

Aus der Abteilung für Humangenetik  
der Ruhr-Universität Bochum  
Direktor: Prof. Dr. med. Jörg T. Epplen

# **Molekulargenetische Untersuchungen zum genetischen Hintergrund bei Morbus Huntington**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
einer  
Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von  
Sandra Valentin  
aus Bochum  
2004



## **Abstract**

Valentin

Sandra

### **Molekulargenetische Untersuchungen zum genetischen Hintergrund bei Morbus Huntington (MH)**

**Problem:** MH ist eine autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, die durch eine Mutation im *Huntingtin*-Gen auf Chromosom 4 bedingt ist und letal verläuft. Der genetische Defekt beruht auf einer pathologischen Verlängerung einer variablen Anzahl eines CAG-Basentriplets. Das Ausmaß der Verlängerung korreliert negativ mit dem Alter bei Krankheitsbeginn. Da Individuen mit gleicher Wiederholungslänge jedoch signifikante Unterschiede im Manifestationsalter aufweisen können, müssen noch andere Faktoren, wie z.B. modifizierende Gene, einen bedeutenden Einfluss haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polymorphismen in Genen untersucht, welche in der Exzitotoxizitätstheorie eine besondere Rolle spielen und einen modifizierenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben könnten.

**Methode:** Die Einzeltypisierung der Polymorphismen erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), Restriktions-Fragmentlängen-Analyse (RFLP) bzw. Fragmentlängenanalyse mit einem Kapillarsequenziergerät, denaturierenden Mikrosatellittengelen sowie nativen Polyacrylamidgelen.

**Ergebnis:** Bei der Mehrzahl der untersuchten Polymorphismen konnten keine Zusammenhänge zwischen Genotyp und Erkrankungsalter gefunden werden. Dagegen zeigten der 1298 A>C MTHFR-Polymorphismus und der 2664 C>T-Polymorphismus in der GRIN2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors Assoziationen mit einem frühem Erkrankungsbeginn bei Vorliegen des selteneren Allels.

**Diskussion:** Es konnten zwei mögliche modifizierende Gene identifiziert werden, die verantwortlich für ein früheres Manifestationsalter bei MH sein könnten. Da die Anzahl der betroffenen Patienten, die jeweils homozygot für das seltenere Allel sind, jedoch zahlenmäßig relativ klein war, empfiehlt sich eine Ausweitung der Studie auf ein größeres Patientenkollektiv, um die gewonnenen Ergebnisse abzusichern.



Dekan:	Prof. Dr. G. Muhr
Erstgutachter:	Prof. Dr. J.T. Epplen
Zweitgutachter:	Prof. Dr. H. Przuntek
Tag der mündlichen Prüfung:	25.1.2005



**Für meine Eltern und Heiko**

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.0 Allgemeine Einführung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Historie</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Epidemiologie</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Klinik</b>	<b>4</b>
1.3.1 Bewegungsstörungen	4
1.3.2 Kognitive Störungen	5
1.3.3 Psychiatrische Störungen	5
1.3.4 Westphal-Variante	6
<b>1.4 Erkrankungsalter und –dauer</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Diagnostik &amp; genetische Beratung</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Therapieansätze</b>	<b>7</b>
<b>1.7 Genetik</b>	<b>7</b>
1.7.1 Das <i>Huntingtin (Htt)</i> -Gen	10
1.7.1.1 Polymorphismen in <i>Huntingtin</i> -Gen	10
1.7.1.1.1 CCG-Repeat	10
1.7.1.1.2 $\Delta$ 2642 Deletion	11
1.7.1.1.3 Promotor	11
<b>1.8 Das Protein Huntingtin (Htt)</b>	<b>12</b>
1.8.1 Charakteristika bzw. normale Funktion des Wildtyp-Htt	12
1.8.2 Veränderte Eigenschaften des mutierten Htt	13
<b>1.9 Neuropathologie</b>	<b>14</b>
<b>1.10 Modelle bzw. Hypothesen des neuronalen Zellverlustes</b>	<b>15</b>
1.10.1 Exzitotoxizität	15
1.10.1.1 Glutamatrezeptoren	19
1.10.1.1.1 NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2B (GRIN2B)	20
1.10.1.1.2 GluR6 Kainat Rezeptor	21

1.10.2 Verminderter Energiemetabolismus (Sekundäre Exzitotoxizität)	21
1.10.3 Oxidativer Stress	23
1.10.3.1 Nitritoxidsynthesen	25
1.10.4 Apoptose	26
<b>1.11 Weitere Kandidaten für modifizierende Gene bei MH</b>	<b>27</b>
1.11.1 Enzyme des Homocysteinstoffwechsels	27
1.11.2 Hyperhomocysteinämie und neurodegenerative Erkrankungen	28
<b>1.12 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>30</b>
<b>2. Material &amp; Methoden</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>31</b>
2.1.1 Patientenkollektiv, DNA und klinische Daten	31
2.1.2 Chemikalien	32
2.1.3 Lösungen	33
2.1.4 Puffer	33
2.1.5 Gelmixe	34
2.1.6 Längenstandards/ Marker	35
2.1.7 Nukleotide	35
2.1.8 Synthetische Oligonukleotide	35
2.1.9 Enzyme	37
2.1.10 Geräte & sonstige Verbrauchsmaterialien	37
2.1.11 Software	38
<b>2.2 Methoden</b>	<b>38</b>
2.2.1 DNA-Isolierung aus EDTA – Blut	38
2.2.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.2.2.1 <i>Mismatch</i> -PCR	40
2.2.2.2 Weitere PCR Optimierung	41
2.2.3 Verdau der PCR-Produkte mit Restriktionsendonukleasen	42
2.2.4 Elektrophoretische Trennung von DNA	42
2.2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	43
2.2.5 Fragmentanalyse mit Kapillarsequenzier	44
2.2.6 Statistische Auswertung	45

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs</b>	<b>47</b>
<b>3.2.0 Polymorphismen im MH-Gen</b>	<b>51</b>
3.2.1 Delta 2642 Deletion	51
3.2.2 Promotor	53
3.2.3 <i>CCG-repeat</i>	54
<b>3.3 Polymorphismen der Enzyme im Homocysteinstoffwechsel</b>	<b>59</b>
3.3.1 <i>MTHFR</i> 677 C>T	59
3.3.2 <i>MTHFR</i> 1298 A>C	61
3.3.2.1 <i>MTHFR</i> 1298 MH-Patienten	61
3.3.2.2 <i>MTHFR</i> 1298 Kontrollgruppe	67
3.3.3 <i>MS</i> 2756 A>G	68
3.3.4 <i>MSR</i> 66 A>G	69
3.3.5 <i>CBS</i> 68bp Insertion	70
<b>3.4 Polymorphismen der Nitritoxidsynthasen (NOS)</b>	<b>71</b>
3.4.0 <i>NOS</i>	71
3.4.1 <i>NOS</i> 1 / <i>nNOS</i>	71
3.4.1.1 <i>NOS</i> 1(2) (SNP T>C)	71
3.4.1.2 <i>nNOS</i>	72
3.4.2 <i>NOS</i> 2 / <i>iNOS</i>	73
3.4.2.1 <i>NOS</i> 2A	73
3.4.2.2 <i>iNOS</i>	74
3.4.3 <i>NOS</i> 3 / <i>eNOS</i>	75
3.4.3.1 <i>NOS</i> 3	75
<b>3.5 Polymorphismen in den Glutamatrezeptoren</b>	<b>77</b>
3.5.1 <i>GluR6</i>	77
3.5.2 <i>GRIN2B</i> (C2664T)	79
3.5.1.1 <i>GRIN2B</i> MH-Patienten	79
3.5.1.2 <i>GRIN2B</i> Kontrollen	86
<b>3.6 Ergebnisse der linearen multiplen Regressionsanalyse</b>	<b>87</b>

<b>4. Diskussion</b>	<b>91</b>
4.1 CAG-Wiederholungen und Erkrankungsalter	91
4.2 Polymorphismen im <i>Htt</i> -Gen	92
4.3 MH und die Exzitotoxizitätstheorie	93
4.4 MH und Homocystein (HC)	94
4.5 MH und Nitritoxidsynthasen-Polymorphismen	97
4.6 MH und Glutamatrezeptor-Polymorphismen	98
<b>5. Ausblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten</b>	<b>101</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>103</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>124</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>125</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABI	<i>Applied Biosystems Incorporated</i>
A.bidest	bidestilliertes Wasser
abs.	absolut
<i>ad</i>	auf
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C-	Carboxy-
cDNA	<i>complementary DNA</i>
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d	2'-Desoxyribo-
DD	Differentialdiagnose
del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EA	Erstmanifestationsalter
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Dinatriumsalz
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	und andere
HCl	Salzsäure
ins	Insertion
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
m	milli ( $10^{-3}$ )
mm	Millimeter
M	molar
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mikro	( $10^{-6}$ )
MW	Mittelwert
MWU	Mann-Whitney-U Test
µg	Mikrogramm
n	Anzahl
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance In Man</i>
PAA	Polyacrylamid
p	kurzer Arm eines Chromosoms; pico ( $10^{-12}$ )
PCR	polymerase chain reaction
q	langer Arm eines Chromosoms

RNA	Ribonukleinsäure
SA	Standardabweichung
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat/EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i>
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

#### Nukleobasen/Nukleotide:

A	Adenin/Adenosin
C	Cytosin/Cytidin
G	Guanin/Guanidin
T	Thymin/Thymidin

#### Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

---

# 1. Einleitung

## 1.0 Allgemeine Einführung

Morbus Huntington (MH) ist eine autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems bedingt durch eine Mutation im *Huntingtin(Htt)*-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 4. Der genetische Defekt beruht auf einer pathologischen Verlängerung einer variablen Anzahl eines Basentriplets bestehend aus **C**ytosin, **A**denin und **G**uanin (CAG). Das CAG-Triplett kodiert für die Aminosäure (AS) Glutamin. Durch die CAG-Wiederholungen entsteht ein Polyglutamintrakt am NH<sub>2</sub>-Terminus des Htt-Proteins, weshalb MH auch als Polyglutaminerkrankung bezeichnet wird.

Das Ausmaß der CAG-Verlängerung korreliert negativ mit dem Alter bei Krankheitsbeginn: je höher die CAG-Wiederholungszahl, desto früher kommt es zum Ausbruch der Erkrankung (Duayo *et al.* 1993; The Huntington Disease Collaborative Research Group 1993).

Klinisch ist die Erkrankung durch abnormale unwillkürliche rhythmisch-krümmende und drehende Bewegungen, Dystonie, Persönlichkeitsveränderungen und kognitiven Verfall charakterisiert. Der kognitive Funktionsverlust beginnt mit einem Verlust der mentalen Flexibilität und einer Verlangsamung der intellektuellen Prozesse, was letzten Endes zur Demenz führen kann. Auch emotionale oder psychotische Auffälligkeiten werden häufig bei MH-Patienten beobachtet.

Neuropathologisch zeichnet sich die Erkrankung durch einen selektiven Verlust von Neuronen - hauptsächlich in den Basalganglien und im Cortex – aus. Durch Neuronenausfall in diesen Bereichen des Gehirns sind die MH-Symptome begründet.

MH gehört zu einer in den letzten Jahren ständig wachsenden Familie von hereditären neurodegenerativen Erkrankungen, die als gemeinsames Merkmal Verlängerungen von CAG-Triplet-Wiederholungen aufweisen. An Gemeinsamkeiten weisen diese Polyglutaminerkrankungen (s.Tab.1.1), die sich jedoch in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns manifestieren, einen progressiven Phänotyp (Gusella *et al.* 1996), subkortikale und kortikale Atrophie (Koshy *et al.* 1997) sowie neuronale Zellkerneinschlüsse (Davies *et al.* 1997; DiFiglia *et al.* 1997; Becher *et al.* 1998) auf.

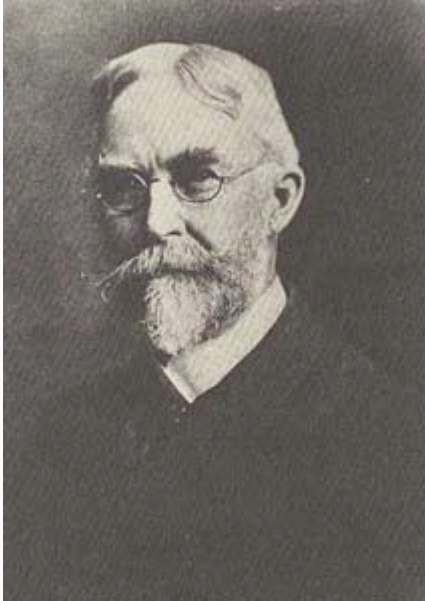
Tab.1.1 Polyglutamin-Expansionskrankheiten

Erkrankung	Vererbung	Genort	Klinische Erstmanifestation	Betroffenes Protein	Primäre neuropathologische Veränderung
<b>Spinocerebelläre Ataxie 1 (SCA 1)</b>	Autosomal dominant	6p22-23	Ataxie, bulbäre Lähmung, variable Pyramidenzeichen, Neuropathie	Ataxin-1	Cerebellum, Hirnstammkerne, spinocerebelläre <i>Tractus</i>
<b>Spinocerebelläre Ataxie 2 (SCA 2)</b>	Autosomal dominant	12q23-24.1	Ataxie, Ophthalmoplegie, Neuropathie, Chorea, Demenz	Ataxin-2	Cerebellum, Hirnstammkerne
<b>Spinocerebelläre Ataxie 3 (SCA 3)</b>	Autosomal dominant	14q32.1	Ataxie, Spastizität, Rigidität, Dystonie, Parkinsonismus, Neuropathie, Amyotrophie	Ataxin-3	Hirnstammkerne, Vorderhornzellen, Hinterstrang, spino-cerebelläre <i>Tractus</i>
<b>Spinocerebelläre Ataxie 6 (SCA 6)</b>	Autosomal dominant	19p13	Ataxie, Wahrnehmungsverluste, Nystagmus	$\alpha$ 1A-spannungsabhängiger Kalzium-Kanal	Olivenkerne, Nucleus dentatus
<b>Spinocerebelläre Ataxie 7 (SCA 7)</b>	Autosomal dominant	3p12-13	Ataxie, Degeneration der Retina	Ataxin-7	Cerebellum, Hirnstamm, Retina
<b>Spinocerebelläre Ataxie 17 (SCA 17)</b>	Autosomal dominant	6q27	cerebelläre Ataxie, Pyramidal- und Extrapyramidalzeichen, intellektuelle Beeinträchtigung, Demenz	TATA-Box-Bindprotein (TBP)	Cerebellum
<b>Morbus Huntington (MH)</b>	Autosomal dominant	4p16.3	Chorea, Demenz, psychiatrische Störungen, Gewichtsverlust	Huntingtin (Htt)	Nucleus caudatus
<b>Spinale &amp; bulbäre Muskelatrophie (SBMA)</b>	X - chromosomal	Xq13-21	Gynäkomastie, Verlust motorischer Neurone, Atrophie der Wurzelganglien	Androgen Rezeptor	Vorderhornzellen
<b>Dentatorubrale pallidoluysiane Atrophie (DRPLA)</b>	Autosomal dominant	12p13	Ataxie, Demenz, Chorea, Myoklonien, Epilepsie	Atrophin-1	Nucleus dentatus, Globus pallidus

## 1.1 Historie

Nachdem der Schweizer Mediziner Paracelsus (1493 – 1541) für diese Art von Bewegungsstörungen den Begriff „*Chorea*“ (griech. Tanz) eingeführt und versucht hatte, verschiedene Formen voneinander abzugrenzen, war George Sumner Huntington (1850-1916) der erste, der Ende des 19. Jahrhunderts eine detaillierte Beschreibung der Erkrankung gab, die später seinen Namen tragen sollte. G. S. Huntington (s.Abb.1.1) wurde am 9. April 1850 in East Hampton, NY, als Sohn des

Arztes George Lee Huntington geboren. Schon in seiner Kindheit machte er Bekanntschaft mit der Krankheit, als er seinen Vater bei der Arbeit begleitete.



**Abb.1.1** G.S. Huntington  
(1850-1916)

Nach Abschluss seines Medizinstudiums 1871 half er seinem Vater bei Patientenbesuchen und machte zu dieser Zeit die ersten vorläufigen Aufzeichnungen über Patienten mit hereditärer *Chorea*, die ihn bereits in Kindheitstagen in ihren Bann gezogen hatte. Anfang 1872 veröffentlichte er einen Artikel mit dem Titel „On Chorea“, in dem er schrieb:

*„It is peculiar in itself and seems to obey certain fixed laws... There are three marked peculiarities in this disease: 1. its hereditary nature; 2. a tendency to insanity and suicide; 3. its manifesting itself as a grave disease only in adult life.“* (Huntington 1872)

Noch mehr als 100 Jahre dauerte es, bis 1983 der Defekt, der für MH verantwortlich ist, auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 lokalisiert wurde (Gusella *et al.* 1983). Weitere zehn Jahre später gelang es erst, das *Htt*-Gen zu identifizieren, zu klonieren und zu charakterisieren (The Huntington Disease Collaborative Research Group (1993).

## 1.2 Epidemiologie

MH betrifft alle menschlichen Populationen und hat seine höchste Prävalenz in Europa und Nordamerika mit 5-10 Erkrankten pro 100.000 Einwohnern (Meierkord *et al.* 1994). Zurzeit leiden etwa 6.000 Bundesbürger an den Symptomen dieser Erkrankung (Landwehrmeyer 2001). Bei Japanern (0,1 – 0,38/100.000), Finnen (0,5/100.000) und Afrikanern (0,6/100.000) ist die Erkrankung seltener (Harper 1992). Neumutationen sind selten. Meist ist eine leere Familienanamnese auf fehlende klinische Daten oder frühen Tod der Eltern zurückzuführen. Maximal 1 bis 3% der Patienten mit gesichertem MH erkranken aufgrund einer Neumutation (Andrew *et al.* 1997).

## 1.3 Klinik

Die klinischen Symptome lassen sich durch die Trias, bestehend aus

- Bewegungsstörungen,
- Psychiatrischen Auffälligkeiten / Störungen und
- Kognitiven Störungen / Leistungseinbußen (v.a. Demenz)

zutreffend beschreiben.

### 1.3.1 Bewegungsstörungen

Kennzeichnende Bewegungsstörung des MH ist die *Chorea* (s.o.1.1). Hierbei handelt es sich um unwillkürliche, rhythmische und tänzelnd-drehende Bewegungen, die bei der Mehrzahl der Erkrankten das auffälligste Merkmal darstellen. Zunächst sind sie an den distalen Extremitäten, in der Gesichts- und Schulterregion betont. Später ist die gesamte Willkürmuskulatur betroffen. Im Gesichtsbereich fallen spezielle Bewegungen in der Stirn- und Augenbrauenregion auf, plötzliches Grimassieren ist häufig. Im Rumpf- und Nackenbereich kommt es zu unregelmäßig wippenden und hyperlordosierenden Bewegungen.

Zu Beginn sind die Hyperkinesien diskret und nur durch viel klinische Erfahrung zu erkennen, da die Patienten versuchen ihre unwillkürlichen Bewegungen in ihre Willkürbewegungen zu integrieren bzw. sie als Verlegenheitsgesten zu maskieren. Im weiteren Krankheitsverlauf können neben den choreatiformen noch andere Bewegungsstörungen sowie (Hemi-)Ballismus, Asterixis (Flattertremor), Myoklonie, Dystonie und Tremor hinzukommen. Der im anfänglichen Stadium meist herabgesetzte Muskeltonus kann bedingt durch die fortschreitende Gehirnatrophie in eine rigide Tonuserhöhung und Bradykinesie übergehen.

Die stark beeinträchtigte Bewegungskoordination führt letzten Endes zu erheblichen Problemen beim Schlucken von Nahrung, was den durch die vorherrschend katabole Stoffwechsellage bedingten Gewichtsverlust zusätzlich verschlimmert und bis hin zur Kachexie führen kann. Daher bedürfen die Patienten, unabhängig von einer eventuell zusätzlich bestehenden Schluckstörung, einer hochkalorischen Diät. Aufgrund der Schluckbeschwerden kann es zu Aspirationspneumonien kommen, die bei MH-Kranken die häufigste Todesursache darstellen.

---

Außerdem können Störungen der Okkulomotorik mit ruckartig sakkadierten Augenfolgebewegungen im Fingerfolgeversuch auftreten. Die Sprache wird verlangsamt, dysarthrisch, undeutlich und wirkt abgehackt. Vegetative Symptome, die sich in Form von Hyperhidrosis, Kopfschmerzen, Schlafstörungen, Harn- und/oder Stuhlinkontinenz und orthostatischen Beschwerden äußern, können im Verlauf der Erkrankung hinzutreten. Im Spätstadium verlieren die MH-Erkrankten die Kontrolle über ihre Willkürmotorik und sind somit auf Pflege angewiesen.

### **1.3.2 Kognitive Störungen**

Die progressive dementielle Entwicklung zeigt sich manchmal früh in einer beruflichen Leistungseinbuße. Der Abbau der intellektuellen Fähigkeiten betrifft zunächst die Konzentrationsfähigkeit und die Merk- und Gedächtnisleistung im Kurzzeitgedächtnis. Häufig sind ebenfalls eine starke Denkverlangsamung und Auffassungsstörungen zu beobachten. Die Fähigkeit, zielgerecht und strukturiert vorzugehen, ist stark beeinträchtigt und wird zunehmend durch impulsives und affektorientiertes Handeln ersetzt. Während Patienten, die erst nach dem 60. Lebensjahr die ersten Symptome eines MH zeigen, häufig keine oder nur leichte kognitive Beeinträchtigungen aufweisen, sind kognitive Leistungseinbußen bei der juvenilen Form besonders auffällig.

### **1.3.3 Psychiatrische Störungen**

Depressive, durch Antriebslosigkeit, Freudlosigkeit und sozialen Rückzug charakterisierte Symptome gehören zu den häufigsten psychiatrischen Störungen im Rahmen eines beginnenden oder manifesten MH. Die Art der Persönlichkeitsveränderung und besonders auch der affektiven Störung hängt oft von der gesunden Primärpersönlichkeit des Patienten ab. Zurückgezogene Persönlichkeiten tendieren eher zur gehemmten Depression, während extrovertierte Personen zur Agitiertheit und Aggressivität neigen. Allerdings führen die durch die Krankheit bedingte erhöhte Reizbarkeit und der Impulskontrollverlust auch bei sonst eher zurückhaltenden Personen manchmal zu aggressiven Reaktionen. Die Suizidrate beträgt bei MH-Kranken circa 6% (Farrer 1986).

### 1.3.4 Westphal-Variante

Bei dieser auch als juvenile Form bezeichneten Variante des MH setzen die Symptome bereits vor dem 20. Lebensjahr ein. Bradykinesie, Rigidität und Dystonie sowie epileptische Anfälle stehen im Vordergrund (Westphal 1883). Die juvenile Form zeigt oft einen stärker progredienten Krankheitsverlauf.

### 1.4 Erkrankungsalter und -dauer

Das mittlere Erkrankungsalter (*age at onset*) liegt bei 40 Jahren, wobei jedoch die mögliche Spanne mit 2 bis 80 Jahren extrem weit gefasst ist (Vonsattel *et al.* 1998). Ca. 10 % der Erkrankungen zählen zur Westphal-Variante (s.1.3.4). Der Erkrankungsbeginn liegt also vor dem 20. Lebensjahr. Die Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt durchschnittlich 15 bis 20 Jahre (Folstein 1989; Harper 1991) mit einer breiten Spannweite von 1,2 bis 40,8 Jahren (Foroud *et al.* 1999).

### 1.5 Diagnostik & genetische Beratung

Seitdem 1993 die Mutation für MH entdeckt wurde, spielt für die Erkennung der Erkrankung die direkte Gendiagnostik d.h. die Bestimmung der CAG-Triplet Wiederholungen im *Htt*-Gen eine entscheidende Rolle. Die Gendiagnostik kann entweder zur Differentialdiagnose oder zur prädiktiven Diagnostik angewendet werden. Die prädiktive Diagnostik soll nur bei volljährigen Personen durchgeführt werden. Sie findet bei einem Facharzt für Humangenetik statt und beinhaltet verschiedene Beratungsschritte. Bei der ersten Beratung wird die Anamnese – mit Schwerpunkt Familienanamnese – erhoben und der um Rat suchenden Person allgemeine Informationen zur MH-Erkrankung gegeben. Es wird über den variablen Krankheitsverlauf, den genetischen Hintergrund, therapeutische und diagnostische Möglichkeiten gesprochen (International Huntington's Association 1994; Epplen *et al.* 2000).

Als weiterführende Diagnostik kommen klinisch-apparative Verfahren wie z.B. das cCT zum Nachweis einer Caudatum-Atrophie oder auch neuropsychologische Tests und psychiatrische Untersuchungen zur Anwendung. Differentialdiagnostisch sollten eine Medikamentennebenwirkung (Neuroleptika, Antiemetika, L-Dopa, Steroide, Opiate, Antidepressiva, orale Kontrazeptiva, Antiepileptika, Antimalaria-Mittel), Hyperthyreose, Neuroakanthozytose,

systemischer Lupus erythematoses mit ZNS-Beteiligung und M. Wilson ausgeschlossen werden. Als die wichtigsten genetischen Differentialdiagnosen sollten die Dentatorubrale pallidoluysiane Atrophie (DRPLA), die mit einer hohen Prävalenz v.a. in Japan vorkommt, und die Spinocerebelläre Ataxie 17 (SCA 17) ausgeschlossen werden.

## 1.6 Therapieansätze

Die Therapie erfolgt ausschließlich symptomatisch, da bislang noch keine Heilung bzw. präventive neuroprotektive Therapie des MH etabliert werden konnte. Die Hyperkinesen und die paranoid-halluzinatorischen Symptome können mit Hilfe von Neuroleptika mit bevorzugtem Antagonismus an D<sub>2</sub>-Rezeptoren, v.a. Tiaprid, behandelt werden. Die Therapie der Depressionen erfolgt mit Sulpirid (partieller D<sub>2</sub>-Antagonist) oder Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRI). Benzodiazepine können Angst, Unruhe und Schlafstörungen positiv beeinflussen.

Aufgrund des katabolen Stoffwechsels der MH-Patienten sollte auch unabhängig von eventuell zusätzlich bestehenden Schluckstörungen mit einer hochkalorischen Ernährung begonnen werden. Die symptomatische Behandlung sollte neben der Pharmakotherapie auch psychologische, psychosoziale, krankengymnastische und logopädische Maßnahmen beinhalten. Auf Selbsthilfegruppen sollte verwiesen werden (Deutsche Huntington Hilfe, [www.dhh-ev.de](http://www.dhh-ev.de); Huntington's Disease Society of America, [www.hdsa.org](http://www.hdsa.org)).

