgccat cacgagattt
3961 cgattccacc gccgccttct atgaaagggt gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg
4021 ctggatgac ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttcgcccacc ctagggggag
4081 gctaactgaa acacggaagg agacaatacc ggaaggaacc cgcgctatga cggcaataaa
4141 aagacagaat aaaacgcacg gtgttgggtc gtttgttcat aaacgcgggg ttcggtccca
4201 gggctggcac tctgtcgata cccaccgag accccattgg ggccaatacg cccgcgtttc
4261 ttccttttcc ccaccccacc ccccaagttc ggggtgaaggc ccagggctcg cagccaacgt
4321 cggggcggca ggccctgcca tagcctcagg ttactcatat atactttaga ttgatttaaa
4381 acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa
4441 aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg
4501 atcttcttga gatccttttt ttctgcgctg aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc
4561 gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac
4621 tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgccttctta gtgtagccgt agttaggcca
4681 ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatac tgettaccagt
4741 ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc
4801 ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg
4861 aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc
4921 cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac
4981 gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct
5041 ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc
5101 cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg cttttgctc acatgttctt
5161 tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gccatgcatt agtt

7.3 Publikationen

7.4 Curriculum Vitae

7.5 Eidesstattliche Erklärung

7.6 Danksagung

Anmerkung zur statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mehrfach durchgeführt und die Anzahl der Versuche in den Abbildungslegenden als „n=Anzahl“ angegeben. Die resultierenden Mittelwerte der Messungen und die Standardfehler sind in den Graphen dargestellt.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte für normalverteilte Werte durch Anwendung des t-Signifikanztest (Student's t-test) unter Verwendung der Software SigmaStat (Systat Software Inc.). Unterschiede zwischen den Messwerten wurden als signifikant betrachtet für p-Werte $<0,05$ und in den Abbildungen mit *: $p < 0.05$, sowie **: $p < 0.01$ gekennzeichnet.