## 1.7 Genetik

MH wird autosomal dominant vererbt. Die Wiederholungsanzahl der expandierten CAG-Triplets ist meiotisch instabil, d.h. sie kann auf die nachfolgende Generation variabel vererbt werden. Die Normalallele sind in der Regel stabil, d.h. die CAG-Anzahl bleibt bei der Transmission auf die Nachkommen nahezu konstant. Das Geschlecht des MH-übertragenden Elternteils hat einen besonderen Einfluss auf das Ausmaß der *Repeat*längen-Veränderungen:

Bei der mütterlichen Vererbung bleibt die Wiederholungsrate im Mittel unverändert, wohingegen es bei der Vererbung vom Vater zu einer *Repeat*verlängerung um im Mittel 4 CAG-Triplets kommt (Ranen *et al.* 1995). Erbt der Genträger das expandierte *Htt*-Gen vom Vater, so ist aufgrund der im Mittel

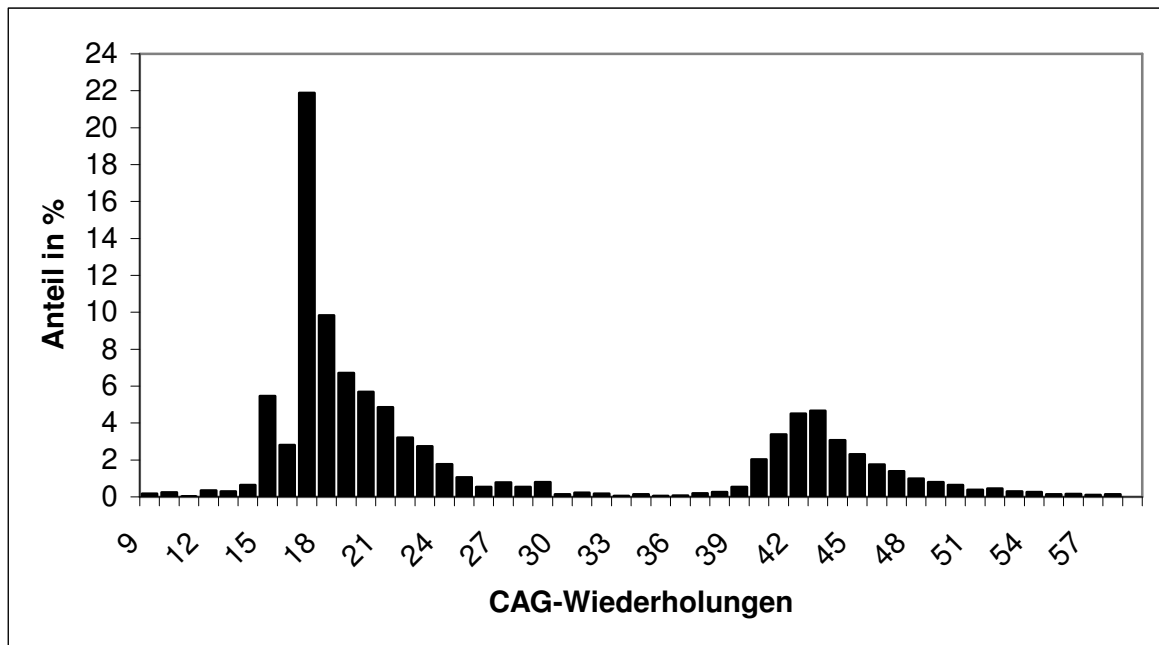
höheren Triplet-Wiederholungsrate beim Kind mit einem früheren Krankheitsbeginn als beim Vater zu rechnen, ggf. auch mit dem Auftreten einer juvenilen Verlaufsform. Das Phänomen des niedrigeren Manifestationsalters und einer unter Umständen auch schwereren Symptomatik bei nachfolgenden Generationen wird als „Antizipation“ bezeichnet.

Eine Analyse der Repeatlänge in Spermien von betroffenen Individuen hat gezeigt, dass eine deutliche somatische Instabilität in den Keimzellen vorherrscht. Das bedeutet, dass ein Großteil der männlichen Keimzellen ein längeres Allel trägt, als in den Zellen des peripheren Bluts nachweisbar ist. Der Grad der somatischen Instabilität des CAG-*Repeats* steht mit dem Grad der *Repeatexpansion* bei den Nachkommen (Telenius *et al.* 1995) in direktem Zusammenhang. Ein möglicher Expansionsmechanismus während der Spermatogenese wird in einer Arbeit von Kovtun *et al.* (2001) diskutiert.

Eine pathologische CAG-*Repeatexpansion* auf beiden Allelen des *Htt*-Gens, d.h. homozygote Träger der MH-Mutation sind naturgemäß selten (Wexler *et al.* 1987; Durr *et al.* 1999). Lange Zeit wurde angenommen, dass MH eine komplett dominante Erkrankung unabhängig vom heterozygoten oder homozygoten Allelstatus ist (Myers *et al.* 1989; Kremer *et al.* 1994). Demnach wären sowohl das Manifestationsalter als auch die Krankheitsprogression bei beiden Patientengruppen nahezu gleich. Neueste Ergebnisse zeigen jedoch, dass zwar das Erkrankungsalter bei hetero- und homozygoten Mutationsträgern fast identisch ist, die Erkrankung bei homozygoten Mutationen aber schneller voranschreitet (Squitieri *et al.* 2003).

Physiologischerweise enthält das *Htt*-Gen 6 bis 35 CAG-Wiederholungen. Im Mittel liegt bei der Mehrheit der gesunden Kontrollpersonen die *Repeatlänge* bei 18-19 Wiederholungen. Liegt die Anzahl der CAG-Wiederholungen bei 40 oder mehr, entwickelt sich die Erkrankung bei allen Mutationsträgern. Hier liegt das Mittel bei 42-46 CAG-*Repeats* (Andrew *et al.* 1993; Duayo *et al.* 1993; Read 1993; Snell *et al.* 1993; Kremer *et al.* 1994) (s.Abb.1.2). Bei einer Wiederholungszahl zwischen 36 und 39 ist die Huntington-Mutation nicht vollständig penetrant, d.h. Anlageträger mit diesen Wiederholungszahlen können ein hohes Lebensalter erreichen ohne Symptome zu entwickeln (ACMG/ASHG Statement 1998). CAG-Wiederholungen im intermediären Bereich zwischen 29 bis

35 *Repeats* weisen ein erhöhtes Risiko auf, in den pathologischen Bereich bei der Transmission auf die Nachkommen zu expandieren. So kommt es zu Neumutationen bzw. "sporadischen" MH-Erkrankungen.



**Abb.1.2 Anteil in Prozent (%) der CAG-Wiederholungen in einem 2262 Personen umfassenden MH-Patientenklientel (Quelle: Abteilung für Humangenetik der Ruhr-Universität Bochum 2004)**

Das Ausmaß der CAG-Verlängerung hat ferner einen Einfluss auf das Manifestationsalter des MH: je höher die *CAG-Repeatanzahl*, desto früher kommt es zum Ausbruch der Erkrankung (Duayo *et al.* 1993; MacMillan *et al.* 1993; Snell *et al.* 1993; Stine *et al.* 1993). Es hat sich jedoch gezeigt, dass Individuen mit gleicher *Repeatlänge* signifikante Unterschiede in ihrem Manifestationsalter aufweisen können, so dass im Einzelfall keine praktisch verwertbare Vorhersage des Krankheitsbeginns möglich ist. So liegt z.B. der Krankheitsbeginn bei Patienten mit 44 CAG-Wiederholungen zwischen dem 25. und 65. Lebensjahr (Kremer 1994).

Diese Unterschiede im Manifestationsalter lassen sich nur zu etwa 65 bis 71% auf die oben beschriebene inverse Korrelation zwischen *Repeatlänge* und Manifestationsalter zurückführen (Rosenblatt *et al.* 2001). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass noch andere Faktoren, z.B. modifizierende Gene, einen bedeutenden Einfluss auf die Effekte des verlängerten Huntingtins haben könnten

(MacMillan *et al.* 1993; Albin und Tagle 1995; Rosenblatt *et al.* 2001). Andere genetische Faktoren, die das Erkrankungsalter mitzubestimmen scheinen, wie der Glutamatrezeptor R6 (Rubinsztein *et al.* 1997) und das Transaktivatorprotein CA150 (Holbert *et al.* 2001), wurden bereits beschrieben. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass die *Repeat*länge nur sehr schwach mit der Art der Symptome korreliert, die die MH-Patienten initial aufzeigen (MacMillan *et al.* 1993).

### 1.7.1 Das *Htt*-Gen

Das *Htt*-Gen umfasst 180 Kilobasen und kodiert für ein Protein von 3144 AS mit einem Molekulargewicht von 348 Kilodalton. Es besteht aus 67 Exons (Ambrose *et al.* 1994; Albin und Tagle 1995). In Exon 1 (s. Abb.1.2), bestehend aus 567 bp, befindet sich der polymorphe CAG-Trinukleotidblock, welcher in eine variable Anzahl von Glutaminresten translatiert wird.

#### 1.7.1.1 Polymorphismen im *Huntingtin*-Gen

##### 1.7.1.1.1 CCG-Repeat

Neben dem polymorphen CAG-Trakt in Exon 1 des *Htt*-Gens befindet sich 13 Basen stromabwärts ein CCG-Repeat (s. Abb.1.2 grau), der für die AS Prolin kodiert. Die Anzahl der CCG-Wiederholungen variiert zwischen 7 und 12 *Repeats*. Die *Huntington's Disease Collaborative Research Group* (1993) ging aufgrund ihrer Ergebnisse anfänglich davon aus, dass der CCG-Repeat nicht polymorph ist und aus 7 Wiederholungen besteht. So schlossen die initial angewendeten Primer (s. Abb.1.3 unterstrichen) zur MH-Diagnostik den variablen CCG-Repeat ein, was zur Folge hatte, dass die Anzahl der CAG-*Repeats* bei Patienten mit mehr als 7 CCG-Wiederholungen falsch bestimmt wurde. Spätere Untersuchungen durch Rubinsztein *et al.* (1993) und Andrew *et al.* (1994) zeigten, dass der CCG-Repeat zwischen 7 und 12 Wiederholungen variiert. Eine Assoziation zwischen der Anzahl der CCG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter konnte jedoch nicht entdeckt werden. Andererseits zeigte sich bei der Häufigkeitsverteilung der Genotypen, dass 7 CCG-Wiederholungen bei MH-Kranken europäischer Herkunft überrepräsentiert sind (Vuillaume *et al.* 1998).

```

1 ttgctgtgtg aggcagaacc tgcgggggca ggggcgggct ggttccttgg ccagccattg
61 gcagagtccg caggctaggg ctgtcaatca tgctggccgg cgtggccccg cctccgcccg
121 cgcggccccg cctccgcccg cgcagcgtct gggacgcaag gcgccgtggg ggctgccggg
181 acgggtccaa gatggacggc cgctcagggt ctgcttttac ctgcggccca gagccccatt
241 cattgccccg gtgctgagcg gcgcgcgag tccgcccag gcctccgggg actgccgtgc
301 cgggcgggag accgccatgg cgaccctgga aaagctgatg aaggccttcg agtccctcaa
361 gtccttcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca
421 gcaacagccg ccaccgcccg cgcgcgcgcc gccgcctcct cagcttcctc agccgcccgc
481 gcaggcacag ccgctgctgc ctcagccgca gccgcccccg ccgccgcccc cgccgccacc
541 cggcccggct gtggctgagg agccgctgca ccgacc

```

**Abb.1.3** Exon 1 des *Htt*-Gens, welches ursprünglich als *interesting transcript 15* (IT 15) bezeichnet wurde

#### 1.7.1.1.2 $\Delta$ 2642 Deletion

Ein weiterer Polymorphismus im *Htt*-Gen ist die Deletion von drei Basen (GAG), die sich an Position des Kodons 2642 befinden und für die AS Glutamat kodieren. Er wurde erstmals von Ambrose *et al.* (1994) beschrieben. Die Feststellung von Ambrose, dass die Deletion häufiger bei MH-Patienten vertreten ist als im Normalkollektiv, konnte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden (Novelletto *et al.* 1994; Lucotte *et al.* 1996; Vuillaume *et al.* 1998). Vuillaume fand in seiner Arbeit zusätzlich heraus, dass die Deletion mit einem signifikant früheren Erkrankungsbeginn einhergeht, was weder durch vorangegangene noch durch nachfolgende Untersuchungen in anderen Kollektiven gestützt werden konnte.

#### 1.7.1.1.3 Promotor

In der Promotorregion des *Htt*-Gens befindet sich stromaufwärts der Translationsstartstelle sowohl ein 20bp Motiv, das in 1-3 Wiederholungen vorliegt, als auch ein 6bp Abschnitt, der in ein oder 2-facher Ausfertigung vorhanden sein kann. Am häufigsten wurden auf Normalallelen sowie auf den Allelen bei MH-Patienten die Kombination aus einem 6bp *Repeat* und 2 Wiederholungen des 20bp Abschnitts gefunden. Eine statistische Assoziation zwischen den Genotypen und dem Erkrankungsalter konnte bisher nicht gefunden werden (Coles *et al.* 1997). Weitere Untersuchungen durch Coles *et al.* (1998) haben gezeigt, dass jeder 20bp Abschnitt Sequenzen beinhaltet, die es DNA-bindenden Proteinen, z.B.

Transkriptionsfaktoren wie Sp1 *in vitro* ermöglicht, an diesen Stellen zu binden und so die Transkriptionsrate zu erhöhen. Coles *et al.* vermuteten weiterhin, dass eine reduzierte Expression, die von nur einem 20bp *Repeat* ausgeht, für eine Verzögerung des Erkrankungsalters oder einen geringeren Schweregrad der Symptome von MH-Patienten verantwortlich sein könnte.

## 1.8. Das Protein Huntingtin (Htt)

### 1.8.1 Charakteristika bzw. normale Funktion des "Wildtyp"-Htt

Bisherige Ergebnisse weisen darauf hin, dass das normale Htt ein rein cytoplasmatisches Protein ist, das unter normalen Bedingungen nicht im Zellkern anzutreffen ist. Es wird nicht nur im gesamten Gehirn, sondern auch in vielen anderen Organen wie Pankreas, Lunge, Testes und Muskel exprimiert (Li *et al.* 1993; Strong *et al.* 1993; Gutekunst *et al.* 1995; Landwehrmeyer *et al.* 1995). Am ehesten kommt ihm die Rolle eines Transportproteins zu, das u.a. daran beteiligt ist, intrazelluläre Vesikel an das Cytoskelett zu binden (DiFiglia *et al.* 1995). Eine wichtige Aufgabe des Htt-Proteins wird auch in der Embryogenese angenommen, da eine Deletion beider Htt-Allele in der Maus bereits zum Tod *in utero* führt (Duayo *et al.* 1995; Nasir *et al.* 1995; Zeitlin *et al.* 1995; White *et al.* 1997).

Weitere Untersuchungen haben zur Identifizierung zahlreicher Proteine geführt, die entweder an das normale oder aber an das expandierte Htt binden. Einige dieser Proteine wurden als „Huntingtin-interagierende Proteine (HIP)“, „Huntingtin-assoziierte Proteine (HAP)“ und „Huntingtin-yeast Partner (HYP)“ beschrieben. Gervais (2002) identifizierte erstmals ein Protein, welches mit HIP1 interagiert, und nannte es „HIP1 Protein Interagierer“ (HIPPI). Außerdem konnte er zeigen, dass HIP1 vermindert an den expandierten Polyglutamintrakt bei MH bindet. Das freie HIP1-Protein bindet in diesem Fall vermehrt an HIPPI und bildet mit ihm zusammen ein proapoptotisches Heterodimer, welches zusammen mit Procaspase8 einen Komplex bildet. Dieser Komplex kann mit Komponenten der extrinsischen Apoptosekaskade den Zelltod auslösen.

Andere Experimente belegen eine Interaktion von Htt mit den Transkriptionsfaktoren CREB-bindendes Protein (CBP), TATA-Bindeprotein (TBP) und CA-150 (Nucifora 2001). Außerdem scheint das normale Htt möglicherweise eine Funktion bei der Transkriptionsstimulation des gehirnspezifischen

neurotrophen Wachstumsfaktors BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) zu spielen, da mutiertes Htt die BDNF-Expression nur unzureichend stimuliert (Zuccato *et al.* 2001).

### 1.8.2 Veränderte Eigenschaften des mutierten Htt

Die MH-Mutation führt nicht zum Verlust der *Htt*-Genexpression. Die striatalen Neurone von präsymptomatischen Trägern des MH exprimieren die gleiche Menge der *Htt*-mRNA wie gesunde Kontrollen (Landwehrmeyer *et al.* 1995). Allerdings wird aufgrund der expandierten Polyglutaminkette die Faltung und räumliche Konformation des Proteins verändert.

In den Neuronen von MH-Erkrankten sowie in transgenen Tiermodellen findet sich eine progrediente intranukleäre Akkumulation von Htt-Immunoreaktivität sowie die Bildung von intranukleären Einlagerungen (Davies *et al.* 1997). Eine nukleäre Akkumulation mit intranukleären neuronalen Einschlusskörperchen finden sich auch bei den anderen Polyglutaminerkrankungen (s. Tab.1.1). Zusätzlich befinden sich in den Gehirnen von MH-Kranken zytoplasmatische, intraneuritische Ablagerungen (DiFiglia *et al.* 1997). Die Tatsache, dass sich intranukleäre Ablagerungen auch bei den anderen Polyglutaminerkrankungen finden, wobei die zugrundeliegenden Genprodukte mit Ausnahme der überlangen Polyglutaminkette keine Homologie zueinander aufweisen, legt nahe, dass sich die intranukleären Ablagerungen wesentlich aus den expandierten Polyglutaminketten selbst zusammensetzen, die schwer lösliche Aggregate bilden. Als Mechanismus der Einschlusskörper wurde eine Selbstaggregation von Glutaminketten in  $\beta$ -Faltblattstruktur diskutiert (Perutz *et al.* 1994). Alternativ wurde eine kovalente Vernetzung von Glutaminketten durch Transglutaminasen vorgeschlagen. Nach Ausschaltung der Nachproduktion des mutierten Htt sind die entstandenen neuronalen nukleären Einschlüsse jedoch nicht mehr nachweisbar (Yamamoto *et al.* 2000). Dies weist auf nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Transglutaminasen und den expandierten Glutaminketten hin, da das Reaktionsprodukt der Transglutaminase in Neuronen zu nicht abbaubaren Reaktionsprodukten führen müsste.

Vorraussetzung für die Bildung von Aggregaten scheint die proteolytische Spaltung des Htts zu sein. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass schon

die transgene Expression des isolierten Exon 1 des menschlichen *Htt*-Gens mit ca. 130 CAG *Repeats* zu einem progredienten neurologischen Phänotyp führt, der histologisch wie der MH selber durch neuronale intranukleäre Einschlusskörperchen charakterisiert ist (Mangiarini *et al.* 1996). Die Proteasen, die an der Bildung dieser aggregationsfähigen Fragmente beteiligt sind, sind bislang nur teilweise identifiziert. Eine mögliche Bedeutung von Caspasen beim Htt-Abbau wurde diskutiert (Wellington *et al.* 2000).

Die Geschwindigkeit, mit der sich unlösliche Aggregate dieser Polyglutamin-expandierten Fragmente bilden, ist abhängig von der Zahl der Polyglutaminwiederholungen sowie der Konzentration des mutierten Proteins (Scherzinger *et al.* 1999). Eine langsame Akkumulation verlängerter Huntingtinfragmente bis zu einer kritischen Schwelle könnte auch die lange Latenz bis zum Auftreten erster klinischer Symptome erklären.

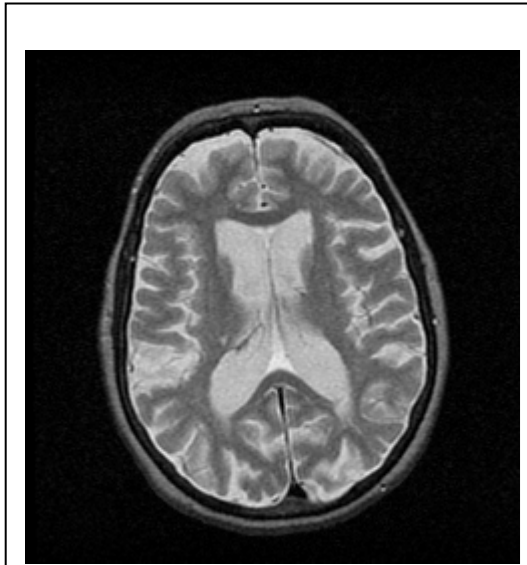
Die Fragmente akkumulieren im Zellkern und interferieren dort mit der Expression einer Gruppe von Transkripten (Cha 2000). Dadurch werden in den betroffenen Neuronen verschiedene Zellmechanismen gestört. In einem transgenen Mausmodell für MH erwiesen sich die Akkumulation des mutierten Proteins und die Veränderungen der Genexpression inklusive den daraus folgenden Verhaltensauffälligkeiten als reversibel (Yamamoto *et al.* 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das nicht-mutierte Htt eine protektive Wirkung gegenüber dem mutierten Protein besitzt (Leavitt *et al.* 2001).

## 1.9 Neuropathologie

Bei Patienten mit MH findet sich neuropathologisch eine Degeneration von Nervenzellen im ZNS, ganz überwiegend in den Basalganglien (Corpus caudatum, Nucleus subthalamicus und Putamen). Am stärksten sind mittelgroße Neuronen, die 80% der striatalen Neurone darstellen, betroffen. Sie enthalten als Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) plus Enkephalin oder GABA plus Substanz P und projizieren mit ihren Axonen in die nachgeschalteten Basalganglienstrukturen (Martin *et al.* 1986).

Von der Degeneration weitgehend unberührt bleiben dagegen die sogenannten Interneurone, deren Fortsätze das Striatum nicht verlassen und bei denen

mehrere Subtypen beschrieben wurden (Ferrante *et al.* 1987; Harrington *et al.* 1991; Cicchetti *et al.* 1996).



**Abb.1.4** T2-gewichtetes MRT-Bild von einem Patienten mit fortgeschrittenem MH. Zu beachten ist die diffuse corticale Atrophie und die selektive Atrophie des Nucleus caudatus, die durch die exzessive Weite der lateralen Ventrikel dargestellt ist.  
(Quelle: [www.med.harvard.edu](http://www.med.harvard.edu))

Im fortgeschrittenen Stadium ist oftmals das gesamte Gehirn atrophisch, was makroskopisch mit einer Verbreiterung der Sulci, einem Schrumpfen der Gyri und einer Reduktion der Gesamthirnmasse einhergeht (Sharp und Ross 1996; Reddy *et al.* 1999). Im Verlauf der Erkrankung nimmt das Gehirngewicht infolge des generalisierten Substanzverlustes um im Mittel 250g, d.h. 25 bis 30% im Vergleich zum Gesunden ab (Vonsattel *et al.* 1998). Die Ventrikel sind sekundär erweitert (s. Abb.1.4). Als Atrophiemarker im cCT hat sich die sog. Huckmannzahl (bzw. Vorderhorn/ Hinterhorn-Index) bewährt. Sie beschreibt die Ausmessung der Weite

der Ventrikelvorderhörner im Vergleich zur Weite der Hinterhörner in der Höhe des 3. Ventrikels bzw. das Verhältnis von Vorderhornweite zur Gesamtweite des Temporalhirns auf dieser Höhe. Beide Parameter zusammen bewerten letztlich die Atrophie des Caput caudati, der als Teil der Stammganglien beim MH früh degeneriert und dessen Größe durch seine Vorwölbung in die Vorderhörner der Seitenventrikel direkt bestimmt werden kann.

## 1.10 Modelle bzw. Hypothesen des neuronalen Zellverlustes

Über die exakte Pathophysiologie des MH gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine eindeutige Klärung, jedoch viele Ansätze und Hypothesen, die im Folgenden dargelegt werden sollen.

### 1.10.1 Exzitotoxizität

Der toxische Effekt der Aminosäure Glutamat wurde erstmals experimentell von Lucas und Newhouse im Jahre 1957 an der Mausretina beschrieben (Lucas und

Newhouse 1957). Im Jahre 1959 führten Curtis und Mitarbeiter Experimente am Rückenmark der Ratte durch, in denen sie mit Hilfe der Iontophorese die depolarisierende Wirkung des Glutamats auf Neuronen nachwiesen (Curtis und Watkins 1959). Es zeigte sich, dass eine Dicarboxylstruktur die Grundlage der exzitatorischen Eigenschaften der eingesetzten AS war. Aminosäuren mit depolarisierenden Eigenschaften an Neuronen wurden von Curtis (1960) als exzitatorische AS bezeichnet.

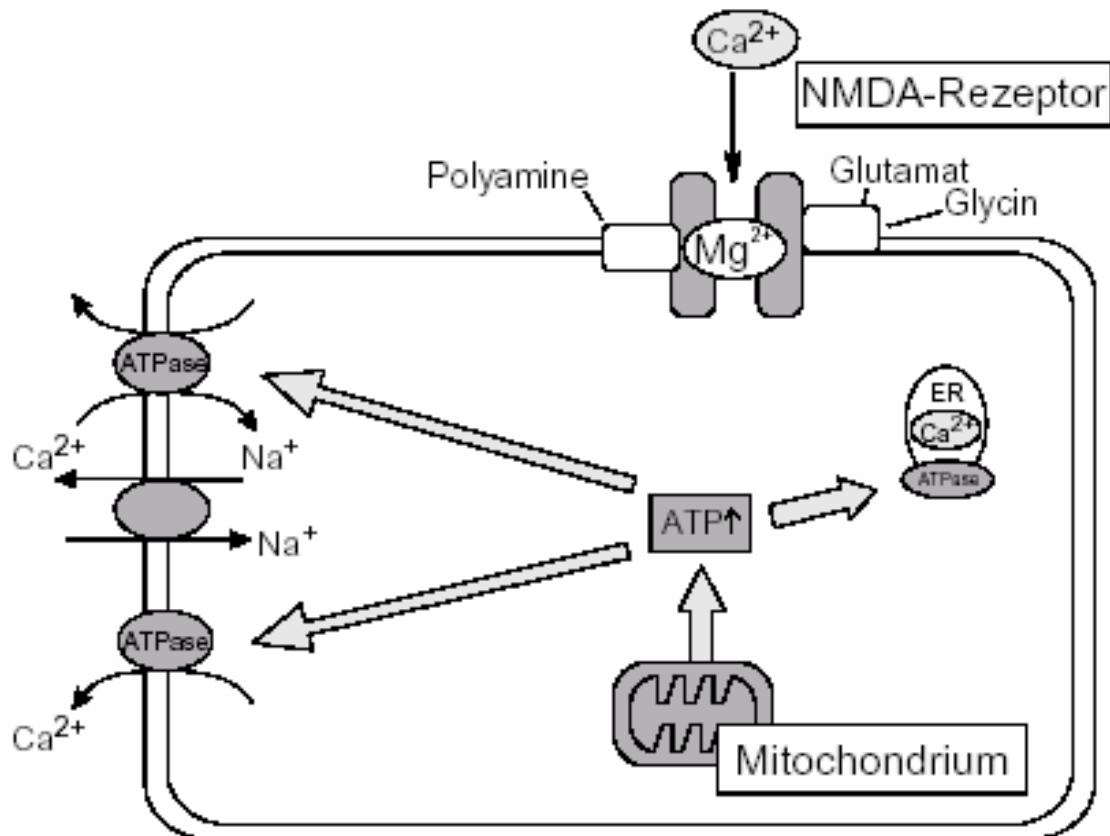
Neben Glutamat zählen zu den exzitatorischen AS u.a. N-methyl-D-Aspartat (NMDA), Aspartat, AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic *acid*) und Kainat. Olney führte die von Lucas und Newhouse begonnenen Experimente Ende der 60er Jahre weiter (Olney und Sharpe 1969) und benutzte erstmals den Begriff der Exzitotoxizität, um Schäden zu beschreiben, die nach Exposition von Neuronen mit exzitatorischen AS auftraten. Es wurde also eine Form des neuronalen Zelltodes beschrieben, die durch spezifische Rezeptoren vermittelt und durch den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat oder seine chemischen Analoga verursacht wird. Die klinischen Hypothesen, die sich aus diesen Experimenten entwickelten, bezogen sich zunächst auf die möglichen Effekte von Nahrungsbestandteilen, wie z.B. des Geschmacksverstärker Mononatriumglutamat (Olney 1978); dann standen Ideen im Vordergrund, die sich mit der Rolle von Substanzen mit Dicarboxylstruktur in der Ätiologie und Pathogenese angeborener Stoffwechselerkrankungen beschäftigten. In den 80er Jahren wurde der Gedanke weitgehend akzeptiert, dass kritisch erhöhte endogene Glutamatkonzentrationen eine Rolle in der Pathogenese des neuronalen Schadens bei akuten neurologischen Erkrankungen wie dem Schlaganfall, Hirntraumata oder epileptischen Anfällen spielen (Choi 1987). Es wurde früh vermutet, dass definierte Veränderungen des glutamergen Systems auch eine Rolle in der Pathogenese chronischer neurologischer Erkrankungen spielen könnten (Meldrum und Garthwaite 1990); bis in die späten 90er Jahre dauerte es jedoch (Ludolph 1996; Nicotera *et al.* 1997; Feldmeyer *et al.* 1999) bis diese These experimentell belegt wurde.

Eine wichtige Entdeckung in einem MH-Tiermodell mit Ratten war, dass intrastriatale Injektionen von Agonisten, die an Rezeptoren für exzitatorische AS (wie z.B. Glutamat) binden, zu einer massiven Neurodegeneration in diesem

---

Bereich führen (Coyle und Schwarcz 1976; Beal *et al.* 1991). Dabei können im Falle des Striatums gerade bei Verwendung des Glutamatagonisten Chinolinsäure viele der neuropathologischen Charakteristika des MH, wie z.B. die selektive Schädigung von nur mittelgroßen Projektionsneuronen, die hauptsächlich NMDA-Rezeptoren enthalten, im Tierversuch imitiert werden (Beal *et al.* 1991). Aber auch Verhaltensauffälligkeiten und elektrophysiologische Veränderungen wie bei MH konnten in diesen Tiermodellen beobachtet werden (Schwarz *et al.* 1992; Block *et al.* 1993). Das Striatum enthält dichte glutamaterge Afferenzen aus dem gesamten Cortex cerebri, und striatale Neurone exprimieren in großer Dichte Glutamaterezeptoren mit einer hohen Affinität für Glutamatagonisten (Young und Penney 1991; Kosinski *et al.* 1998). Hierdurch erklärt sich weitgehend die hohe Empfindlichkeit dieser Neurone gegenüber erhöhten Konzentrationen von Glutamat oder anderen glutamatartigen Substanzen. Aus den vielen Erkenntnissen, die aus den Tiermodellen gewonnen werden konnten, ist v.a. hervorzuheben, dass die Regulation freier exzitatorischer AS im synaptischen Spalt eine empfindliche Regelgröße ist, deren Entgleisen neuronalen Stress und Zelldegenerationen herbeiführen kann (Beal 1995).

Welche Auswirkungen eine erhöhte Konzentration von exzitatorischen AS im synaptischen Spalt auf physiologische Abläufe in der Zelle haben, soll an Hand von Abbildung 1.5 verdeutlicht werden.



**Abb.1.5** Ein normales Neuron im Ruhezustand

Das Mitochondrium produziert ATP, das als Energielieferant für eine Vielzahl von Ionenpumpen dient. Die cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird durch ATPasen, die energieverbrauchend  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle heraus- oder in intrazelluläre Organellen (z.B. Endoplasmatisches Reticulum, ER) hineinpumpen, innerhalb der Zelle niedrig gehalten. Der ionotrope, an Kationenkanälen gekoppelte NMDA-Rezeptor (s. 1.9.1.1) wird von  $\text{Mg}^{2+}$  blockiert.

Eine extrazellulär erhöhte Glutamatkonzentration (Exzitotoxizität) führt zu einer Übererregung der NMDA-Rezeptoren und damit zum verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Die ATPasen können das Ruhepotential der Zelle nicht mehr ausreichend aufrechterhalten, was zu einem langsamen Anstieg des Membranpotentials führt. Hat das Membranpotential einen gewissen Wert erreicht, fällt die spannungsabhängige  $\text{Mg}^{2+}$ -Blockade des NMDA-Rezeptorkanals weg, und  $\text{Ca}^{2+}$  kann ungehindert in die Zelle einströmen. Der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg aktiviert eine Vielzahl von Enzymen wie Nitritoxidsynthasen (NOS), Nukleasen, Proteinasen, Lipasen und zytosolische Kinasen, die das genetische Material der Zelle, das Zytoskelett und die Zellmembranen attackieren sowie den Phosphorylierungszustand und damit die Funktion von zytoplasmatischen Proteinen verändern. Zusätzlich führt die durch Glutamat hervorgerufene Exzitotoxizität auch zu erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Mitochondrium, das daraufhin freie Radikale produziert (Dugan *et al.* 1995). Diese Kaskade von Ereignissen führt letzten Endes zum Zelltod.

### 1.10.1.1 Glutamatrezeptoren

Schon früh differenzierte man aufgrund von Antagonistenstudien (Collingridge und Lester 1989) drei Rezeptorfamilien, von denen die NMDA und AMPA/Kainat-Familie aus rezeptorassoziierten Ionenkanälen besteht (=ionotrope Rezeptoren), während bei den metabotropen Rezeptoren die Signaltransduktion an eine Vermittlung über G-Proteine gekoppelt ist.

Der NMDA-Rezeptor, der aus einem Heterooligomer zusammengesetzt ist, ist mit einem Ionenkanal assoziiert, besitzt zwei Glutamatbindungsstellen und eine Anzahl modulatorischer Bindungsstellen u.a. für Glycin. Der Rezeptorkanal besteht aus mindestens einer NR1-Untereinheit (UE) und wenigstens aus einer Isoform der NR2-Untereinheit (NR2A bis NR2D) (Sucher *et al.* 1996). NMDA-Rezeptoren ermöglichen Natrium- und Kalziumionen den Einstrom in die Zelle, während sie den Ausstrom von Kalium in den Extrazellulärraum vermitteln. Am Ruhepotential wird der Kanal durch Magnesiumionen blockiert; wenn das Neuron polarisiert wird, entfällt dieser Block (s. Abb.1.4).

Die Rezeptoren der AMPA/Kainat-Gruppe bestehen aus Heterooligomeren, die prinzipiell aus 9 Untereinheiten (GluR1 bis GluR7 und KA1 sowie KA2) zusammengesetzt sind (Hollmann und Heinemann 1994). Dabei bildet eine Kombination der GluR1-4 Untereinheiten die AMPA-Rezeptoren und die GluR5-7 oder die KA1 oder KA2 Untereinheiten die Gruppe der Kainatrezeptoren, da sie präferentiell von Kainat aktiviert werden (Puchalski *et al.* 1994).

Untersuchungen haben gezeigt, dass das „*post-synaptic density protein 95*“ kurz PSDP-95, ein *Scaffold*(Gerüst)-Protein, sowohl an die 2B Untereinheit des NMDA-Rezeptors als auch an die GluR6-Untereinheit des Kainatrezeptors bindet. Weiterhin zeigte sich, dass das expandierte Htt in der Bindung zwischen den UE der Glutamatrezeptoren und PSDP-95 interferiert und eine Hypersensitivität der Rezeptoren verursacht, was letztendlich zu einem gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in die Zelle führt (Sun *et al.* 2001).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen des MH zu Veränderungen an den Neurotransmitterrezeptoren selbst kommt. So zeigen transgene Mäuse bereits sehr früh, d.h. vor Ausbruch phänotypischer Auffälligkeiten erste Rezeptorveränderungen, die mit dem Krankheitsverlauf kontinuierlich zunehmen. Diese Veränderungen betreffen nur ganz bestimmte

Rezeptorsysteme mit deutlicher Verminderung insbesondere von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) und Dopaminrezeptoren. Diese Veränderungen scheinen in erster Linie auf eine spezifische Störung der mRNA-Expression für diese Rezeptorgruppen zurückzuführen zu sein. Interessanterweise sind die betroffenen mGluR-Subtypen (mGluR2 und mGluR3) vorwiegend präsynaptisch auf den Endigungen kortikostriataler Synapsen lokalisiert. Wird aus den Endigungen Glutamat freigesetzt, so wird die weitere Glutamatfreisetzung über diese Rezeptoren durch einen Rückkopplungsmechanismus unterdrückt. Das Fehlen dieser Rezeptoren kann somit eine vermehrte Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt bewirken, was zu einer Überstimulation postsynaptischer Glutamatrezeptoren führt und damit exzitotoxisch auf striatale Neurone wirkt (Cha *et al.* 1998).

#### **1.10.1.1.1 NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2B (GRIN2B)**

Die 2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors wird auf Chromosom 12p12 kodiert. Sie bildet zusammen mit der NMDA-R2A-UE die  $Mg^{2+}$ -Bindungsregion des Rezeptors (Williams 1998). Bis zum jetzigen Zeitpunkt gab es noch keine veröffentlichten Untersuchungen zu den Polymorphismen der GRIN2B-UE und MH. Allerdings wurden Zusammenhänge dieser UE zwischen Schizophrenie (Chiu *et al.* 2003) und auch Morbus Parkinson (Tsai *et al.* 2002) diskutiert. Ein in diesen beiden Veröffentlichungen bereits beschriebener Basenaustausch von C zu T an Nukleotidposition 2664 soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Bisherige Untersuchungen (Cepeda *et al.* 2001) zeigten, dass eine verstärkte Antwort auf NMDA-Rezeptor-Aktivierung in einer Subpopulation von mittelgroßen striatalen Neuronen in sowohl prä- als auch symptomatischen Mäusen mit 150 CAG-*Repeats* (R6/2-Stamm) stattfand. Die gesteigerten Antworten auf NMDA-Applikation wurden von einer erhöhten  $Ca^{2+}$  Konzentration in der Zelle begleitet. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten zusätzlich, dass vermehrt die NMDA-R1-UE exprimiert wurde, wohingegen die Zahl der NMDA-R2A/B-UE abnahm. Dies könnte die Hypothese stützen, dass die funktionellen Eigenschaften des NMDA-Rezeptors, wie z.B. die Komposition der Untereinheiten durch die Htt-Mutation verändert wurden (Cepeda *et al.* 2001). Verminderte Expression dieser Untereinheiten würde besonders die Eigenschaften der NMDA Rezeptor-Funktion

verändern. Weiterhin vermuteten Cepeda *et al.*, dass der Schweregrad der Veränderungen in der NMDA-Rezeptor-Funktion mit der Länge der CAG-Expansion korrelieren könnte. Veränderungen in der NMDA-Rezeptor-Sensitivität waren ausgeprägter in symptomatischen R6/2-Mäusen als in YAC72 transgenen Mäusen mit 72 *Repeats*.

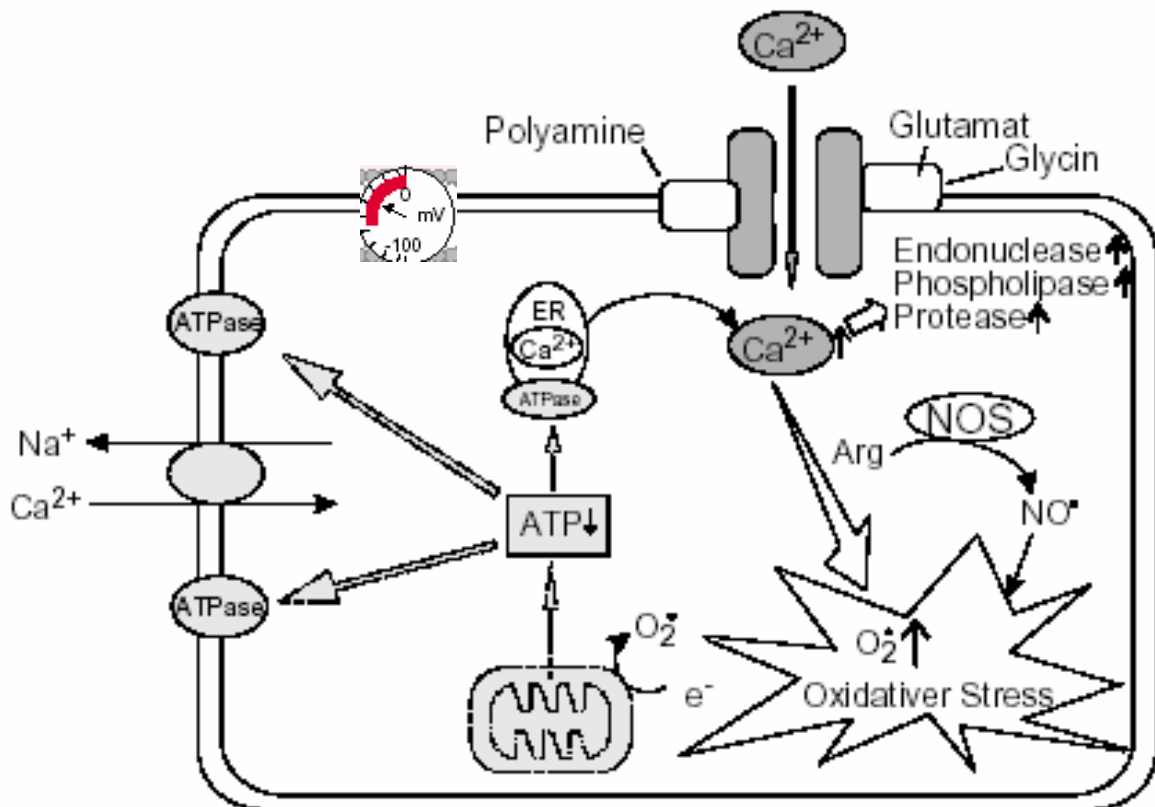
#### **1.10.1.1.2 GluR6-Kainat Rezeptor**

Der Kainat-bindende GluR6-Rezeptor wird auf Chromosom 6q21 kodiert. Für ihn wurde ein TAA-Triplett-*Repeat* beschrieben, welcher sich in der 3' untranslatierten Region des Gens befindet (Paschen *et al.* 1994). Ergebnisse von Rubinsztein *et al.* (1997) zeigten eine signifikante Assoziation der GluR6-Genotypen mit dem Erkrankungsalter. 13% der Varianz im Erkrankungsalter konnte er der GluR6-Genotyp Variation zuschreiben. MacDonald *et al.* (1999) konnten dem Allel, welches bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine Fragmentlänge von 155bp zeigte, einen früheren Erkrankungsbeginn zuweisen.

#### **1.10.2 Verminderter Energiemetabolismus (sekundäre Exzitotoxizität)**

Mitte der 90er Jahre wurde bekannt, dass die chronische orale Aufnahme von 3-Nitropropionsäure (3-NP) durch kontaminierte Nahrung beim Menschen selektive Läsionen der Basalganglien erzeugt (Mangiarini *et al.* 1996). Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei 3-NP um ein Zellgift handelt, das den mitochondrialen Elektronentransport selektiv durch Hemmung der Succinatdehydrogenase unterbricht und damit den Energiehaushalt der Zelle zerstört. Im Tiermodell zeigte sich, dass die systemische Injektion von 3-NP bei Ratten ebenfalls eine Läsion des Striatums mit selektiver Schädigung der Projektionsneurone wie bei MH hervorruft (Beal *et al.* 1993). Interessanterweise kann im Tiermodell dieser neurotoxische Effekt aufgehoben werden, wenn zuvor der natürliche exzitatorische Einfluss auf das Striatum beseitigt wird, z.B. durch teilweise Dekortikation oder durch Gabe von Antagonisten exzitatorischer AS (Albin und Greenamyre 1992; Beal *et al.* 1994). Diese Ergebnisse haben zum Anlass gegeben, einen Zusammenhang zwischen dem Energiestoffwechsel der Zelle und der Exzitotoxizität herzustellen. Es gibt bereits Hinweise, dass eine schwache Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels der striatalen Zellen deren

Empfindlichkeit gegenüber exzitatorischen Reizen erheblich steigert. Zusätzlich führt ein eingeschränkter Energiestoffwechsel in Kombination mit aktivierten Glutamatrezeptoren und darüber erfolgendem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle zu einer Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Stoffwechselwege, die mit der Bildung sog. „freier Radikale“ (s.1.9.3) einhergehen (Beal 1995). Abbildung 1.6 zeigt, wie es zur Bildung solcher freien Radikale kommt.



**Abb.1.6** Abläufe in der Zelle bei sekundärer Exzitotoxizität

Eine gestörte Mitochondrienfunktion führt einerseits zur Freisetzung von Superoxid  $\text{O}_2^-$  aus dem Mitochondrium und andererseits zur verminderten Produktion von ATP.

Die ATP-Verarmung der Zelle hat zur Folge, dass die membranständigen ATPasen das Ruhepotential der Zelle nicht mehr aufrechterhalten können, was zu einem langsamen Anstieg des Membranpotentials führt. Hat das Membranpotential einen gewissen Wert erreicht, fällt die spannungsabhängige  $\text{Mg}^{2+}$ -Blockade des NMDA-Rezeptorkanals weg, und  $\text{Ca}^{2+}$  kann ungehindert in die Zelle einströmen. Die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt zur Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Enzymen u.a. Nitritoxidsynthasen (NOS) (s. 1.9.3), die zur Produktion freier Radikale wie z.B. Stickstoffmonoxid  $\text{NO}$  beitragen: es kommt zu oxidativem Stress (s. 1.9.3).

Biochemische Analysen in autopsierten MH-Gehirnen haben gezeigt, dass die Enzymaktivität bestimmter mitochondrialer Proteine, die bei der oxidativen Phosphorylierung eine Rolle spielen, vermindert sind (Gu *et al.* 1996; Browne *et al.* 1997; Tabrizi *et al.* 1999). Außerdem ist der Glukose-Metabolismus in den Basalganglien und im cerebralen Cortex von MH-Erkrankten wesentlich reduziert (Kuwert *et al.* 1990; Browne und Beal 1994).

Defekte im Energiehaushalt wurden auch mittels bildgebender Verfahren, wie z.B. der Magnet-Resonanz-Spektroskopie, analysiert, die bestimmte biochemische Messungen erlauben (Jenkins *et al.* 1993; Koroshetz *et al.* 1997). So wurde herausgefunden, dass die zerebrospinale Lactat-Pyruvat-Ratio signifikant bei MH-Patienten erhöht ist. Zudem sind die Laktat-Konzentrationen im MH-Kortex erhöht. Diese erhöhten Konzentrationen sind jedoch durch Gabe von Coenzym Q10, einem essentiellen Cofaktor der Atmungskette in den Mitochondrien, reversibel (Koroshetz *et al.* 1997). Diese Untersuchungen zeigen, dass Agenzien wie Coenzym Q oder auch Kreatin (Matthews *et al.* 1998), die die Energie Produktion im Gehirn verstärken, neuroprotektive Effekte ausüben.

Ein weiteres Enzym, dem eine besondere Bedeutung im Energiestoffwechsel zukommt, ist die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Eine Arbeit von Cooper *et al.* (1997) zeigte, dass durch eine Interaktion zwischen GAPDH und expandierten Htt das Enzym inaktiviert und daraus resultierend der Energiehaushalt der Zelle negativ beeinflusst wird. Anschließende Messungen der Glykosilierungsfunktion von GAPDH in postmortalem Gehirngewebe von MH-Patienten und gesunden Kontrollpersonen ergaben jedoch keine Unterschiede im Aktivitätsgrad des Enzyms zwischen den beiden Versuchsgruppen (Browne 1997).

### 1.10.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird durch die Anwesenheit von freien Radikalen, d.h. von hoch reaktiven Sauerstoffderivaten (ROS) wie z.B. Superoxid  $O_2^-$  in hohen Mengen verursacht. Freie Radikale sind Atome oder Moleküle mit einem ungepaarten und damit sehr reaktiven Elektron in der Elektronenhülle. Die Reaktivität dieser freien Radikale beruht auf der Tatsache, dass sie sich energetisch auf einem ungünstigen Niveau befinden und sie zur Verbesserung dieses Niveaus und somit zur Absättigung des Radikalstatus ein weiteres Elektron benötigen. Dieses

„weitere“ Elektron kann v.a. aus Makromolekülen der Zelle (z.B. von Proteinen, DNA) aber auch aus Membranlipiden abgezogen werden, was zur chemischen Veränderung dieser Stoffe führt. Letztere erleiden als Folge ihres Elektronenverlustes (Oxidation) entweder einen Funktionsausfall oder erlangen sogar neue pathologische Funktionen (Behl und Moosmann 2001). Dass durch freie Radikale induzierte oxidative Schäden DNA-Strangbrüche hervorrufen können, wurde bereits beschrieben (Diggers *et al.* 1997). Einige Studien belegen eine gesteigerte Anzahl von DNA-Strangbrüchen bei MH, wobei zusätzlich gezeigt werden konnte, dass der Grad der DNA-Fragmentation im MH befallenen Striatum positiv mit der Länge der CAG-Expansion im *Htt*-Gen korreliert (Butterworth *et al.* 1998).

Insgesamt kann oxidativer Stress als Folge einer mitochondrialen Fehlfunktion oder auch durch Exzitotoxizität auftreten und kann den programmierten Zelltod (Apoptose, s.1.9.4) auslösen. Im Rahmen dieses oxidativen Stresses spielen sogenannte Nitritoxidsynthasen (NOS) eine besondere Rolle, da sie für die Produktion von Stickstoffmonoxid  $\text{NO}^-$ , welches als Nebenprodukt bei der sauerstoffabhängigen Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin entsteht (Dawson 1996), verantwortlich sind.

$\text{NO}^-$  kann physiologisch sowohl positive als auch negative Auswirkungen haben: Einerseits dient es als *second-messenger*-Signalmolekül in verschiedenen Bereichen des Organismus. Seine fundamentale Bedeutung als Vasomodulator ist ebenfalls gesichert (Ignarro 1991). Andererseits kann eine gesteigerte  $\text{NO}^-$ -Produktion als Antwort auf eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur vermehrten Bildung von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), einem sehr reaktiven und toxischen Molekül, führen.  $\text{ONOO}^-$  entsteht in einer Reaktion aus  $\text{NO}^-$  und dem Sauerstoffradikal Superoxid  $\text{O}_2^-$ . Es kann u.a. die DNA der Zelle schädigen und somit zu einer Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)Synthase (PARP) führen. PARP ist ein nukleäres Enzym, das an DNA-Reparaturvorgängen beteiligt ist. Eine exzessive PARP-Aktivierung führt jedoch zur Erschöpfung der zellulären Energievorräte, was letzten Endes aufgrund energetischer Dysfunktion den Zelltod einleitet (Zhang *et al.* 1994).

Freien Radikalen wird bei verschiedenen akuten oder chronischen neurodegenerativen Prozessen eine wichtige Rolle beigemessen (Beal 1995).

Galpern *et al.* (1996) zeigten, dass NO und Nitrotyrosin-verwandte Produkte so wie Peroxynitrit in der durch 3-NP ausgelösten Neurodegeneration involviert sind. Im Tiermodell wurde beobachtet, dass Substanzen, die die Bildung von freien Radikalen unterdrücken oder diese abfangen können (z.B. NO-Synthasehemmer oder sog. „spin traps“), eine neuroprotektive Wirkung gegen Glutamatexzitotoxizität entfalten (Schulz *et al.* 1996; Perez-Severiano *et al.* 1998). Zusätzlich konnte Schulz in einem Knock-out-Mausmodell, in dem die neuronale NOS (*nNOS*) ausgeschaltet wurde, zeigen, dass es nach Injektion von Malonat, einem mitochondrialen Toxin, zu einem reduzierten Ausmaß der durch Malonat bedingten Läsionen kommt. Diese Resultate unterstützen die Theorie, dass NO-vermittelte oxidative Schäden im Prozess des Zelltods involviert sind.

### 1.10.3.1 Nitritoxidsynthasen (NOS)

Insgesamt lassen sich 3 Isoformen der NOS unterscheiden.

Die neuronale NOS, kurz auch als *nNOS* bzw. Typ 1 bezeichnet, ist auf Chromosom 12q24 kodiert. Sie kommt sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem, aber auch in der Skelettmuskulatur vor. Im Gehirn ist sie u.a. für das Verhalten und die Erinnerungsbildung zuständig. Im peripheren Nervensystem ist sie für die gastrointestinale Motilität verantwortlich und an neuroendokrinen Funktionen beteiligt. Im Skelettmuskel reguliert sie u.a. den Metabolismus und die Muskelkontraktilität. Die Aktivität der *nNOS* sowie auch die einer weiteren Isoform, der *eNOS* (s.u.), wird durch Calmodulin/ $\text{Ca}^{2+}$  reguliert. Norris *et al.* (1996) berichteten, dass *nNOS*-mRNA vermindert im Striatum von MH-Patienten vorkommt. Die Abnahme des mRNA-Signals war dabei umso stärker, je weiter die Erkrankung fortgeschritten war. Auch im R6/2-Mausmodell konnte eine reduzierte *nNOS*-Aktivität als auch eine verminderte *nNOS*-Protein-Expression festgestellt werden. Der Gebrauch von NOS-Inhibitoren verstärkte zusätzlich die Symptome der Mäuse (Gordinier und Deckel 2000).

Die zweite Isoform ist die induzierbare NOS, kurz *iNos* bzw. Typ 2, die auf Chromosom 17q11.2 kodiert wird. Sie wird unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert. Eine Produktion erfolgt erst als Antwort auf inflammatorische Signale, wie z. B. Zytokin- oder Endotoxinfreisetzung. Sie ist in die Modulation der Entzündungsantwort eingebunden. Ihre Aktivität ist unabhängig von der zellulären

Calmodulin-Konzentration, da sie selbst mit Calmodulin eine sehr feste Bindung eingeht.

Die endotheliale NOS (eNOS oder auch Typ 3), kodiert auf Chromosom 7q35, ist die dritte Isoform der Nitritoxidsynthasen. Sie ist an den Golgi-Apparat und an die Caveolae vom Endothel gebunden und daher vorwiegend ortsständig. Ihre Aufgabe ist es, den vaskulären Tonus zu regulieren: Aktivitätsänderungen des Gefäßtonus spiegeln Veränderungen der NO-Konzentration wider und stellen somit ein indirektes Maß der NO-Produktion dar. Verschiedene Studien mit MH-Patienten zeigten, dass sich der cerebrale Blutfluss bei Patienten mit MH während kognitiver und motorischer Aktivität verlangsamt (Deckel *et al.* 1998; Deckel und Duffy 2000).

#### 1.10.4 Apoptose

Unter dem Begriff Apoptose versteht man einen programmierten Zelltod, der u.a. im Nervensystem während der Embryogenese zur Entfernung überzähliger Neuronen als Teil einer natürlichen Entwicklung aktiviert wird.

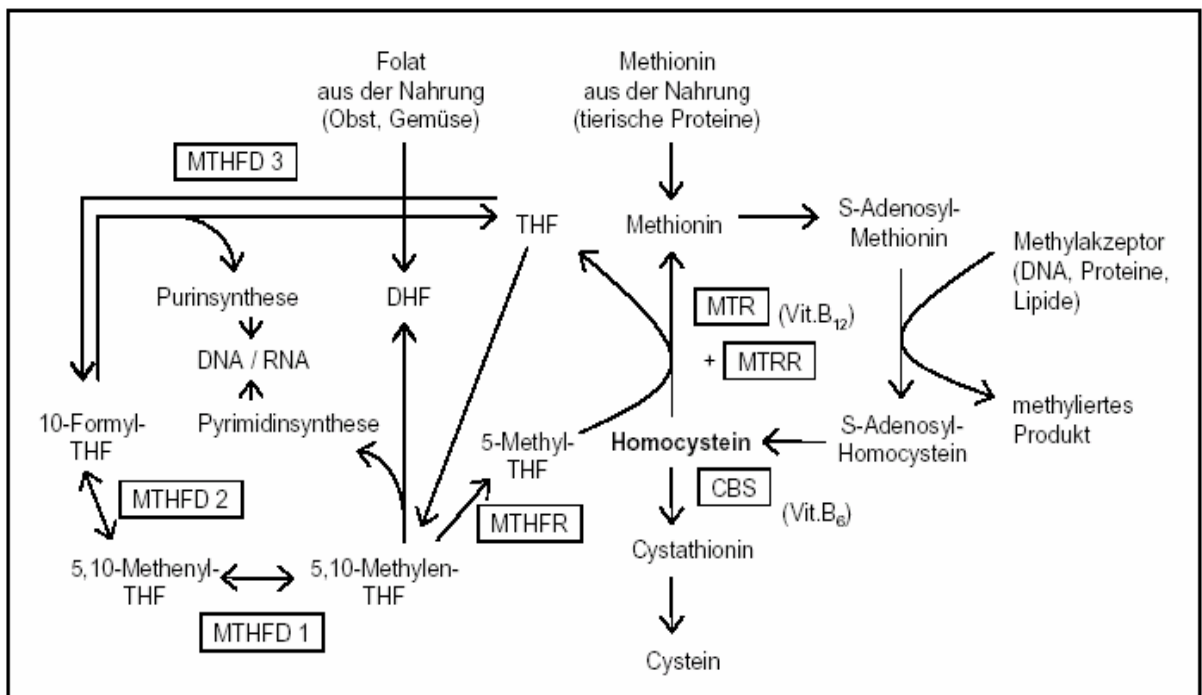
Wie verschiedene Untersuchungen zeigen, könnten auch Caspasen direkt im neuronalen Zelltod verwickelt sein. Caspasen sind **cystein-asp**artatschneidende **Proteasen**, die bestimmte Zielproteine während des apoptotischen Zelltods schneiden. So zeigte sich in verschiedenen Zellsystemen, dass Htt ein gutes Substrat für Caspase3 darstellt und dass eine abnorme Verlängerung des Polyglutamintraktes die Kapazität von Caspase3, Htt zu schneiden, erhöht wird (Goldberg *et al.* 1996). Li (2000) beschrieb, dass intranukleäres Htt Apoptose in Zellkulturen durch Induktion von Caspase3 und vermutlich durch verstärkte Expression von Caspase1 verursacht und zur Freisetzung von Cytochrom c, einem proapoptotischen Faktor, aus den Mitochondrien führt. Die Inhibition von Caspase1 und 3 reduziert die Htt-induzierte Toxizität sowohl in Zellkulturen als auch in transgenen MH-Mausmodellen (Ona *et al.* 1999; Chen *et al.* 2000; Wellington *et al.* 2000). Caspase1 und 3 spielen so eine entscheidende Rolle in der Kontrolle und dem Auslösen der intrazellulären Mechanismen, die zum programmierten Zelltod führen.

## 1.11 Weitere Kandidaten für modifizierende Gene bei MH

### 1.11.1 Enzyme des Homocysteinestoffwechsels

Homocystein (HC) ist eine schwefelhaltige, aliphatische AS, die als Ausgangsstoff eine wichtige Rolle in der Remethylierung der AS Methionin spielt. Methionin wird in allen Körpergeweben als universeller Methylgruppendonor bei der DNA-Synthese gebraucht (Geisel *et al.* 2001). Eine weitere Rolle spielt HC im Stoffwechsel der Sulfhydrylgruppenübertragung.

Zu den Enzymen, die am Homocysteinzyklus (s. Abb.1.7) beteiligt sind, gehören die Cystathionin- $\beta$ -Synthase (CBS), die Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferase (MTR, auch Methioninsynthase (MS)), die Methyltransferase-Reduktase (MTRR) Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase (MTHFD) und die Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR). Folgende Reaktionen laufen im Rahmen dieses Zyklus ab:



**Abb.1.7** Vereinfachte Darstellung des Homocysteinzyklus (Erläuterungen im Text)

Abkürzungen:

THF = Tetrahydrofolat

MTHFD = Methylentetrahydrofolat-dehydrogenase

MTHFR = Methylentetrahydrofolat-reduktase

MTR = Methioninsynthase

CBS = Cystathionin- $\beta$ -Synthetase

5-Methyl-Tetrahydrofolat (THF) liefert die Methylgruppe für die von der MTR katalysierten Methylierung von Homocystein zu Methionin. Das aus dieser

Reaktion entstehende Methionin ist notwendig zur Proteinsynthese. In seiner aktivierten Form, S-Adenosylmethionin, ist es der wichtigste Methylgruppendonator bei Transmethylierungsreaktionen, unter anderem von DNA, Proteinen und Lipiden. Nach Abgabe der Methylgruppe entsteht wieder Homocystein. Homocystein kann entweder von der MTR zu Methionin remethyliert oder von der CBS durch eine Transsulfurierung zu Cystathionin umgewandelt werden. 5,10-Methylen-THF dient als Coenzym bei der Thymidylatsynthese.

Bei MTHFR, MTR, MTRR und CBS handelt es sich also um Enzyme, die entscheidend sind bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Methioninkonzentration und bei der Bereitstellung von Folsäurederivaten zur DNA-Synthese. Wenn es in diesen Enzymen zu Defekten kommt (z.B. bei den Enzymen des Methylgruppen-Stoffwechsels (MS-, MSR- und 5,10-MTHFR-Defizienz) bzw. Sulfhydrylgruppen-Stoffwechsels (CBS-Defizienz)), entsteht als Konsequenz eine Hyperhomocysteinämie. Die Korrektur eines moderaten Anstieges der Homocysteinkonzentration im Neuron durch regelmäßige Folsäuregaben wurde von Van Guldener *et al.* (2001) beschrieben.

### 1.11.2 Hyperhomocysteinämie und neurodegenerative Erkrankungen

Der Einfluss einer Hyperhomocysteinämie auf den Verlauf einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, Morbus Alzheimer, wurde bereits untersucht: ein moderat erhöhter Homocysteinspiegel im Plasma (Blutspiegel > 15-40  $\mu\text{mol/l}$ ) ist demnach ein erheblicher, unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer frühen Manifestation der Alzheimer Demenz (Seshadri *et al.* 2002). Ein leicht erhöhter HC-Plasmaspiegel (um 5  $\mu\text{mol/l}$ ) erhöht dabei schon das Risiko an M. Alzheimer zu erkranken um 40%.

Die Neurodegeneration unter Hyperhomocysteinämie könnte durch die exzitotoxischen Eigenschaften des HC bedingt sein: HC ist ein Agonist an NMDA-Rezeptoren des ZNS und kann daher exzitatorische Eigenschaften haben, die zu einer gesteigerten Aktivierung oben geschilderter (s. 1.9.1 und 1.9.2), pathogenetischer Mechanismen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms führen (Lipton 1997). Darüber hinaus führen erhöhte HC-Spiegel über ihre NMDA-Rezeptoraktivierung zu neuronalem Zelltod *via* Apoptose in murinen Tiermodellen (Seshadri *et al.* 2002). Die Zeitdauer bis zum Eintreten des apoptotischen Zelltodes an Neuronen

durch HC wird durch gleichzeitiges Einwirken von Glutamat an den NMDA-Rezeptoren noch verkürzt (Moore *et al.* 2001).

In einem Zellmodell für M. Alzheimer führte der unter HC vermehrte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu einer verstärkten Neurotoxizität der bei dieser Erkrankung intranukleär abgelagerten Amyloidfibrillen (Ho *et al.* 2001). Ferner führt ein Fragment dieser Amyloidfibrillen (A $\beta$ ), allerdings nur in höheren Konzentrationen, zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überlagerung der Zellen und somit zu oxidativem Stress und letztlich zu Apoptose. Schließlich wurde mit diesem Zellmodell auch gezeigt, dass die simultane Applikation der Exzitotoxine (A $\beta$  und HC) eine toxische Wirkung auf die Zelle hat, wohingegen die separate Anwendung der beiden Exzitotoxine in niedrigen Konzentrationen keinen neuronalen Zelltod auslöst. Dieser Effekt wird als additive Toxizität bezeichnet (Ho 2001).

Erhöhte HC-Spiegel haben also offensichtlich eine Langzeitwirkung auf das neuronale Überleben. Untersuchungen von Kandidatengenens des HC-Stoffwechsels scheinen daher ein wichtiger Ansatz zu sein, um signifikante Einflüsse modifizierender Gene auf den MH zu detektieren.

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Polymorphismen untersucht werden, die zu einer Hyperhomocysteinämie führen können:

Das *MTHFR*-Gen (Chromosom 1q36) weist zwei relevante Polymorphismen auf, den 667 C>T Basenaustausch (Alanin zu Valin in Codonposition 222) und den 1298 A>C Austausch (Glutamat gegen Alanin), die beide zu einer Enzymform mit 50% reduzierter Aktivität führen (Geisel *et al.* 2001).

Das Gen der CBS (Chromosom 21q22.3) zeigt zwischen den Nukleotiden 844 und 845 eine Insertion von 68bp, die mit einem Polymorphismus in demselben Gen (833 C>T) assoziiert ist und zur Homocystinurie mit massiv erhöhten Homocysteinspiegeln führt (Geisel *et al.* 2001).

Das *MS*-Gen (Chromosom 1q43) zeigt einen Polymorphismus im Bereich der Base 2756 A>G, (AS-Austausch von Glycin zu Aspartat), der zu einer reduzierten Enzymaktivität mit daraus folgender moderater Hyperhomocysteinämie führt (Geisel *et al.* 2001). Gleiches gilt für den Polymorphismus des *MSR*-Gens auf Chromosom 5p15.3-p15.2 (66 A>G), der zu einem Isoleucin versus Methionin Austausch führt.

## 1.12 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es neben dem bereits bekannten krankheitsverursachenden CAG-Repeat andere genetische Faktoren, wie modifizierende Gene zu finden, die in der Pathogenese des MH eine wesentliche Rolle spielen: Diese könnten entweder protektiv wirken und das Erkrankungsalter erhöhen oder aber für einen frühzeitigen Erkrankungsbeginn mitverantwortlich sein.

Die klinische Symptomatik bei MH, wie auch das durchschnittliche Manifestationsalter der Erkrankung hängen zu 65 – 71 % vom Ausmaß der CAG-Triplettverlängerung im mutierten *Htt*-Gen ab. Bei der Hälfte der belasteten Familien ist eine deutliche Variabilität der Klinik und des Manifestationsalters auch bei Patienten mit gleicher CAG-Trinukleotidblocklänge zu erkennen. Diese Variabilität könnte auf den Einfluss weiterer genetischer Faktoren zurückzuführen sein. Um den Einfluss von weiteren genetischen Faktoren zu überprüfen, werden in der Literatur bereits beschriebene Polymorphismen untersucht und die dadurch gewonnenen Daten mit den jeweiligen Erkrankungsaltern der Patienten statistisch korreliert.

Es sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Wie hoch ist der Einfluss der CAG-Wiederholungen auf dem expandierten Allel für die Varianz im Manifestationsalter?
- Haben die CAG-Wiederholungen auf dem nicht expandierten Allel einen Einfluss auf das Manifestationsalter?

Besteht eine pathogenetische Relevanz von Polymorphismen in den Genen:

- der Enzyme des Homocysteinestoffwechsels mit dem Erkrankungsalter ?
- der Nitritoxidsynthasen mit dem Erkrankungsalter ?
- der Glutamatrezeptoren mit dem Erkrankungsalter ?
- Besteht eine pathogenetische Relevanz von Polymorphismen im *Htt*-Gen mit dem Erkrankungsalter ?
- Inwieweit haben die Polymorphismen einen Einfluss auf die Varianz im Manifestationsalter?

Die molekulargenetischen Untersuchungen werden mittels RFLP, PCR-Mikrosatelliten und Fragmentlängenanalyse durchgeführt.

Die durch diese Arbeit gewonnenen Ergebnisse können möglicherweise einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung von neuen Therapiestrategien bei MH leisten.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenkollektiv, DNA und klinische Daten

Für die molekulargenetischen Analysen standen Blutproben von 162 an MH erkrankten Patienten zur Verfügung, die aus dem Huntington Zentrum NRW der Universitätsklinik des St. Josef – Hospitals in Bochum stammen. Die klinischen Daten wurden ebenfalls im St. Josef Krankenhaus erhoben und dokumentiert. Bei dem Erkrankungsalter wurde zwischen dem motorischen, psychiatrischen und dem allgemeinen Erkrankungsbeginn unterschieden. Das allgemeine Erkrankungsalter setzt sich aus dem motorischen und psychiatrischen zusammen, wobei jeweils der Erkrankungsbeginn ausgewählt wurde, welcher eher eintrat. Die Datenerfassung erfolgte nach den Kriterien der *European Huntington Disease Investigation Study Group* (EHDIS) durch ein standardisiertes Anamneseprotokoll. Aus dem bestehenden Patientenkollektiv wurde eine Studienpopulation von 151 Patienten ausgewählt, deren CAG-Repeats 41 bis 45 Wiederholungen umfassen, um so den Einfluss eventueller modifizierender Gene auf das Manifestationsalter in einer homogenen, gut charakterisierten Population untersuchen zu können.

Unter den 11 ausgeschlossenen Patienten befanden sich zwei Patientenpaare, die miteinander verwandt waren, so dass jeweils ein Patient eines Paares nach dem Zufallsprinzip aus der Studie eliminiert werden musste. Ein Patient wies zwei expandierte Allele (37 und 43 CAGs) auf, und die restlichen acht Patienten hatten CAG-Wiederholungen > 45. Als Kontrollgruppe standen DNA-Proben von 111 gesunden Essener Bürgern zu Verfügung. Die an der Studie teilnehmenden Patienten gaben schriftlich ihre Einwilligung. Die Ethikkommission der Ruhr-Universität Bochum genehmigte die Studie (Aktenzeichen # 1457/2000).

**Tab. 2.1** Charakteristika der MH Patienten

CAG-Repeats	Männer	Frauen	Männer + Frauen	Erkrankungsbeginn Minimum/Maximum	Erkrankungsbeginn in Jahren (MW)
41	11	9	20 (13,2%)	35 / 73	53,1
42	22	16	38 (25,2%)	21 / 68	49,58
43	23	20	43 (28,5%)	25 / 60	44,88
44	14	20	34 (22,5%)	29 / 60	43,68
45	10	6	16 (10,6%)	30 / 53	38,13
<b>Gesamt</b>	80	71	151 (100%)	-	45.874

### 2.1.2 Chemikalien

Aceton	Merck
Acrylamid	Fluka
Acrylamid/ N,N'-Methylen-bis-acrylamid-Fertiglösungen	Serva
Agarose	Gibco BRL
Ammoniumpersulfat (APS)	Baker
Borsäure p.A.	Baker
Bromphenolblau	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Desoxyribonukleotid-Triphosphate (= dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Peqlab
Essigsäure	Merck
Ethanol	Riedel
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Formamid (FA)	Amresco
Glycerin p.A.	Riedel-de-Haen
Harnstoff p.A.	Merck
Magnesiumchlorid p.A. (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Mineralöl	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Fluka
N,N,N'N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Riedel-de-Haen
Nonidet P40 (NP 40)	Fluka
Oligonukleotidprimer	Metabion
Phenol	Riedel
Polyoxy-ethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma
Salzsäure (HCl)	Baker
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Biomol
Xylencyanol FF	Bio-Rad

### 2.1.3 Lösungen

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

APS-Lösung:	10% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
40%ige Polyacrylamid-Stammlösung	38% w/v Acrylamid 2% w/v Bisacrylamid
Ethidiumbromidlösung	0,5 mg Ethidiumbromid Ad 1000 ml 1 x TBE
Oligonukleotidprimer:	10pmol/ $\mu\text{l}$ in $\text{H}_2\text{O}$
$\text{MgCl}_2$ -Lösung:	50mM $\text{MgCl}_2$
dNTP-Lösung:	je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in $\text{H}_2\text{O}$

### 2.1.4 Puffer

GC-Puffer: 10x Taq DNA-Polymerase-Puffer	160 mM $\text{NH}_2\text{SO}_4$ 670 mM Tris HCl (pH 8,8) 0,1% Tween-20
TE-Puffer (1x) pH 8,0:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)
STE-Puffer (TEN) pH 8,0:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA 0,1 M NaCl
Proteinase K-Puffer:	20 mM Tris/HCl (pH 7,4) 4 mM EDTA 100 mM NaCl

Gelelektrophorese-Laufpuffer

→ 1x TBE

89 mM Tris
89 mM Borsäure
20 mM EDTA

Ladepuffer

→ für Agarosegele

30 % (v/v) Glycerin
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol

→ für denaturierende Polyacrylamid(PAA)-Gele  
(Stop-Solution)

95% Formamid
20 mM EDTA
0,05% w/v Bromphenolblau
0,05% w/v Xylencyanol

→ 6x Ladepuffer für native PAA-Gele

60 % Glycerin
60 mM EDTA
0,2% w/v Bromphenolblau
0,2% w/v Xylencyanol

**2.1.5 Gelmixe**

→ für Mikrosatellitengele:

6 % Acrylamid/Bisacrylamid (49:1)
8 M Harnstoff
1 x TBE, pH 8,0
140 ml APS/ TEMED pro 67 ml

→ für nicht-denaturierende PAA-Gele:

8/9 % Acrylamid/ Bisacrylamid (38:2)
12 % (v/v) Glycerin
1 x TBE, pH 8,0
140 ml APS/ TEMED pro 40 ml

### 2.1.6 Längenstandards/ Marker

- pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker                      MBI Fermentas  
 Fragmentlängen (bp): 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 26
- M13 – Marker    DNA-Leiter des Phagen M13mp18
- D4 – Marker    Beckman

### 2.1.7 Nukleotide

Desoxyribonukleotid-Triphosphate                      Peqlab

(= dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTT)

Radioisotope:

( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dCTP (370MBq/ml, 10mCi/ml, 3000 Ci/mmol)                      Hartmann

( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dATP (370MBq/ml, 10mCi/ml, 6000 Ci/mmol)                      Hartmann

### 2.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Die für die Polymerasekettenreaktion (PCR) als Startermoleküle eingesetzten einzelsträngigen Desoxyribo-Oligonukleotide (*Primer*) wurden von der Firma Metabion bezogen und in einer Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l geliefert. Die Primersequenzen wurden zum Teil aus der Literatur entnommen, zum Teil auch mit Hilfe des Programmes *Primer-Express*<sup>TM</sup> 1.5a (ABI) entworfen. Für das System, das mit dem Kapillarsequenzier untersucht werden sollte, war das 5'-Ende des Vorwärtsprimers mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert.

Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare finden sich in Tab. 2.2.

Tab. 2.2 Primersequenzen

PCR-SYSTEM	Sequenzen der Vorwärts- & Rückwärtsprimer	T <sub>M</sub> in °C	Fragmentlänge in Basenpaaren (bp)
<b>MTHFR 677</b>	5'- CCT TGA ACA GGT GGA GGC C -3' 5'- CAA AGA AAA GCT GCG TGA TGA T-3'	60 °C	158 bp
<b>MTHFR 1298</b>	5'-GCA AGT CCC CCA AGG AGG-3' 5'-GGT CCC CAC TTC CAG CAT C-3'	61 °C	145 bp
<b>CBS 68</b>	5'- TAT CGA GGC ATG TCC AGG CGG GGC- 3' 5'- CAC TGT GGC CGG GCT CTG GAC TCG-3'	57 °C	225 bp
<b>MS 2756</b>	5'- TGT TCC CAG CTG TTA GAT GAA AAT C -3' 5'- GAT CCA AAG CCT TTT ACA CTC CTC -3'	63 °C	211 bp
<b>MSR 66</b>	5'- CAA AGG CCA TCG CAG AAG ACA T-3' 5'- CCC AAC CAA AAT TCT TCA AAG CA-3'	59 °C	143 bp
<b>δ2642 Glu Deletion</b>	5'-AGG AAT GGG ACG AGG AAG A-3' 5'-AGG CCA TTG GAA AAC CTG-3'	49 °C	94 bp
<b>CCG Repeat</b>	5'-ATG GCG ACC CTG GAA AAG CTG ATG AA-3' 5'- GGC TGA GGA AGC TGA GGA GG-3'	63 °C	Abhängig von CAG & CCG Wiederholungen
<b>GRIN 2B</b>	5'-AGA CTA TTC GCT TCA TGC-3' 5'-GTG TGT TGT TCA TGG CTG-3'	47 °C	210 bp
<b>NOS 1(2)</b>	5'-ACT CCT TGA GTT TTC CTG CTG CGA TG -3' 5'-CCA TGT TCC AGT GGT TTC ATG CAC <u>AC</u> -3'	54 °C	128 bp
<b>NOS 2A</b>	5'-GCC TAC AAC TGC ATT CGT CTT -3' 5'-GCA CCC TAG CCT GTC TCA G -3'	55 °C	186 bis 221 bp
<b>NOS 3</b>	5'-AAC CCC CTC TGG CCC ACT CCC -3' 5'-TCC ATC CCA CCC AGT CAA T -3'	57 °C	200 bp
<b>nNOS</b>	5'-TTC TCA GTT TTT GGC CTC G -3' 5'-TTA CCT TGA AGA CCT TCT TGG C -3'	53 °C	180 bp
<b>iNOS</b>	5'- CTG CTG GCT TCC TGC TTT CC -3' 5'-CTC GGG TGT GGT AGG TGA CC -3'	61 °C	126 bp
<b>Promotor</b>	5'- ATT CTA CGG CAT TTA AGT ACC -3' 5'- CAC CTT CAT CGG ATC ATT ACG -3'	58 °C	294 bis 320 bp

PCR-SYSTEM	Sequenzen der Vorwärts- & Rückwärtsprimer	T <sub>M</sub> in °C	Fragmentlänge in Basenpaaren (bp)
<b>GLU R6</b>	5'-CAA CAC CTT TTC TCT AAC CCC -3' 5'-CTC GGC CAG TTT TTA CAA CTT G -3'	57 °C	140 bis 158 bp

Annealing-Temperatur (T<sub>M</sub>): primerspezifische Temperatur, bei der sich die Primer an komplementäre Sequenzen der DNA-Einzelstränge anlagern (*anneal* = anlagern)

### 2.1.9 Enzyme

Thermolase	MB Enzymes GmbH
HotStartTaq™DNAPolymerase	Qiagen
Proteinase K	Merck

Restriktionsendonukleasen:

Für alle Enzyme wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Zusätze benutzt.

- New England Biolabs (NEB): HinF1, Dra3, Btg1
- MBI Fermentas: Mbo1, Mbo2, BSR1, Nde1, Pst1, Eco27I, Hae3

### 2.1.10 Geräte & sonstige Verbrauchsmaterialien

BioPhotometer (Spektralphotometer) + Küvetten	Eppendorf
Robocycler 96 PCR-Maschine	Stratagene
Geldokumentationssysteme	Intas
Hyperfilm™ MP(Röntgenfilme)	Amersham
Mikrotiter-Platten und -Deckel	Thermowell Costar
Reagiergefäße (500µl, 1500µl, 2000µl)	Sarstedt
Filterpapier	Schleicher & Schüll

### 2.1.11 Software

Textverarbeitung	Word 2002, Microsoft
Datenverwaltung	Excel 2002, Microsoft
Primerdesign	<i>Primer-Express</i> <sup>TM</sup> 1.5a (ABI)
Statistik	SPSS 10.0
Literaturverwaltung	EndNote 6.0
Grafik	PowerPoint 2002, Microsoft CorelDraw 11, Eastman Kodak Photoshop 7.0, Adobe

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-Isolierung aus EDTA – Blut

Die Isolierung der DNA aus EDTA-Vollblutproben erfolgte nach folgendem Prinzip: Ca. 2 bis 5 ml Blut wurden aus den Proben entnommen und mit bidestillierten Wasser zur Hämolyse auf ein Volumen von 45 ml aufgefüllt. Dieses Volumen wurde anschließend für 15 min bei 3500 Upm und 4°C zentrifugiert. Die festen Blutbestandteile, u.a. auch die kernhaltigen Leukozyten wurden so sedimentiert und setzten sich als Pellet ab. Um eine Lyse der Leukozytenmembranen herbeizuführen, wurde das Pellet mit 0,1%igem NP40 versetzt und anschließend wie oben beschrieben erneut zentrifugiert. Das nun aus den Leukozytenzellkernen bestehende Sediment, wurde in 3 ml TEN (pH 8,2) aufgenommen. Unter weiterer Zugabe von 200 µl 10%igem SDS wurden die Kernmembranen lysiert. Die freigewordenen Proteine wurden durch Zugabe von 100 µl Proteinkinase K (10 mg/ml) bei 55°C über Nacht verdaut.

Am nächsten Tag wurde 1 ml gesättigte NaCl-Lösung dazugegeben, für eine Stunde bei 4°C inkubiert und danach wie oben bereits angegeben erneut zentrifugiert. Die ausgefallten Proteine setzten sich als Pellet ab. Der Überstand, in dem sich die gelöste DNA befand, wurde in 100%iges Ethanol dekantiert. Die durch den Alkohol ausgefallene und sichtbar gewordene DNA konnte nun mit Hilfe einer Pipettenspitze entnommen und in 70%iges Ethanol überführt werden. Nach anschließender Zentrifugation bei 12 000 Upm für 10 min. setzte sich ein DNA-Pellet ab, das nach vorsichtigem Verwerfen des Ethanols trocknen konnte. Das

getrocknete DNA-Pellet wurde anschließend in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht durch Inkubation bei 37°C gelöst.

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der extrahierten DNA konnte mit Hilfe eines Spektralphotometers und dazugehörigen Küvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm erfolgen. Die optische Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) ist dabei ein Maß für die DNA-Konzentration ( $DNA [ng/\mu l] = OD (260nm) \times Verdünnungsfaktor \times 50\mu g$ ) die bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) ein Maß für die Verunreinigung mit Proteinen.

Letztendlich wurden die Proben mit TE auf eine einheitliche Konzentration von 100 ng/µl verdünnt, um bei den Versuchen konstante DNA Mengen einsetzen zu können.

### 2.2.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der von (Mullis *et al.* 1986, Saiki *et al.* 1988) entwickelten Methode der PCR werden selektiv bestimmte Abschnitte der DNA exponentiell amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide, sogenannte Primer (siehe Tabelle 2.2), dienen in dieser Reaktion als Startermoleküle. Der Abschnitt, den die Primer beidseitig flankieren, wird in jedem Zyklus der Reaktion verdoppelt. Der Zyklus selber besteht aus drei Schritten:

1. Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C; hierbei wird die DNA reversibel in Einzelstränge aufgespaltet.
2. Anlagerung der Primer (*Annealing*) an komplementäre Sequenzen der DNA-Einzelstränge bei einer primerspezifischen Temperatur.
3. Synthese des komplementären DNA-Doppelstranges (Extension) bei der optimalen Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase von 72°C

Den Zyklen wird eine 5minütige Denaturierungsphase vorangestellt, um sicherzustellen, dass die gesamte eingesetzte DNA in einzelsträngiger Form vorliegt. Am Ende der PCR findet eine 5-10minütige Extensionsphase statt, damit alle PCR-Produkte vervollständigt werden können.

Die Wahl der richtigen *Annealing*temperatur ist dabei für das Ergebnis der PCR entscheidend. Wird sie zu niedrig gewählt, so treten durch unspezifische

Primerbindungen häufig Nebenprodukte auf; bei zu hohen Temperaturen hingegen ist es möglich, dass überhaupt keine Bindung des Primers an die DNA-Matrize stattfindet, und so kein PCR-Produkt entstehen kann. Die maximal zu wählenden *Annealing*temperaturen für Primer berechnen sich nach folgender Formel:

$$T_M = 4^\circ\text{C} \times (\text{G+C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{A+T})$$

$T_M$  = *Annealing*temperatur

A,T,G,C = Anzahl der jeweiligen Basen im Primer

Oberhalb der maximalen *Annealing*temperatur „schmelzen“ die Primer, eine Bindung an die DNA ist so nicht mehr gewährleistet. Die optimalen *Annealing*temperaturen müssen für jede Zielsequenz experimentell ermittelt werden.

Den Reaktionsansätzen wurde jeweils ein Tropfen Mineralöl als Verdunstungsschutz zugesetzt. Eine genaue Beschreibung der Zusammensetzung der PCR-Ansätze für die einzelnen untersuchten Systeme befindet sich in Tab. 2.3.

Für eine radioaktive PCR, die für die Systeme Promotor,  $\delta$  2642 Deletion, CCG repeat und GluR6 angewandt wurde, wird dem Ansatz zusätzlich noch 0,037MBq[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP hinzugefügt.

### 2.2.2.1 Mismatch-PCR

Für das System NOS 1(2) wurde eine *mismatch*-PCR angewandt.

*Mismatch* bedeutet in diesem Zusammenhang, dass entweder in dem *Forward*- oder in dem *Reverse*-Primer eine nicht komplementäre Base (diese ist in der Primersequenz in Tab. 2.2 fettgedruckt und unterstrichen) eingefügt wird, um eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym in das PCR-Produkt einzuführen.

In dem NOS 1(2) – System führt die Verwendung des *mismatch-Reverse*-Primers sowohl in den mutierten als auch in den normalen Allelen zu einer Generierung einer Adeninbase anstelle der eigentlichen Cytosin Base.

Ist das C-Allel vorhanden, wird das 128bp lange PCR-Fragment von Eco72I mit der Erkennungssequenz 5'- CAC<sup>^</sup>GTG –3' / 3'- GTG<sup>^</sup>CAC –5' geschnitten und es entstehen so zwei Fragmente aus 100 und 28bp. Bei Vorliegen des T-Allels bleibt das Fragment ungeschnitten.

### 2.2.2.2 Weitere PCR-Optimierung

Alle PCRs wurden auf möglichst spezifische und hohe Ausbeute optimiert. Die optimalen Bedingungen (*Annealing*temperatur, Puffer, *Taq*-Polymerase, Zykluszahl) sind abhängig von der Sequenz, insbesondere dem GC-Gehalt der Primer und des *Templates* und mussten experimentell ermittelt werden (McPherson *et al.* 1991). Bei der Zusammensetzung des Reaktionspuffers wurde vor allem die Konzentration an  $Mg^{2+}$ -Ionen variiert. Unspezifische PCR-Produkte wurden auch durch Zugabe denaturierend wirkender Agenzien (z.B. DMSO, Formamid) eliminiert (Sarkar *et al.* 1990; Henke *et al.* 1997). Die Zykluszahl wurde bei guter Ausbeute möglichst gering gehalten, da hohe Zykluszahlen die Gefahr bergen, dass anfänglich falsch eingebaute Nukleotide in weiteren Zyklen exponentiell vervielfältigt werden.

Tab. 2.3 Bedingungen der verwendeten PCR-Systeme

PCR-System	Zyklusanzahl	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Formamid	DMSO	Restriktionsenzym
<b>MTHFR 677</b>	37	2	-	-	HinF1
<b>MTHFR 1298</b>	37	2	1%	-	Mbo2
<b>CBS 68</b>	30	1	1%	-	Bsr1
<b>MS 2756</b>	35	1	-	-	Hae3
<b>MSR 66</b>	30	2	-	-	Nde1
<b>NOS 1(2)</b>	35	1	-	10%	Eco 72I
<b>NOS 2A</b>	35	3	-	-	-
<b>NOS 3</b>	30	1	1%	-	Mbo1
<b>NNOS</b>	35	2	-	-	Dra 3
<b>INOS</b>	35	1	-	-	Btg1
<b>Promotor</b>	35	1	1%	-	-
<b>δ 2642 Deletion</b>	30	1	-	-	-
<b>CCG Repeat</b>	30	1	1%	-	-
<b>GRIN 2B</b>	30	1	-	-	Pst 1
<b>GLU R6</b>	30	1	-	-	-

### 2.2.3 Verdau der PCR-Produkte mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen der Klasse 1 schneiden amplifizierte DNA-Fragmente an genau definierten Stellen. So lassen sich bekannte Punktmutationen, die eine Restriktionsschnittstelle verändern, d.h. entweder eine Schnittstelle einführen oder auch zerstören, nachweisen.

Die Bedingungen für den Reaktionsmix, die Inkubationszeit und –temperatur wurden nach den von dem Hersteller gemachten Angaben gewählt. Die jeweils benötigte Enzymmenge wurde folgendermaßen berechnet:

$$E = P \times L_R \times E_P / L_P \times E_R$$

E = einzusetzende Enzymmenge [U/μl PCR-Ansatz]

P = PCR-Produktmenge [μg DNA/μl PCR-Ansatz]

L<sub>R</sub> = Länge der λ Phagen-Referenz DNA = 48 502 bp

E<sub>P</sub> = Anzahl der Erkennungsstellen im PCR-Produkt

L<sub>P</sub> = Länge des PCR-Produktes [bp]

E<sub>R</sub> = Anzahl der Erkennungsstellen in der Referenz-DNA

Der Reaktionsmix bestehend aus Enzym, dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und H<sub>2</sub>O (ad 10 μl) wurde nach der PCR direkt unter das Mineralöl zu den Proben pipettiert. Die verwendeten Enzyme der jeweiligen Systeme finden sich in Tab. 2.3 (s.o).

### 2.2.4 Elektrophoretische Trennung von DNA

Da DNA einen Überschuss negativer Ladungen trägt, können DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufgrund ihrer Größe im elektrischen Feld getrennt werden.

Die Analyse der Restriktionslängenpolymorphismen wurde mit 2%igen Agarosegelen oder kleinen 9%igen PAA-Gelen, die Mikrosatellitenanalyse in 6%igen Polyacrylamidgelen mit 8M Harnstoff in TBE Puffer ausgeführt.

#### 2.2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in Horizontalgelkammern unterschiedlicher Größe durchgeführt. Dazu wurden 2% (w/v) Agarose mit 1x TBE-Puffer (pH 8,3) in der Mikrowelle kurz aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 60 °C in die Gelkammer gegossen.

Den PCR-Produkten wurde Ladepuffer mit Bromphenolblau und Xylencyanol zugesetzt, um eine Kontrolle über die Laufgeschwindigkeit des Gels zu haben.

Nach 30minütigem Auspolymerisieren des Agarosegels wurden die Proben aufgetragen und bei 80-200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE, als Längenstandard der pUC19-Marker, der einen Bereich von 26 bis 501 bp umfasst, verwendet. Anschließend wurde das Gel für ca. 20 Minuten mit Ethidiumbromid angefärbt. Das Ethidiumbromid dient dem späteren Sichtbarmachen der Banden, da es in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert.

Die aufgetrennten Fragmente konnten auf dem UV-Leuchttisch (260nm) sichtbar gemacht und die Ergebnisse mit Hilfe eines Geldokumentationssystems festgehalten und ausgewertet werden.

#### **2.2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Die Zusammensetzung der einzelnen Gele befindet sich im Materialteil (vgl. 2.1.4).

- **Elektrophorese von nativen Polyacrylamid-Gelen**

Analog zur Agarose-Gelelektrophorese verläuft die Elektrophorese von nicht-denaturierten DNA-Fragmenten in Polyacrylamidgelen. Diese bietet jedoch im Vergleich zur Auftrennung mit Agarose ein verbessertes Auflösungsvermögen für kürzere Fragmente, so dass bereits Längenunterschiede von einer Base detektiert werden können.

Zur PAGE wurden vertikale Gelkammern verwendet. Für die Auftrennung von Restriktionsfragmenten wurden 9%-ige PAA-Gele benutzt. Nach der Auftrennung wurden sie in Ethidiumbromidlösung angefärbt, die DNA-Fragmente durch UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis fotografisch bzw. digital dokumentiert.

- **PAGE in denaturierenden Gelen (Mikrosatelliten-Gele)**

Die radioaktiv markierten PCR-Fragmente wurden mit Ladepuffer verdünnt und nach thermischem Denaturieren (für 3 min bei 95°C) in vertikale Kammern (SQ3 Sequencer, Hoefer) auf das Gel aufgetragen (3–3,5 µl).

Die DNA-Fragmente werden unabhängig von ihrer Sequenz der Größe nach aufgetrennt. So können Längenunterschiede von nur einer oder mehreren Basen

nachgewiesen werden. Aufgrund des im Gel befindlichen Harnstoffes bleibt die DNA denaturiert, also einzelsträngig. Als Längenstandard wurde eine radioaktive Sequenzierung des Bakteriophagen M13 oder eine DNA-Probe bereits bekannter Länge wendet. Die Gelelektrophorese erfolgte für 2,5 bis 5 Stunden bei 55 Watt und Raumtemperatur. Als Laufpuffer diente 1x TBE (pH 8,0).

Anschließend wurden die Gele auf Filterpapier übertragen und bei 80°C in Vakuum-Trocknern (Bio-Rad Modell 583) getrocknet. Das Ergebnis wurde durch Autoradiographie auf Röntgenfilmen dokumentiert. Alternativ wurde das Ergebnis mit einem Phospho-Imager (Stormscanner 860, Molecular Dynamics) eingescannt und mittels entsprechender Software (Image Quant 5.1, Molecular Dynamics) in digitaler Form analysiert und festgehalten.

### **2.2.5 Fragmentlängenanalyse mit Kapillarsequenzier**

Prinzipiell ähnlich wie die Mikrosatellitengele verläuft die Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarsequenzier (Beckman Coulter CEQ 8000). Hier werden die Proben allerdings nicht radioaktiv markiert, sondern durch fluoreszierende Primer sichtbar gemacht, die über Laser detektiert werden. Außerdem entfällt ein Auftragen der Proben auf ein Gel, da die Kapillaren des Sequenziers direkt in die Proben in einer Mikrotiterplatte eingeführt werden, und die Auswertung der Ergebnisse mittels Beckman-Software digital vorgenommen wird.

Nachdem eine PCR mit HotStartTaq unter Zusatz von 1,5 pmol 5-FAM pro Ansatz durchgeführt wurde (initiale Denaturierung bei 95°C über 15 min., 35 Zyklen à 45 sec bei 94°C, 55°C und 72°C, finale Extension bei 72°C für 10min), wurden 0,1µl des jeweiligen PCR-Produktes mit 0,5 µl D4-Marker-Längenmarker und 40 µl SLS-Puffer versetzt, und die Proben in den Kapillarsequenzier gegeben. Die Analyse im Kapillarsequenzier erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Die Kapillartemperatur wurde auf 50°C festgelegt, die Denaturierung erfolgte bei 90°C für 120 sec, die Separation fand bei einer Spannung von 4,8kV für 40 min statt.

### 2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 10.0 (SPSS, München). Aufgrund der nichtnormalverteilten Daten wurden Box-and-Whisker-Diagramme (kurz auch Boxplot-Diagramme genannt) zur graphischen Analyse verwendet. Innerhalb eines solchen Diagramms markiert die Box den Bereich der 25.-75. Perzentile, wobei der Median (50. Perzentile) durch die horizontal verlaufende Strichmarkierung symbolisiert wird. Die 5.-95. Perzentile, auch als Interquantilbereich bezeichnet, wird durch vertikale, aus der Box reichende Marker dargestellt. Sogenannte Ausreißer in einem solchen Diagramm stellen Werte dar, die zwischen 1,5 und 3 Boxenlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt liegen. Sie werden durch einen Kreis mit einer dem Patienten zugewiesenen Nummer gekennzeichnet. Die \*-Zeichen stehen für Extremwerte. Diese sind Fälle mit Werten, die mehr als 3 Balkenlängen von der oberen oder unteren Kante des Balkens entfernt sind (siehe Ergebnissteil dieser Arbeit). Die Genotypen in den Boxplot-Diagrammen wurden codiert wiedergegeben. 101 stellt den Wildtyp, 202 eine homozygote Form des untersuchten Polymorphismus dar. 102 gibt den heterozygoten Genotyp wieder. Die Berechnungen wurde meistens mit dem allgemeinen Erkrankungsalter durchgeführt. Wurde nur mit dem motorischen oder psychiatrischen / psychologischen Erkrankungsbeginn gerechnet, wurde dies explizit angegeben. Die Analyse der verschiedenen Messparameter wurde wie folgt durchgeführt: Zur Untersuchung des Zusammenhanges der *CAG-Repeats* mit dem Manifestationsalter wurde der Spearman-Rho-Test für nicht-parametrische Korrelationen verwendet. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,01$  festgelegt.

Als Signifikanztest für die Korrelation zwischen dem Erkrankungsalter und dem Auftreten der verschiedenen Allele wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test (MWU) angewendet. Hierbei wurde als maximale Irrtumswahrscheinlichkeit ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Ist das Ergebnis des Tests, das als p-Wert angegeben wird, kleiner als das zuvor festgelegte Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ), liegt eine statistische Signifikanz zum Niveau  $\alpha$  vor.

Mit der linearen bzw. multiplen linearen Regressionsanalyse ( $R^2$ ) wurde die Varianz des Manifestationsalters berechnet, welche auf die CAG-Wiederholungen

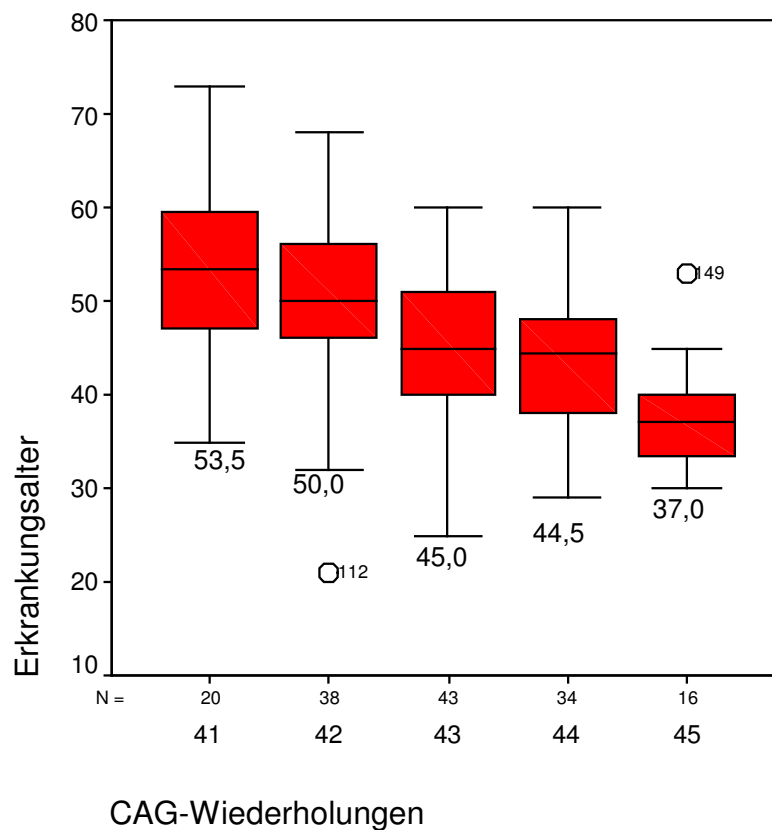
des expandierten *Htt*-Gens allein wie auch in Kombination mit den unterschiedlichen untersuchten Polymorphismen zurückzuführen ist.  $\Delta R^2$  gibt die relative Verbesserung des Regressions-Modells an, wenn die Genotypen der einzelnen Polymorphismen zu den CAG-Wiederholungen addiert werden. Die Prozente unerklärter Varianz zeigen die zusätzlichen Prozent an, welche nicht durch die CAG-Wiederholungen verursacht werden, sondern durch den jeweiligen modifizierenden Polymorphismus. Eine statistische Signifikanz liegt definitionsgemäß bei einem p-Wert von  $p < 0,01$  vor. Auch eine Interaktion von zwei Allelen kann durch die Regressionsanalyse mittels Multiplikation der Werte der beiden Allele nachgewiesen werden.

Analytisch genutzt wurde außerdem eine deskriptive Statistik, mit dem Median, dem Mittelwert, der Standardabweichung und der Anzahl der Fälle. Differenzen in den Frequenzen der Vergleichspopulationen wurden mit dem  $\chi^2$ -Test auf statistische Signifikanz ( $p < 0,001$ ) überprüft.

## 3. Ergebnisse

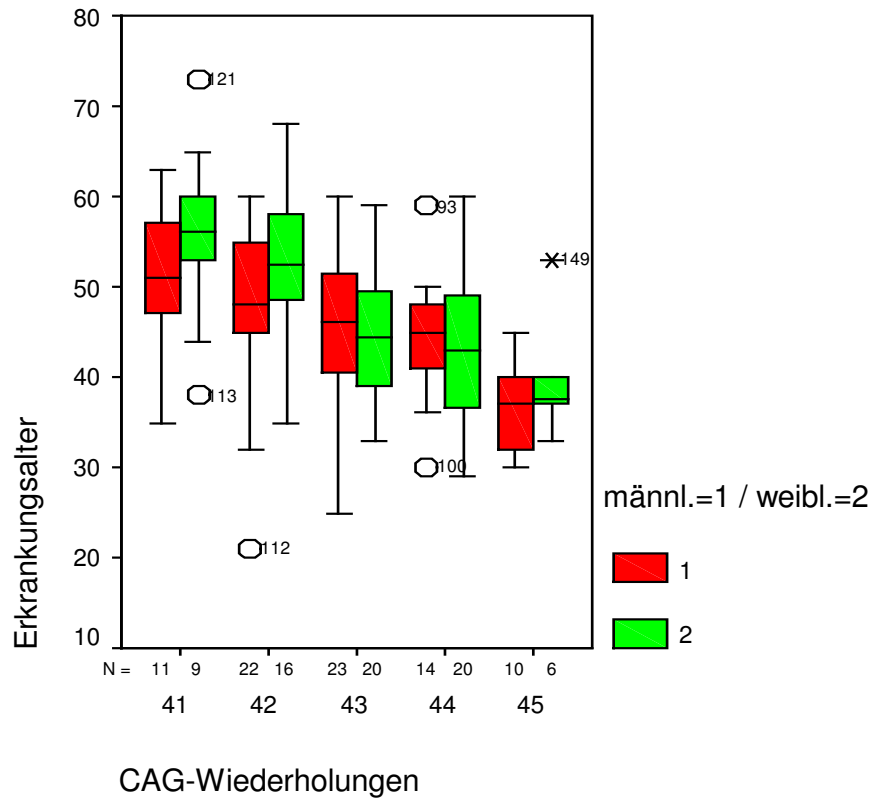
### 3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Insgesamt wurden 151 MH-Patienten untersucht. Davon waren 80 männlichen (53%) und 71 weiblichen (47%) Geschlechts. Die Kontrollgruppe bestand aus 111 gesunden Personen (55 Männer (49,5%) und 56 Frauen (50,5%)). Das mittlere Erkrankungsalter der MH-Patienten betrug 46,17 Jahre (Standardabweichung (SA) 9,052). Der Mittelwert (MW) der CAG-Wiederholungen lag bei 42,92 Wiederholungen mit einer SA von 1,197. Der früheste Erkrankungsbeginn lag bei 21 Jahren, der späteste bei 73 Jahren (s. Abb.3.1 und Abb.3.2).



**Abb.3.1** Erkrankungsalter in Abhängigkeit von den CAG-Wiederholungen

Auf der x-Achse sind die expandierten CAG-Wiederholungen, auf der y-Achse das Erkrankungsalter angegeben. Zusätzlich befindet sich die Personenanzahl (N) unterhalb der x-Achse. Die Zahlenwerte unterhalb der jeweiligen Boxplot-Boxen geben den Median, der auch durch die waagerechten Markierungen innerhalb einer Box gekennzeichnet wird, an. Zwei Patienten mit den Nummer 112 und 149 sind sog. Ausreißer.

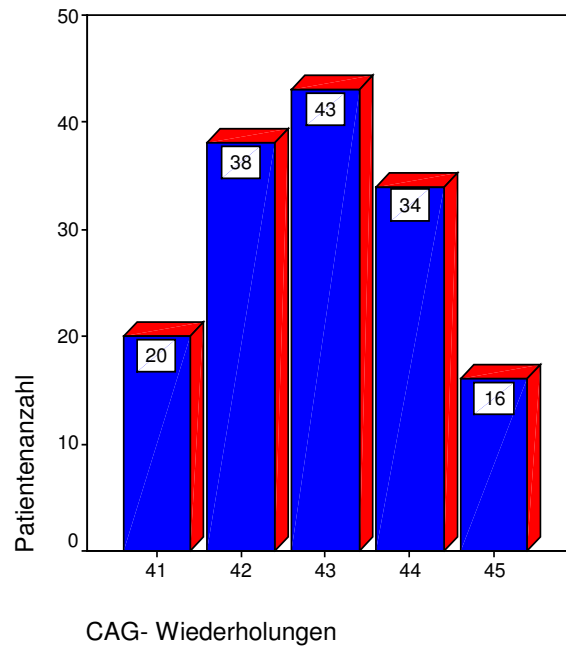


**Abb.3.2** Erkrankungsalter in Abhängigkeit von den CAG-Wiederholungen aufgetrennt nach Geschlechtern

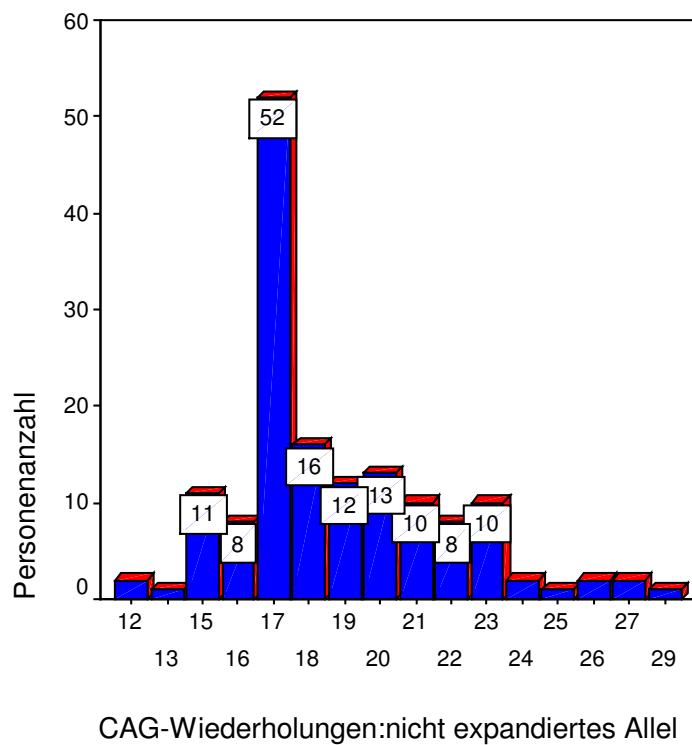
Die Patienten 93, 100, 112, 113 und 121 stellen Ausreißer, Patient Nr.149 einen Extremwert dar. Die Zahl 1 (= rote Box) kodiert für die männlichen Patienten, die Zahl 2 (= grüne Box) für die weiblichen Patientinnen.

Diese beiden Boxplot-Diagramme spiegeln die inverse Korrelation zwischen Erkrankungsalter und CAG-Repeatzahl wider. Mit steigender Repeatzahl tritt die Erkrankung im Mittel früher ein. Die in Abbildung 3.1 aufgeführten Zahlenwerte stellen den jeweiligen Median dar. Die statistische Korrelation durch den Spearman-Rho-Test für nicht parametrische Korrelationen zwischen den expandierten CAG-Wiederholungen und dem Manifestationsalter ergab eine Signifikanz von  $R = -0,470$  und  $p = 0,01$ . Auch der  $\chi^2$  Test zeigte einen signifikanten p-Wert mit  $p = 0,001$ . Die lineare Regression (s. Tab. 3.1 und 2) ergab, dass die Anzahl der expandierten CAG-Wiederholungen für 27,6% der Varianz des Erkrankungsalters verantwortlich sind ( $p = 0,0001$ ). Keinen Einfluss auf das Erkrankungsalter haben die CAG-Wiederholungen auf dem nicht expandierten Allel ( $p = 0,921$ ). Weiterhin zeigt sich innerhalb der jeweiligen CAG-Gruppen eine große Spannweite im Erkrankungsalter. So erkrankten MH-

Patienten mit beispielsweise 41 CAG-Wiederholungen zwischen dem 35. und 73. Lebensjahr.



**Abb. 3.3** Patientenzahl (y-Achse) mit den jeweiligen CAG-Wiederholungen (x-Achse) auf dem expandierten Allel (41 bis 45 Wiederholungen)



**Abb. 3.4** Personenanzahl mit den jeweiligen CAG-Wiederholungen auf dem nicht-expandierten Allel (12 bis 29 Wiederholungen)

Die Balkendiagramme Abb.3.3 und 3.4 geben die Häufigkeitsverteilung der jeweiligen CAG-Wiederholungen wieder. Im ersten Diagramm (Abb.3.3) sind die Häufigkeiten des expandierten Allels gezeigt. Die meisten MH-Patienten (43 Personen (28,48%)) weisen 43 CAG-*Repeats* auf.

Abb.3.4 zeigt die CAG-Wiederholungen des nicht expandierten Allels. Hier kommt am häufigsten, nämlich bei 53 der 151 Patienten (35,1%), eine *Repeatzahl* von 17 vor. Insgesamt zeigt sich eine Spannweite von 12 bis 29 CAG-Wiederholungen, wobei die meisten Patienten (92,72%) eine *Repeatzahl* zwischen 15 bis 23 aufweisen.

Die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 zusammengefasst.

Tab.3.1

Modell (berechnet mit allgemeinem Erkrankungsalter)	R <sup>2</sup>	Δ R <sup>2</sup>	% unerklärter Varianz	p-Wert
HD CAG	0,212	-	-	<b>0,0001</b>
HD CAG + CAG normales Allel	0,216	0,004	0,51	0,409
HD CAG x CAG normales Allel (Interaktion)	0,216	0,004	0,51	0,401

Tab.3.2

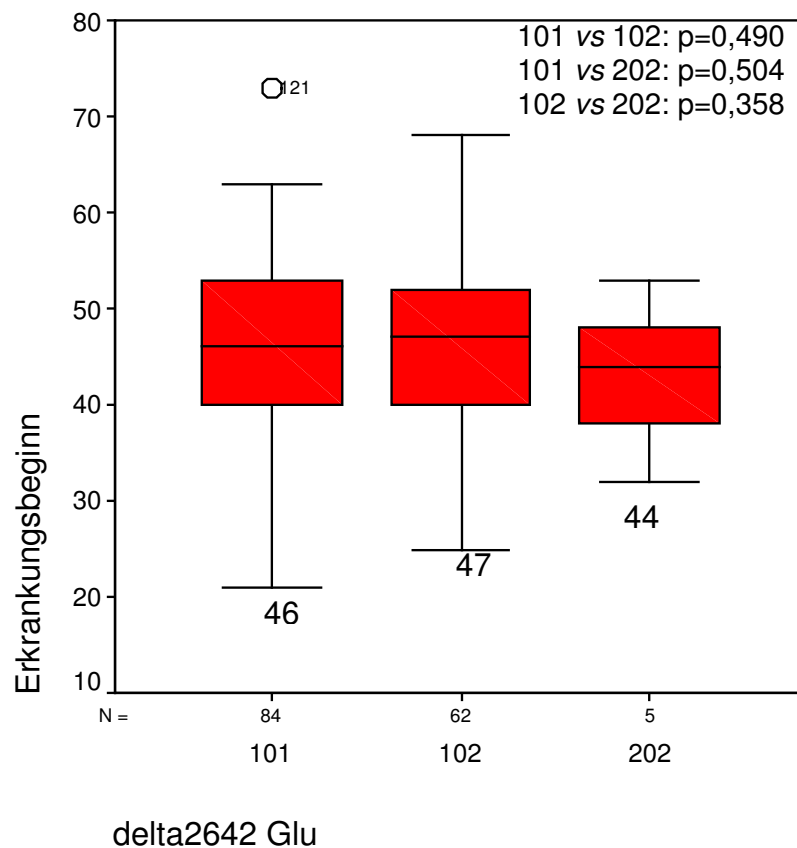
Modell (berechnet mit motorischem Erkrankungsalter)	R <sup>2</sup>	Δ R <sup>2</sup>	% unerklärter Varianz	p-Wert
HD CAG	0,276	-	-	<b>0,0001</b>
HD CAG + CAG normales Allel	0,276	-	-	0,905
HD CAG x CAG normales Allel (Interaktion)	0,276	-	-	0,921

Die Ergebnisse in den Tab. 3.1 und 3.2 zeigen, dass die CAG-Wiederholungen für 21,2% bzw. 27,6% in der Varianz für das Erkrankungsalter verantwortlich sind ( $p=0,0001$ ). Die CAG-Wiederholungen auf dem nicht expandierten Allel haben keinen Einfluss auf das Manifestationsalter ( $p=0,409$  bzw.  $p=0,905$ ). Auch eine Interaktion zwischen den beiden Allelen kann statistisch ausgeschlossen werden ( $p=0,401$  bzw.  $p=0,921$ ).

### 3.2.0 Polymorphismen im *MH*-Gen

#### 3.2.1 $\Delta 2642$ -Deletion

Die Deletion von 3bp (GAG) an Kodonposition 2642, die für die AS Glutamat (Glu) kodieren, befindet sich im *Htt*-Gen. Das Insertions-Allel codiert für vier Glutamat-AS (Wildtyp), die am Kodon 2642 beginnen. Das Deletions-Allel codiert folglich nur für 3 Glutamat-Reste. Dieser Polymorphismus wurde radioaktiv mittels Mikrosatellitengel untersucht.



**Abb.3.6** Erkrankungsbeginn in Abhängigkeit vom  $\Delta 2642$ -Genotyp

101 kodiert den Genotyp 4 Glu / 4 Glu (Wildtyp)

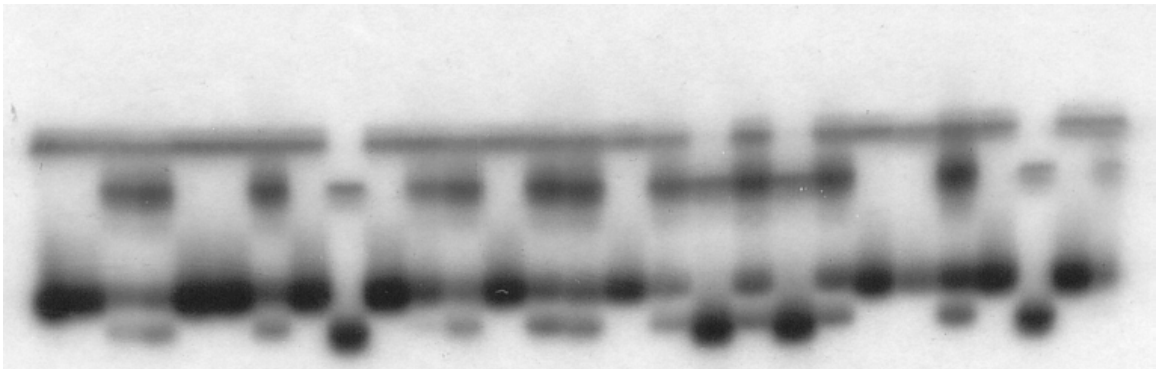
102 kodiert den Genotyp 4 Glu / 3 Glu

202 kodiert den Genotyp 3 Glu / 3 Glu

Im rechten oberen Anteil der Abbildung befinden sich die jeweiligen errechneten p-Werte.

Patient 121 ist ein Ausreißer.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28



**Abb.3.5 Ausschnitt aus einem Mikrosatellitengel zur Analyse der  $\Delta 2642$ -Deletion**

Die Proben der Spuren 1, 2, 5, 6, 8, 10, 13, 16, 22, 23, 25 sowie 27 stammen von Probanden, die homozygot (WT) sind und keine Deletion an Position 2642 tragen. Die Spuren 3, 4, 7, 11, 12, 14, 15, 17, 19, 21, 24 und 28 enthalten Proben von heterozygoten Individuen. Die Spuren 9, 18, 20 und 26 zeigen die homozygote Form der 2642-Deletion.

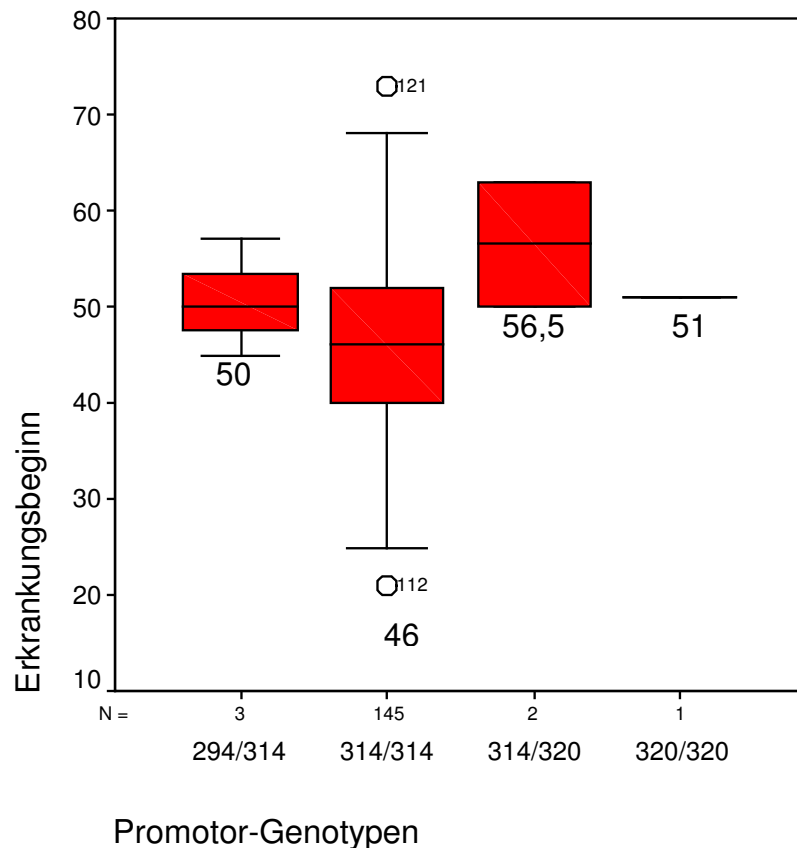
Das Ergebnis der statistischen Auswertung erwies sich als nicht signifikant. Es konnten keine wesentlichen statistischen Unterschiede bei Vergleich der Erkrankungsalter der einzelnen Genotypengruppen gefunden werden (s.o. p-Werte  $> 0,05$ ). Die geschlechtsspezifische Genotypenaufteilung wird durch die Tabelle 3.3 wiedergegeben.

**Tab.3.3**

$\Delta 2642$ Glu	101 (4 Glu / 4 Glu)	102 (4 Glu / 3 Glu)	202 (3 Glu / 3 Glu)	Gesamt
<b>Männer</b>	43	36	1	80
<b>Frauen</b>	41	26	4	71
<b>Gesamt</b>	84 (55,63%)	62 (41,06%)	5 (3,31%)	151

### 3.2.2 Promotor

Ein polymorpher 20bp und 6bp *Repeat* liegt in der Promotorregion des *Htt*-Gens und wurde radioaktiv mittels Mikrosatellitengel untersucht. Die verschiedenen Genotypen wurden ausgehend von den durch PCR bestimmten Fragmentlängen benannt.



**Abb.3.7** Erkrankungsbeginn in Abhängigkeit von den Promotor-Genotypen

294 = Allel mit einem 20bp und einem 6bp Motiv

314 = Allel mit 2fachem 20bp und einem 6bp Motiv

320 = Allel mit 2fachem 20bp und 2fachem 6bp Motiv

Ausreißer stellen die Patienten 121 und 112 da.

Die Mehrzahl der Patienten (145 Personen = 96,03%) weist den Genotyp 314/314 auf. Das bedeutet, dass sie auf jedem Allel eine 2fache Ausfertigung des 20bp Motivs und eine 1fache Ausfertigung des 6bp Motivs tragen. Der Median des Erkrankungsalters liegt in dieser Gruppe bei 46 Jahren. 3 Patienten haben den Genotyp 294/314. Bei ihnen befindet sich auf einem Allel nur ein 20bp sowie ein 6bp Motiv. Der Median beträgt 50 Jahre. 2 Patienten (314/320) weisen auf einem Allel 2 mal das 20bp Motiv als auch 2 mal das 6bp Motiv auf. Nur ein Patient (320/320) trägt die zuletzt genannte Konstellation auf beiden Allelen.

Tab.3.4

Promotor	294/314	314/314	314/320	320/320	Gesamt
Männer	1	77	1	1	80
Frauen	2	68	1	-	71
Gesamt	3 (1,99%)	145 (96,03%)	2 (1,32%)	1 (0,66%)	151

Aufgrund der geringen Personenanzahl in den Genotyp-Gruppen 294/314, 314/320 und 320/320 konnte keine sinnvolle statistische Auswertung erfolgen.

### 3.2.3 CCG-Repeat

Der CCG-Repeat liegt in der 5'Region des *Htt*-Gens 13bp stromabwärts des krankheitsverursachenden CAG-Repeats. CCG kodiert für die AS Prolin. Die angegebenen Primerpaare wurden so konstruiert, dass sie sowohl den CAG- als auch den CCG-Repeat umschlossen (s.u. Abb.3.8).

```

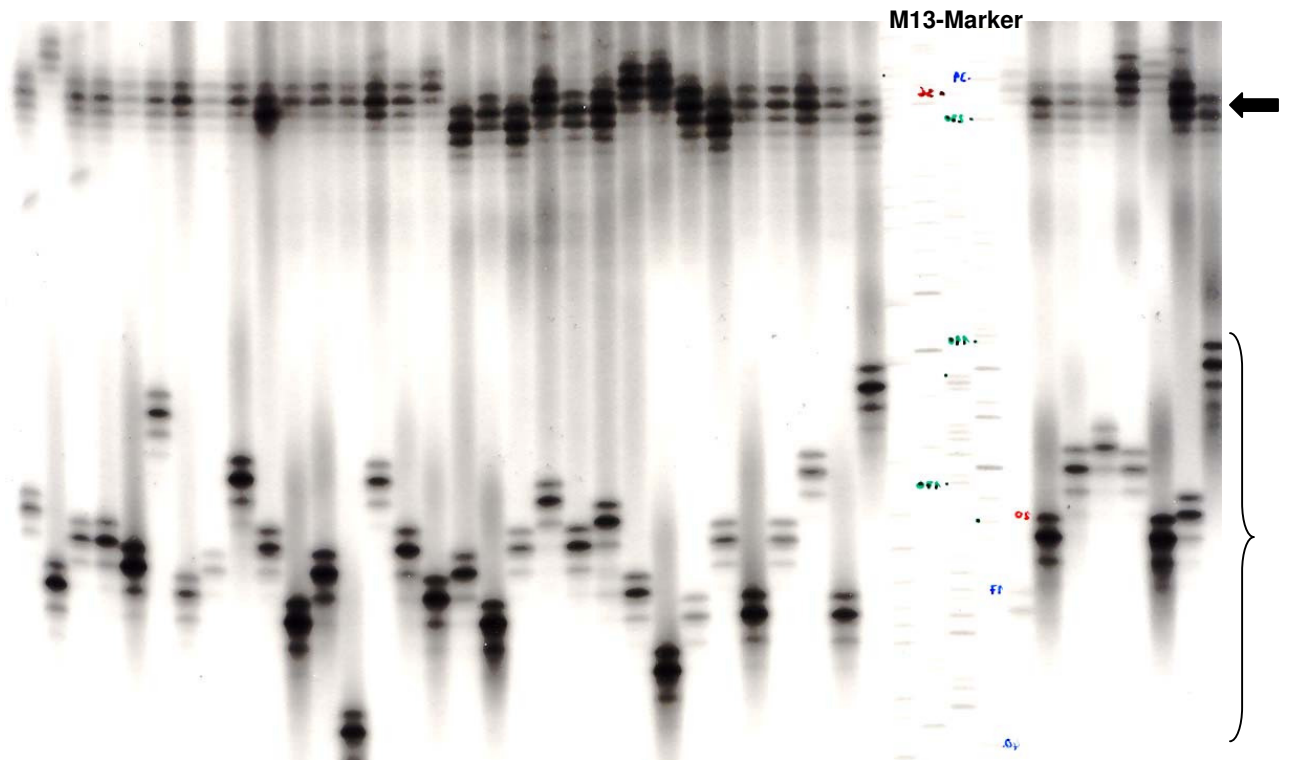
317 atgg cgaccctgga aaagctgatg aaaggccttcg agtcctcaa gtccttcag cagcagcagc agcagcagca
391 gcagcagcagc cagcagcagc agcagcagca gcaacagccg ccaccgccgc cgccgccgcc gccgcctcct
461 cagcttcctc agcc

```

**Abb.3.8 Ausschnitt aus Exon 1 des *Htt*-Gens mit 18 CAG und 7 CCG-Repeats**

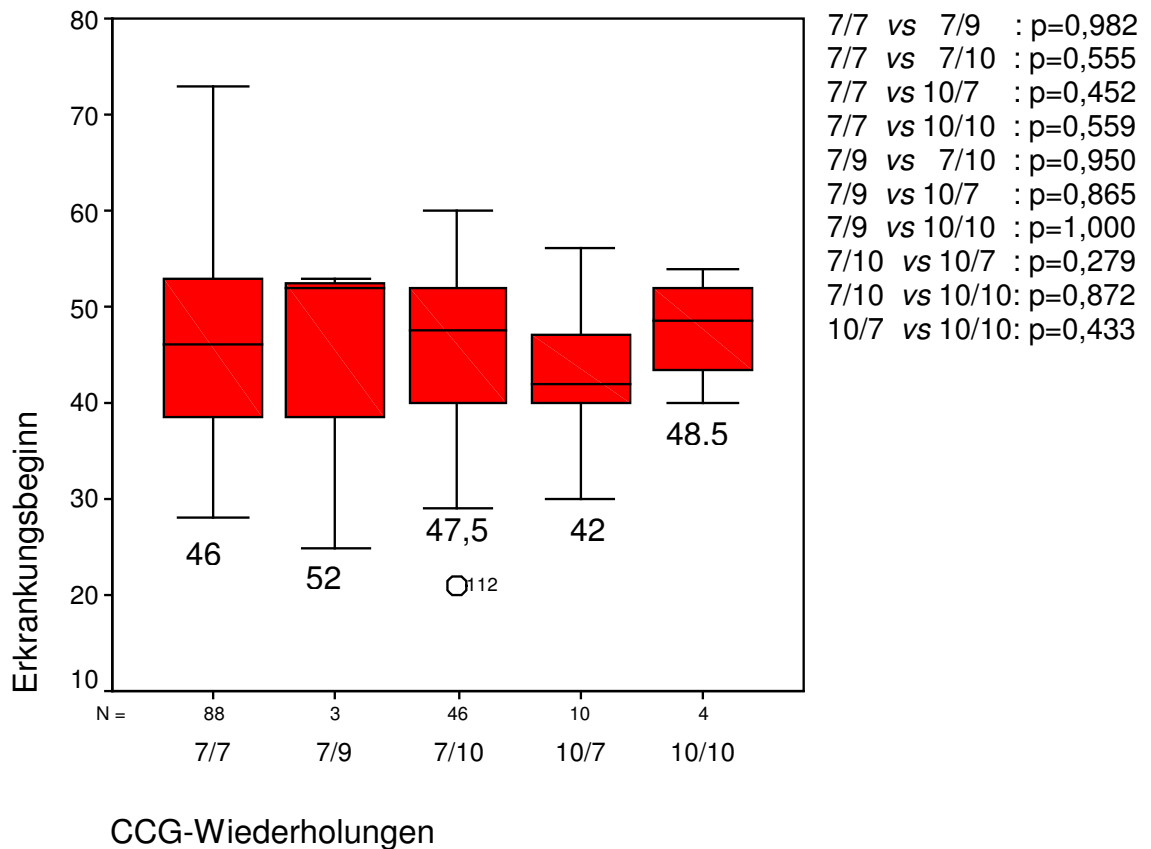
Die Abb. zeigt einen 157bp umfassenden DNA-Abschnitt aus Exon 1 des *Htt*-Gens. Die rot markierten Basen kennzeichnen den *Forward*-Primer, die blau markierten den *Reverse*-Primer. Fett in schwarz gekennzeichnet sind 18 CAG-Wiederholungen. Kursiv und unterstrichen sind 7 CCG-Wiederholungen. Die Zahlen am Anfang beschreiben die Position der ersten Base in der jeweiligen Zeile.

Zur Untersuchung wurden wiederum sogenannte Mikrosatellitengele verwendet. Die Längen der DNA-Fragmente wurden durch Vergleich mit dem M13 Längenmarker bestimmt. Die Bestimmung der Länge des CCG-Repeats erfolgte in Kenntnis der CAG-Repeatanzahl, die zuvor in einer das CCG-Repeat ausschließenden PCR bestimmt worden war.



**Abb.3.9** Ausschnitt aus einem sog. Mikrosatellitengel zur Untersuchung des CCG-*Repeats* im *Htt*-Gen

Im oberen Teil des Gels (siehe schwarzer Pfeil) sind die CCG-Wiederholungen auf dem expandiertem Htt-Allel mit Hilfe des M13-Markers abzulesen. Im mittleren bzw. unteren Teil des Gels (s. geschweifte Klammer) sind die CCG-Wiederholungen auf dem nicht expandierten Allel zu finden.



**Abb.3.10 Erkrankungsalter in Abhängigkeit von den CCG-Wiederholungen**

Die Abb. zeigt die gefundenen 5 verschiedenen Genotyp-Gruppen des CCG-*Repeats*. Hierbei beschreibt die CCG-Wiederholungszahl, welche sich an erster Stelle befindet (7 oder 10), die CCG-Wiederholungen auf dem CAG-expandierten Allel.

7/7 = 7 CCG-Wiederholungen expandiertes Allel / 7 CCG nicht expandiertes Allel

7/9 = 7 CCG-Wiederholungen expandiertes Allel / 9 CCG nicht expandiertes Allel

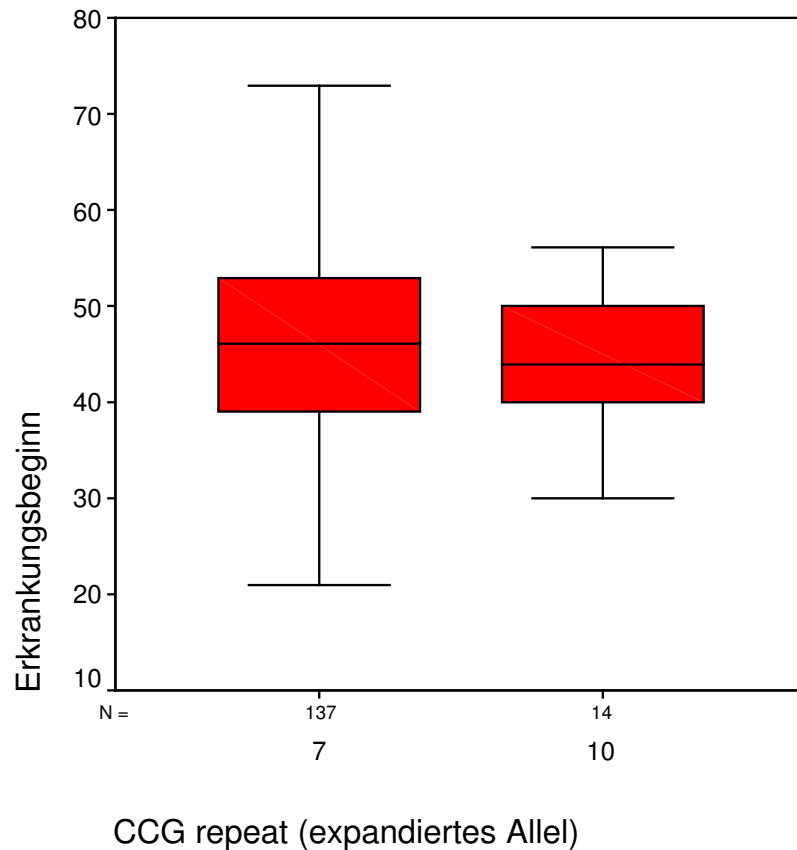
7/10 = 7 CCG-Wiederholungen expandiertes Allel / 10 CCG nicht expandiertes Allel

10/7 = 10 CCG-Wiederholungen expandiertes Allel / 7 CCG nicht expandiertes Allel

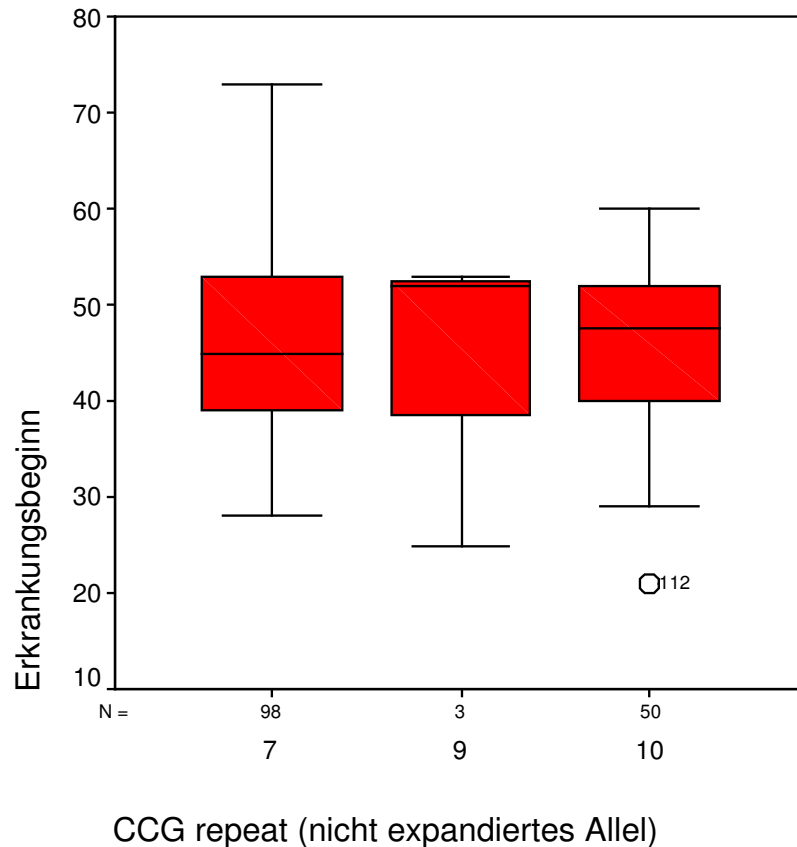
10/10= 10 CCG-Wiederholungen expandiertes Allel / 10 CCG nicht expandiertes Allel

Mehr als die Hälfte der MH-Patienten, nämlich 88 Personen (58,3%), weisen den Genotyp 7/7 auf. Das bedeutet, dass sowohl auf dem CAG expandierten als auch auf dem nicht expandierten Allel jeweils 7 CCG-Wiederholungen zu finden sind. 46 Patienten (30,5%) tragen auf dem expandierten Allel 7, auf dem nicht expandierten Allel jedoch 10 CCG-Wiederholungen und haben so den Genotyp 7/10. Des weiteren finden sich noch 3 Patienten (2%), die den Genotyp 7/9 mit 7 *Repeats* auf dem expandierten und 9 *Repeats* auf dem nicht expandierten Allel aufweisen (s. Abb. 3.10). Insgesamt kommen 7 CCG-*Repeats* auf dem expandierten *Htt*-Gen mit 90,7 % (137 Personen) am häufigsten vor.

10 CCG-Wiederholungen sind auf dem expandierten Allel bei 14 Patienten (9,3%) zu finden, wobei 4 (2,6%) der 14 Patienten auch auf dem nicht expandierten Allel 10 CCG-Wiederholungen tragen und so den Genotyp 10/10 haben (s. Abb. 3.11). Mit 64,9% (98 Patienten) kommen 7 CCG-*Repeats* auch auf dem nicht expandierten Allel am häufigsten, gefolgt von 10 *Repeats* bei 33,1% (50 Personen) und 9 *Repeats* bei 2% (3 Patienten) vor (s. Abb. 3.12).



**Abb.3.11** Die Abb. zeigt den Erkrankungsbeginn von 151 Patienten in Abhängigkeit von den CCG-Wiederholungen auf dem expandierten Allel.



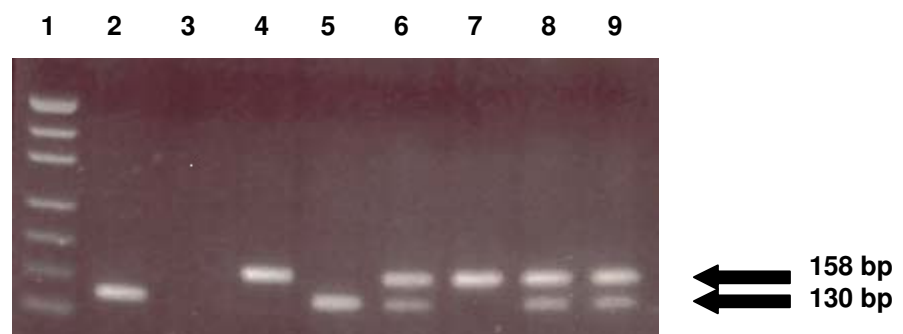
**Abb.3.12** Die Abb. zeigt den Erkrankungsbeginn von 151 Patienten in Abhängigkeit von den CCG-Wiederholungen auf dem nicht expandierten Allel.

Vergleicht man auf dem CAG-expandierten Allel das Allel, welches 7 CCG-Wiederholungen trägt, mit dem das 10 *Repeats* hat, so (s.Abb.3.11), lässt sich bei statistischer Analyse kein deutlich unterschiedlicher Einfluß der CCG-*Repeats* auf das Manifestationsalter der beiden Gruppen finden ( $p > 0,05$ ). Auch bei Betrachtung des nicht CAG expandierten Allels lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der jeweiligen Allelträger (7, 9 und 10 CCG-Wiederholungen) aufzeigen.

### 3.3 Ergebnisse zur Untersuchung der Polymorphismen der Enzyme im Homocysteinestoffwechsel

#### 3.3.1 *MTHFR* 677 C>T

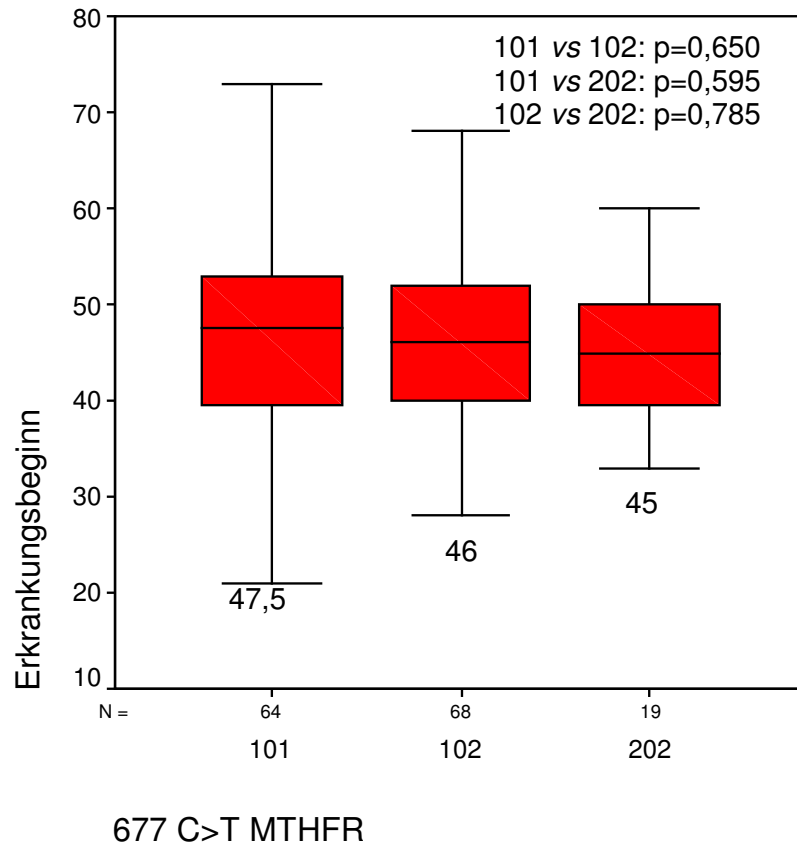
Der Basenaustausch C>T an Position c.677 in Exon 4 des *MTHFR*-Gens, welcher auf AS-Ebene zu einem Austausch von Alanin zu Valin führt, lässt sich durch Restriktionsverdau mit Hinf1 nachweisen. Sofern das durch PCR amplifizierte 158bp lange Fragment den Basenaustausch C>T aufweist, so wird es in zwei Fragmente (130bp und 28bp) gespalten. Die Verdauprodukte wurden durch Elektrophorese in einem 2%igen Agarosegel bei 200V aufgetrennt. Die anschließende Färbung erfolgte mittels Ethidiumbromid. Ein repräsentatives Beispiel für die Analyse des *MTHFR* 677C>T-Genotyps zeigt Abb.3.13.



**Abb.3.13** Ausschnitt aus einem Agarosegel zur Untersuchung des 677 C>T *MTHFR*-Polymorphismus

Spur 1 enthält den pUC 19 Längenmarker. Die Spuren 2 und 5 enthalten DNA-Proben von Patienten, die homozygot für das Wildtyp-Allel (C/C) sind. Die Patienten 6, 8 und 9 sind heterozygot (C/T). Homozygot für das T-Allel des 677 *MTHFR*-Polymorphismus sind Patient 4 und 7. Die Probe von Patient 3 ist ausgefallen.

Wie Abb.3.14 zeigt, besteht das Patientenkollektiv aus 64 Patienten (42,4%) mit dem *MTHFR*-Genotyp CC (Wildtyp). 68 Patienten (45,0%) sind heterozygot (CT) und 19 Patienten (12,6%) homozygot. Die statistische Auswertung zeigte keinerlei signifikante Unterschiede in der Genotypverteilung und dem Manifestationsalter des MH zwischen den drei Genotyp-Gruppen.



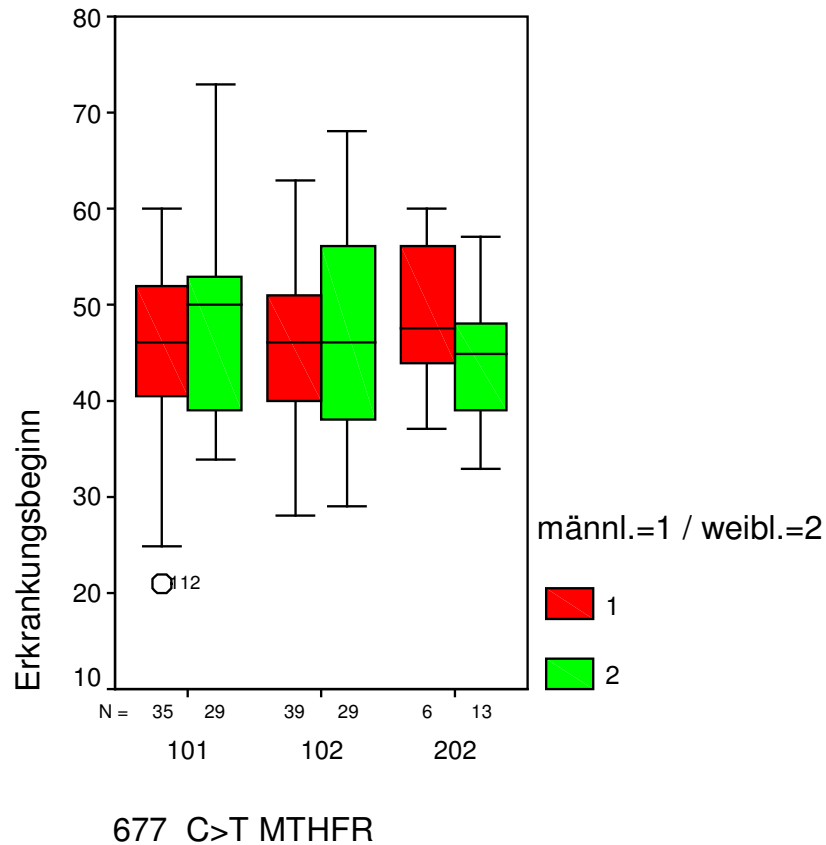
**Abb.3.14 Erkrankungsbeginn in Abhängigkeit vom 677 C>T MTHFR-Genotyp**

Das Boxplot-Diagramm zeigt, dass 64 Patienten homozygot für den Genotyp 101 (= CC) sind. 68 Patienten sind heterozygot (102 bzw. CT) und 19 Patienten sind homozygot für das seltenere T-Allel (= 202). Der Median des Erkrankungsalters für die Patienten, die homozygot für das C-Allel sind, liegt bei 47,5 Jahren. Der Median der Heterozygoten (CT) beträgt 46 und der der T-Homozygoten 45 Jahre. Die p-Werte (s.o. rechts in der Abb.) sind alle größer als 0,05. Somit zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

**Tab. 3.5 MTHFR 677 C>T Genotypenverteilung**

Genotyp	101 (CC)	102 (CT)	202 (TT)	Gesamt
Männer	35	39	6	80
Frauen	29	29	13	71
Gesamt	64 (42,4%)	68 (45,0%)	19 (12,6%)	151

Die Allelfrequenz für das C-Allel beträgt 0,64 und für das T-Allel 0,35. Auch bei Betrachtung der Genotypenverteilung nach Geschlecht (Tab. 3.5 & Abb. 3.15) ergaben sich keine auffälligen Unterschiede.



**Abb. 3.15** Erkrankungsbeginn in Abhängigkeit von den MTHFR-Genotypen aufgetrennt nach Geschlecht.

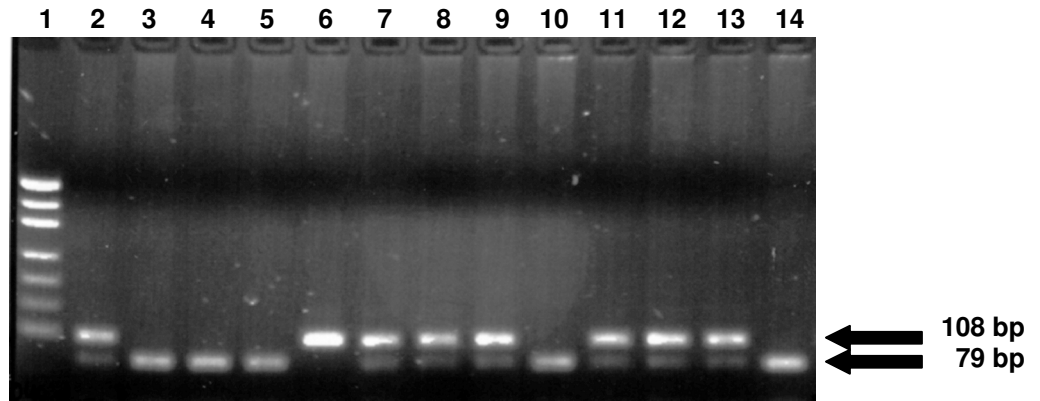
101 = C/C; 102 = C/T; 202 = T/T

1 = rote Box = männliche Patienten; 2 = grüne Box = weibliche Patienten

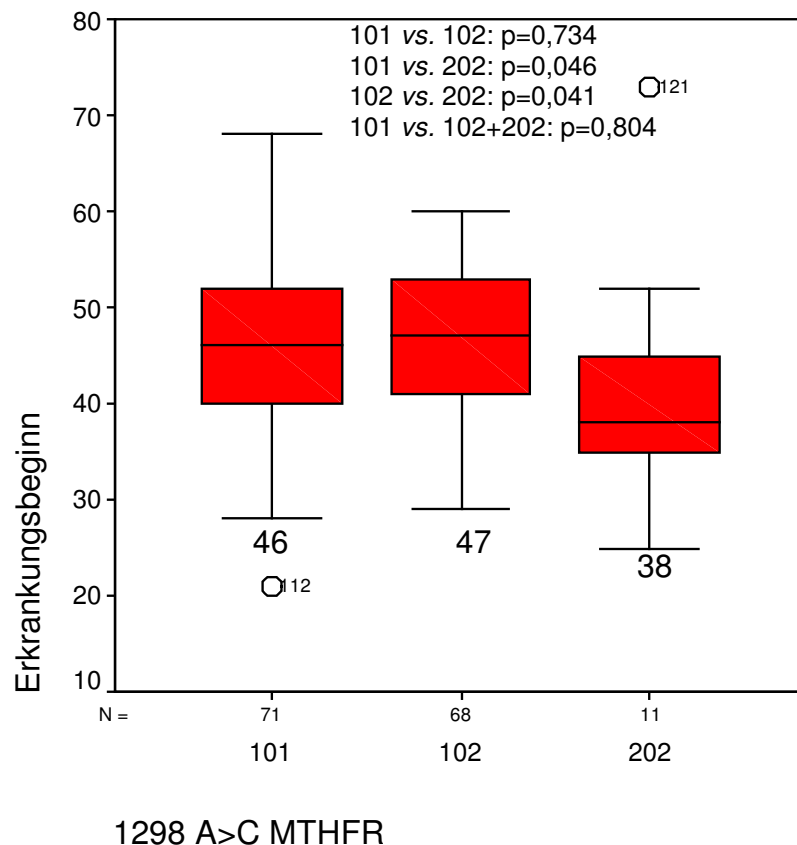
### 3.3.2 MTHFR 1298 A>C

#### 3.3.2.1 MTHFR 1298 MH-Patienten

Ein weiterer Polymorphismus im *MTHFR*-Gen, der an Position 1298A>C in Exon 7 zu finden ist, bewirkt einen AS-Austausch von Glutamat zu Alanin in der potenziell regulatorischen Domäne. Durch das C-Allel wird eine von zwei *Mbol*I-Schnittstellen im 145 bp großen PCR-Produkt zerstört, so dass statt drei Fragmenten (79bp, 37bp und 29bp) zwei Fragmente (108bp und 37bp) entstehen. Die verdauten PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines 2%igen Agarosegels aufgetrennt und anschließend wieder mit Ethidiumbromid gefärbt.



**Abb.3.16** Ausschnitt aus einem Agarosegel zur Untersuchung des 1298 *MTHFR* Polymorphismus. Die erste Spur enthält den pUC 19 Längenmarker. Die Spuren 3, 4, 5, 10 und 14 enthalten Proben von Patienten, die homozygot für das Wildtyp-Allel (A/A) sind. Die Patienten 2, 7, 8, 9, 11, 12 und 13 sind heterozygot (A/C). Homozygot für das C-Allel des 1298 *MTHFR*-Polymorphismus ist Patient 6. Zur eindeutigen Genotypisierung reicht es in diesem Fall aus, die beiden Banden mit längeren Fragmenten (108 und 79 bp) zur Auswertung heranzuziehen. Die Banden mit kürzeren Fragmenten (37 und 29 bp) sind nicht in der Abb. gezeigt.



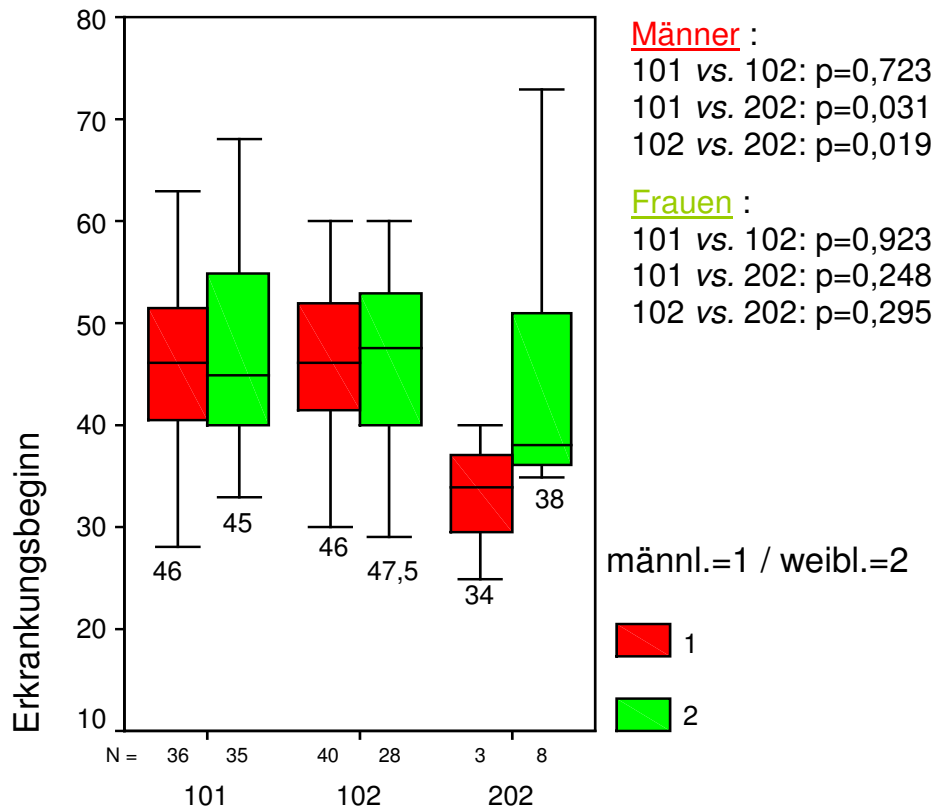
**Abb.3.17** Erkrankungsbeginn in Abhängigkeit vom 1298 A>C *MTHFR*-Genotyp  
 101 = A/A; 102 = A/C, 202 = C/C

Faßt man die Heterozygoten (102) mit den Homozygoten für das seltenere Allel (202) zusammen und berechnet erneut  $p$ , so ergibt sich ein  $p$ -Wert von 0,804. Der Median liegt dann sowohl in der 101 Gruppe als auch in der zusammengefassten Gruppe (102 + 202) bei 46 Jahren.

Ohne die beiden Ausreißer (112 und 121) ergibt sich ein noch signifikanterer  $p$ -Wert bei Vergleich von 101 vs. 202 mit  $p= 0,006$  und bei 102 vs. 202 mit  $p= 0,008$ . Der Median für den 202 Genotyp liegt dann bei 37,5 Jahren.

Abb.3.17 zeigt, dass die Patienten, die homozygot für das seltenere Allel des *MTHFR* 1298 Polymorphismus sind, d.h. beide Allele an Position 1298 eine Cytosin-Base besitzen, ein deutlich früheres mittleres Manifestationsalter aufweisen. So erkrankten homozygote Patienten (CC) mit durchschnittlich 41,55 Jahren, wohingegen Patienten, die heterozygot (AC) sind mit 46,59 Jahren und Patienten, die den Wildtyp (AA) tragen, mit 46,36 Jahren erkrankten. Die statistische Auswertung ergab Signifikanzen im MWU-Test bei Vergleich der Gruppen der Träger des WT-Allels (AA) mit den Homozygoten ( $p=0,046$ ) und bei Vergleich der Heterozygoten mit den Homozygoten ( $p=0,041$ ).

Führt man eine Aufteilung der jeweiligen Genotypen nach dem Geschlecht durch (s. Abb.3.18), so zeigt sich für beide Geschlechter, dass auch hier ein verfrühter Krankheitsbeginn bei den homozygoten Allelträgern (CC) eintritt.



## 1298 MTHFR

**Abb.3.18 Erkrankungsalter in Abhängigkeit von den 1298-MTHFR-Genotypen nach Geschlechtern**

1 = männlich = rote Boxen; 2 = weiblich = grüne Boxen  
 101 = A/A; 102 = A/C, 202 = C/C

So erkranken homozygote Männer mit durchschnittlich 33 Jahren, Heterozygote und die Träger des Wildtyp-Allels mit 45,44 bzw. 46,37 Jahren. Auch beim weiblichen Geschlecht erkranken die homozygoten C-Allelträger ca. 2 bzw. 3 Jahre eher als die anderen beiden Genotyp-Gruppen.

Um auszuschließen, dass es sich bei den CC-Allelträgern nur um Patienten mit 45 CAG-Wiederholungen handeln könnte, die somit für ein im Mittel verfrühtes Erkrankungsalter verantwortlich wären, werden die betroffenen homozygoten Patienten mit ihren Daten hier (s.Tab.3.6) aufgelistet.

Tab.3.6

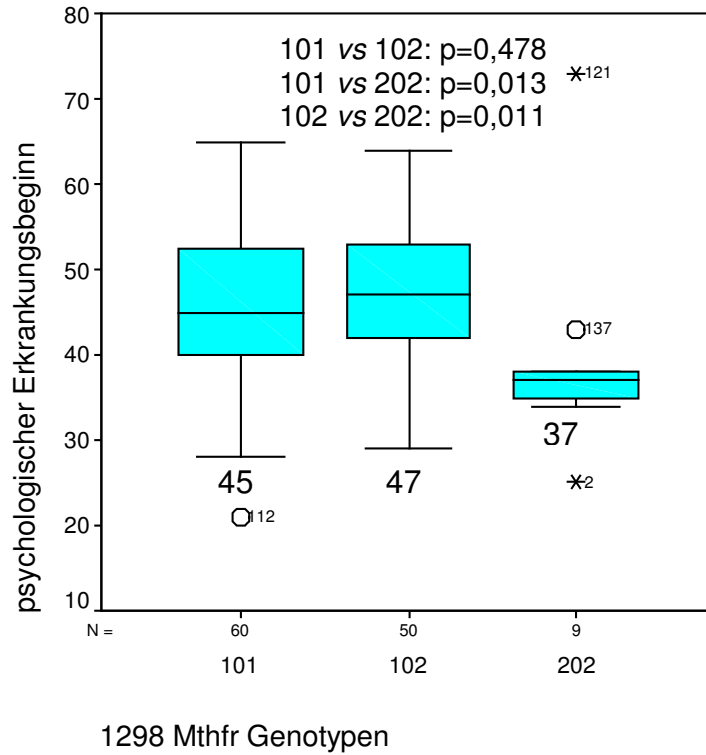
Patienten-Nr.	CAG- <i>Repeats</i> Expandiertes Allel	CAG- <i>Repeats</i> Nicht-expandiertes Allel	Onset	Geschlecht
259	41	26	38	w
1538	41	17	73	w
761	42	17	52	w
437	43	17	35	w
502	44	19	50	w
1783	44	20	37	w
1522	44	17	35	w
1892	45	18	38	w
157	43	17	25	m
982	45	20	34	m
998	45	20	40	m

Die Tabelle zeigt, dass alle CAG-Wiederholungen von 41 bis 45 CAGs (MW = 43,36 CAGs) vertreten sind. Die durchschnittliche CAG-*Repeat*zahl der 8 homozygoten Frauen beträgt 43 Wiederholungen, die der 3 Männer 44,33.

Tab.3.7 Kreuztabelle der 1298 *MTHFR*-Genotypen (MH-Patienten)

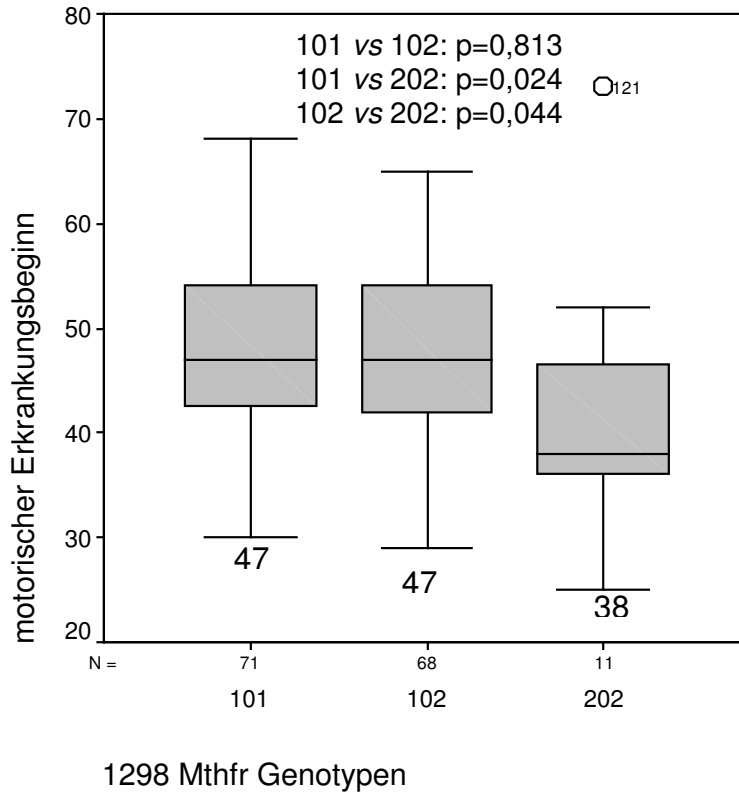
Genotyp	101 (AA)	102 (AC)	202 (CC)	Gesamt
Männer	36	40	3	79
Frauen	35	28	8	71
Gesamt	71 (47,33%)	68 (45,33%)	11 (7,33%)	150

Auch bei Untersuchung des psychiatrischen und motorischen Erkrankungsbeginns ließen sich statistische Signifikanzen nachweisen, die unter Abb.3.19 und 3.20 dargestellt werden.



**Abb.3.19** Abhängigkeit des psychiatrischen Erkrankungsbeginns von den 1298-MTHFR-Genotypen

101 = A/A; 102 = A/C, 202 = C/C



**Abb.3.20** Abhängigkeit des motorischen Erkrankungsbeginns von den 1298-MTHFR-Genotypen

101 = A/A; 102 = A/C, 202 = C/C

### 3.3.2.1 *MTHFR* 1298 Kontrollgruppe

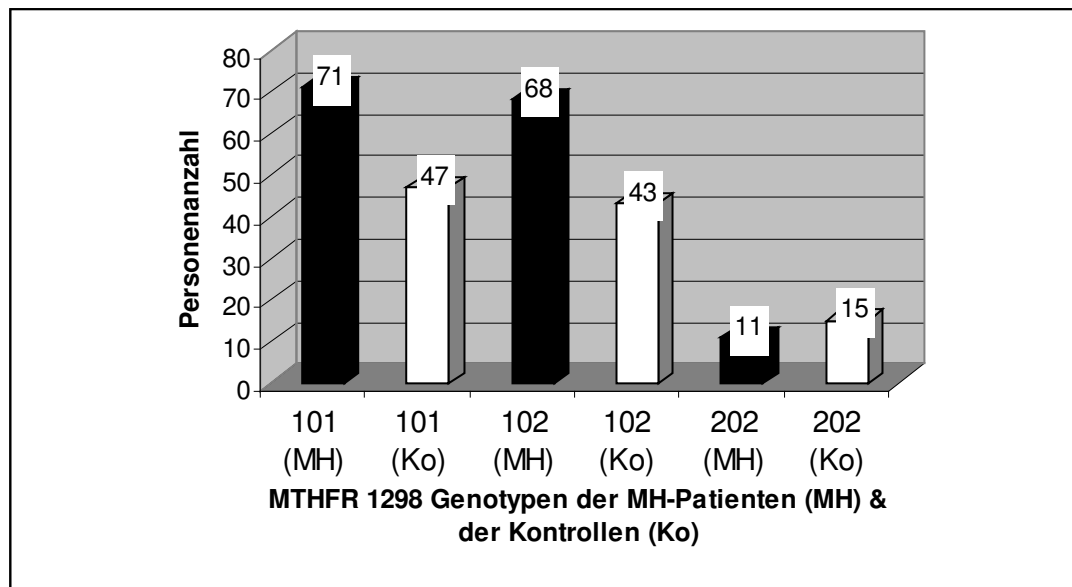
Da die statistische Auswertung der *MTHFR* 1298-Daten der MH-Patienten signifikant war, wurde anschließend die Genotypverteilung in einer 105 Personen umfassenden gesunden Kontrollgruppe untersucht, um ggf. in der Allelverteilung Unterschiede zu entdecken.

Hierbei zeigten sich die in der Tab.3.8 zusammengefassten Ergebnisse.

**Tab.3.8** Kreuztabelle der 1298 *MTHFR*-Genotypen (Kontrollen)

1298 <i>MTHFR</i> Genotyp	101 (AA)	102 (AC)	202 (CC)	Gesamt
Männer	23	19	9	51
Frauen	24	24	6	54
Gesamt	47 (44,76%)	43 (40,95%)	15 (14,29%)	105

Vergleicht man nun die Genotypenverteilung der Kontrollgruppe mit der der MH-Patienten, so zeigt sich, dass die statistische Verteilung nahezu identisch ist.



**Abb.3.21** Personenanzahl in Abhängigkeit vom 1298-*MTHFR*-Genotyp im MH-Patientenkollektiv sowie einer gesunden Kontrollgruppe

101 = A/A; 102 = A/C, 202 = C/C

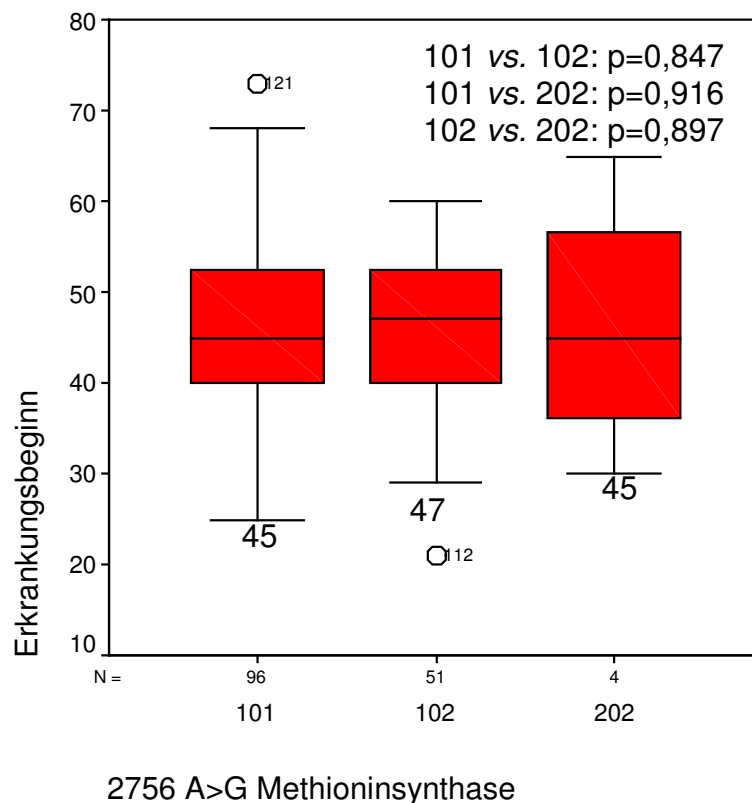
Rechnerisch ergibt sich eine Allelfrequenz in dem Kontrollkollektiv für den 1298 A>C *MTHFR*-Polymorphismus von 0,35 (A-Allel 0,65). Die Allelfrequenz der MH-Patienten für das C-Allel beträgt 0,30 und für das A-Allel 0,70.

Es finden sich keine statistisch signifikanten Frequenzunterschiede in den verglichenen Gruppen.

### 3.3.3 MS 2756 A>G

Der A>G Polymorphismus an Position 2756 der Methioninsynthase(*MS*)-Gens wurde ebenfalls mittels PCR-RFLP Methode untersucht. Es wurde ein 211 bp langes Fragment amplifiziert und mit Hilfe des Enzyms Hae3 laut Herstellerangaben verdaut. Bei Vorliegen einer Guaninbase an der o.g. Stelle wurde eine neue Restriktionsstelle für Hae3 in das DNA-Fragment eingefügt, so dass es in 2 kleinere Fragmente, bestehend jeweils aus 131bp und 80bp, gespalten werden konnte.

Anschließend wurden die verdauten PCR-Produkte wiederum elektrophoretisch in einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid angefärbt.



**Abb.3.22 Abhängigkeit des Erkrankungsbeginns vom 2756-MS-Genotyp**  
101 = A/A; 102 = A/G, 202 = G/G

Tab.3.9 MS-Genotypenaufteilung nach Geschlechtern

MS 2756 Genotyp	101(AA)	102(AG)	202(GG)	Gesamt
Männer	52	26	2	80
Frauen	44	25	2	71
Gesamt	96 (63,58%)	51 (33,77%)	4 (2,65%)	151

Die Allelfrequenzen für das A-Allel beträgt 0,80 und für das G-Allel 0,20. Die Statistik zeigte bei der Auswertung keine signifikante Assoziation zwischen dem Manifestationsalter und den jeweiligen Genotyp-Gruppen (s. p-Werte oben).

### 3.3.4 MSR 66 A>G

Der MSR 66 A>G Polymorphismus wurde wiederum durch die RFLP-Methode untersucht. Die durch PCR gewonnenen DNA-Fragmente mit einer Länge von 142bp wurden mit Nde1 restringiert. Lag das G-Allel vor, so wurde das Fragment in zwei 96bp und 46bp kurze Fragmente gespalten. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einem 2%igem Agarosegel.

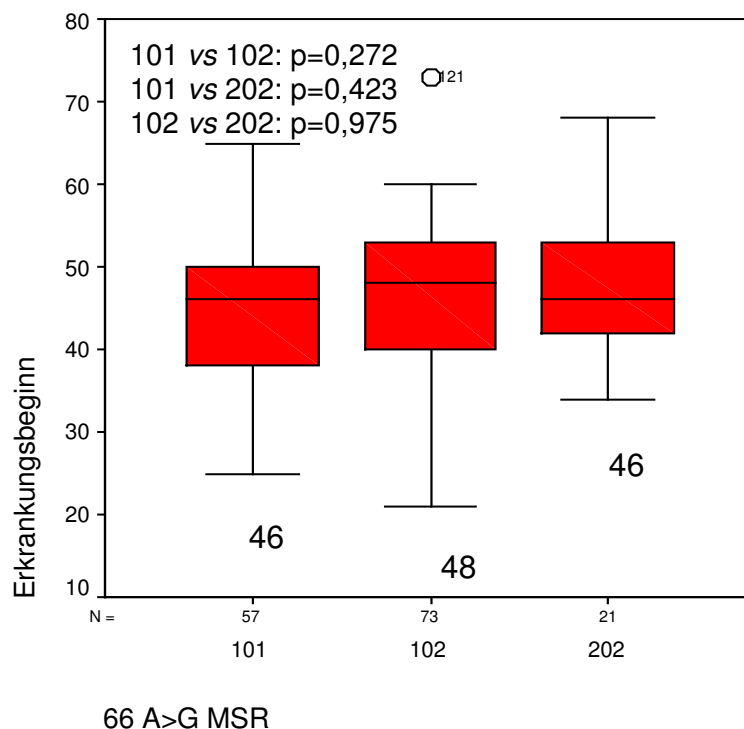


Abb. 3.23 Abhängigkeit des Erkrankungsbeginns vom 66-MSR-Genotyp  
 101 = A/A; 102 = A/G; 202 = G/G

Die statistische Auswertung zeigte keinerlei Signifikanzen beim Vergleich der einzelnen Genotypgruppen untereinander (s.o. Abb.3.23).

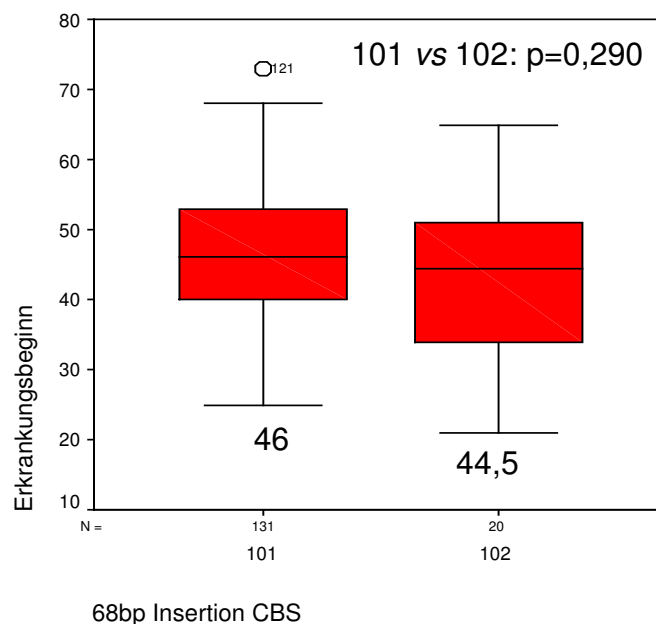
**Tab.3.10 MSR-Genotypaufteilung nach Geschlechtern**

MSR 66 Genotyp	101 (AA)	102 (AG)	202 (GG)	Gesamt
Männer	33	37	10	80
Frauen	24	36	11	71
Gesamt	57 (37,75%)	73 (48,34%)	21 (13,91%)	151

Die Allelfrequenzen für das A-Allel beträgt 0,62 und für das G-Allel 0,38.

### 3.3.5 CBS 68bp Insertion

Bei der 68bp Insertion der CBS zwischen den Nukleotiden 844 und 845 wurde ebenfalls die RFLP-Methode verwendet. Der Polymorphismus geht einher mit dem 833 T>C Basenaustausch. Da die Insertion eine alternative Splice-Stelle schafft, eliminiert sie sich nicht nur selber, sondern auch die 833 T>C Mutation (Geisel 2001). Der Verdau (3h bei 65°C) des 225bp langen PCR-Fragmentes erfolgte durch Bsr1. Lag die Insertion bzw. damit auch der Basenaustausch T>C auf einem Allel vor, so entstand ein 75bp langes Fragment. Für diesen Tandempolymorphismus existieren nur heterozygote Merkmalsträger (Geisel 2001).



**Abb.3.24 Abhängigkeit des Erkrankungsbeginns vom CBS-Genotyp**

101 = Insertion auf beiden Allelen **nicht** vorhanden; 102 = Insertion auf einem Allel vorhanden

Die Allelfrequenzen für das 68bp Insertions-Allel beträgt 0,07 und für das homozygote Allel ohne Insertion 0,93.

### 3.4 Ergebnisse der Untersuchungen der Polymorphismen der Nitritoxidsynthasen (NOS)

#### 3.4.0 NOS

Die NOS-Polymorphismen *NOS 1(2)*, *NOS 3*, *nNOS* und *iNOS* wurden mittels RFLP-Methode und Agarosegelelektrophorese (2%ige Gele) analysiert.

Der *NOS 2A* Polymorphismus wurde durch eine Fragmentlängenanalyse auf dem Kapillarsequenzier untersucht.

#### 3.4.1 NOS 1 / nNos

##### 3.4.1.1 NOS 1(2) (SNP C>T)

Der untersuchte C>T Polymorphismus im *nNOS*-Gen befindet sich in Exon 29, 276bp stromabwärts dem Translationsende. Der Verdau der 128bp langen Fragmente mit Eco72I ergab bei Vorliegen des C-Allels eine Spaltung des Fragmentes in 2 kürzere Fragmente à 100bp und 28bp.

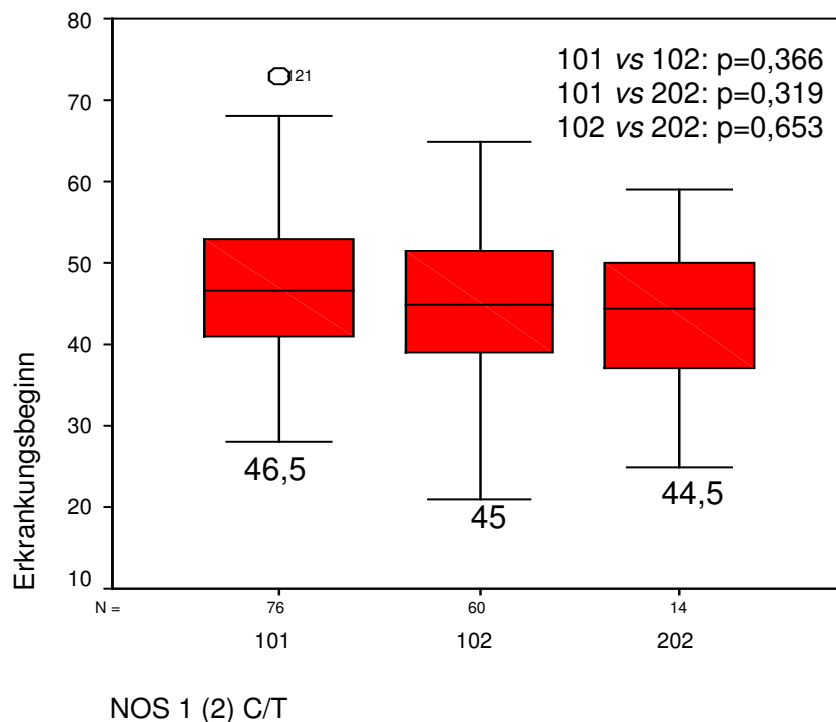


Abb.3.25 Abhängigkeit des Erkrankungsbeginns vom NOS 1(2)-Genotyp

101 = C/C; 102 = C/T; 202 = T/T

Tab.3.11

NOS 1 (2) C>T	101 (CC)	102 (TC)	202 (TT)	Gesamt
Männer	46	25	9	80
Frauen	30	35	5	70
Gesamt	76 (50,67%)	60 (40%)	14 (9,33%)	150

### 3.4.1.2 nNOS

Der in Exon 18 der neuronalen NOS gelegene C zu T Polymorphismus zerstört bei Vorhandensein des T-Allels eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym Dra3, so dass das durch PCR gewonnene 180bp lange DNA-Fragment ungeschnitten bleibt. Liegt das C Allel vor, so spaltet Dra3 das Fragment in ein 125bp langes und in ein 55bp langes Fragment.

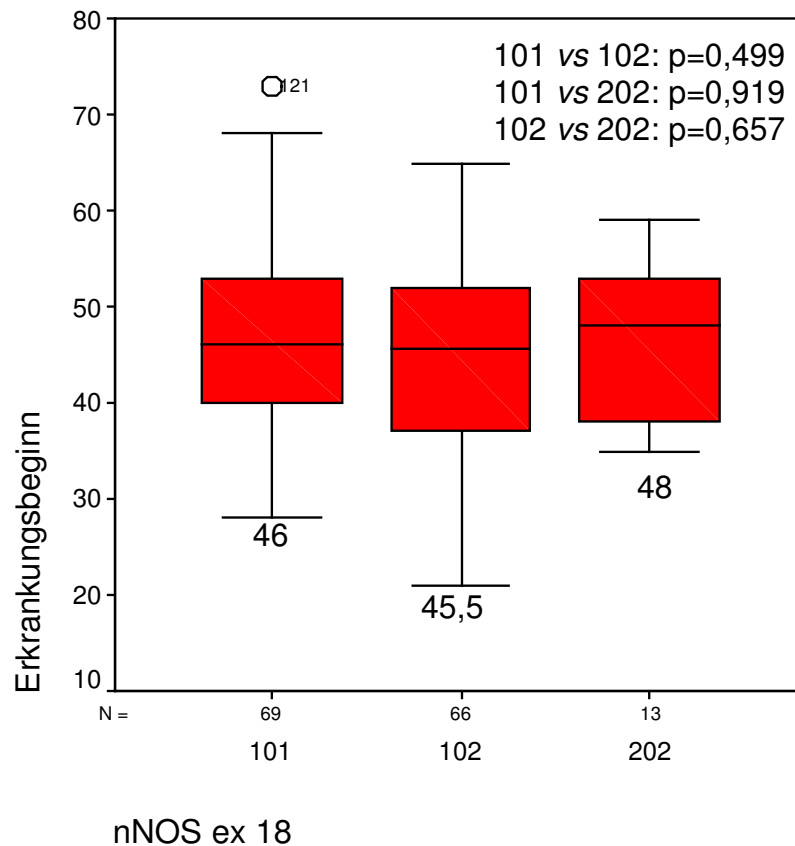


Abb.3.26 Abhängigkeit des Erkrankungsbeginns vom nNOS-Genotyp

101 = C/C; 102 = C/T; 202 = T/T

Patient 121 ist ein Ausreißer.

Tab.3.12

nNOS ex 18	101 (CC)	102 (CT)	202 (TT)	Gesamt
<b>Männer</b>	40	34	5	79
<b>Frauen</b>	29	32	8	69
<b>Gesamt</b>	69 (46,62%)	66 (44,59%)	13 (8,78%)	148

3.4.2 NOS 2 / iNOS

3.4.2.1 NOS 2A

Bei dem NOS 2A-Polymorphismus handelt es sich um einen Pentanukleotidrepeat bestehend aus folgenden Basenpaaren: CCTTT. Er liegt innerhalb der 5'putativen Promotorregion der induzierbaren NOS, 2,5kB 5' entfernt von dem NOS 2-Transkriptionsstartpunkt. Dieser Polymorphismus wurde mittels Fragmentlängenanalyse auf einem Kapillarsequenzier untersucht. Die Genotypen wurden anhand der Fragmentlängen kodiert.

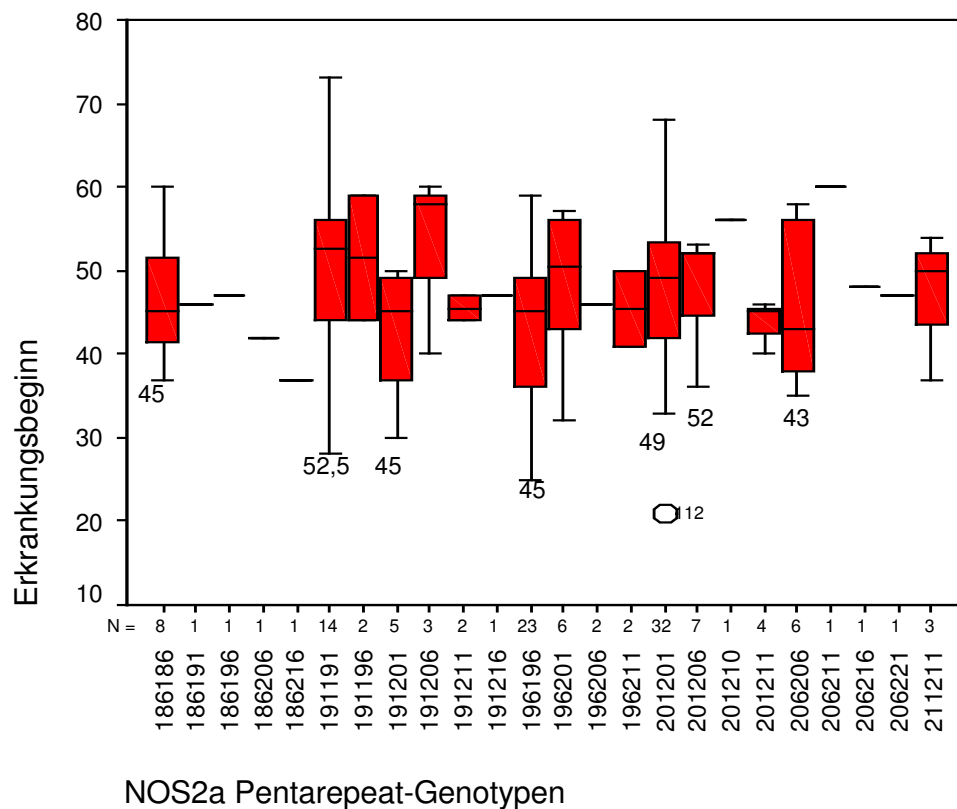


Abb.3.27 Abhängigkeit des Erkrankungsbeginns vom NOS2a-Pentarepeat-Genotyp

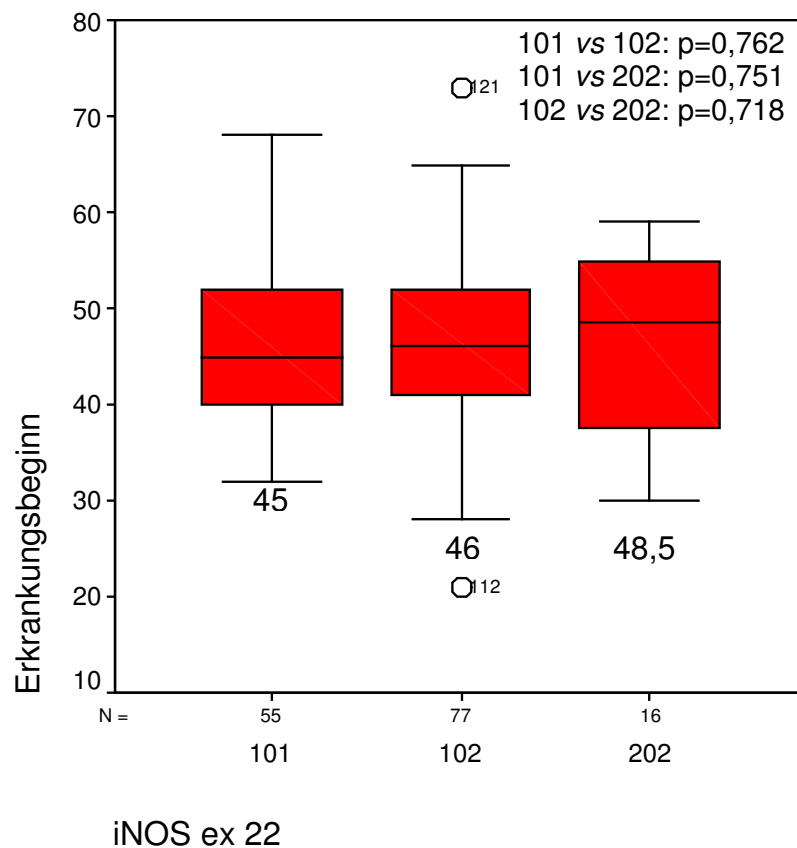
Fragmentlänge von 186bp = 10 CCTTT-Wiederholungen

191bp = 11; 196bp = 12; 201bp = 13; 206bp = 14; 211bp = 15; 216bp = 16; 221bp = 17

Aufgrund der vielen Genotypgruppen, die ebenfalls häufig nur eine geringe Personenzahl enthielten, war eine statistische Untersuchung auf diese Weise nicht möglich. So wurden Gruppen gebildet, die ein bestimmtes Allel z.B. 186/x trugen. Bei Vergleich dieser Gruppen mit einer anderen Gruppe z.B. 191/x ergaben sich statistisch keine signifikanten Ergebnisse.

### 3.4.2.2 iNOS

Die G>A Substitution in Exon 22 der induzierbaren NOS wurde durch Verdau mit Btg1 nachgewiesen. Das 126bp lange PCR-Fragment wurde bei Vorliegen des Wildtyps (G-Allel) in 3 kleinere Fragmente von 79, 24 und 23bp - Länge gespalten. Bei Vorliegen des A-Allels wurde eine Btg1 Schnittstelle zerstört, so dass nur 2 Fragmente mit einer Länge von 103 und 23bp entstanden.



**Abb.3.28** Abhängigkeit des Erkrankungsbeginns vom iNOS-Genotyp

101 = G/G; 102 = G/A; 202 = A/A

Die Patienten 121 und 112 stellen Ausreißer dar.

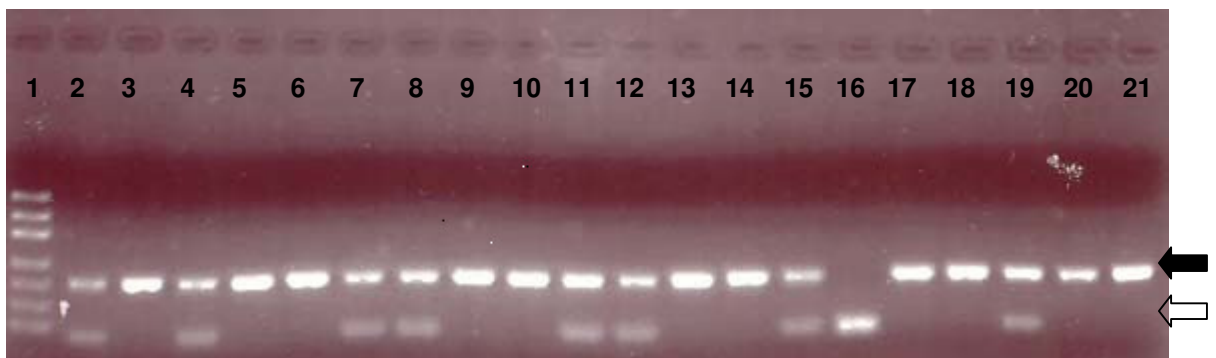
Tab.3.13

<i>iNOS</i> Exon 22	101(GG)	102 (GA)	202 (AA)	Gesamt
<b>Männer</b>	34	35	8	77
<b>Frauen</b>	21	42	8	71
<b>Gesamt</b>	55 (37,16%)	77 (52,02%)	16 (10,81%)	148

### 3.4.3 NOS 3 / eNOS

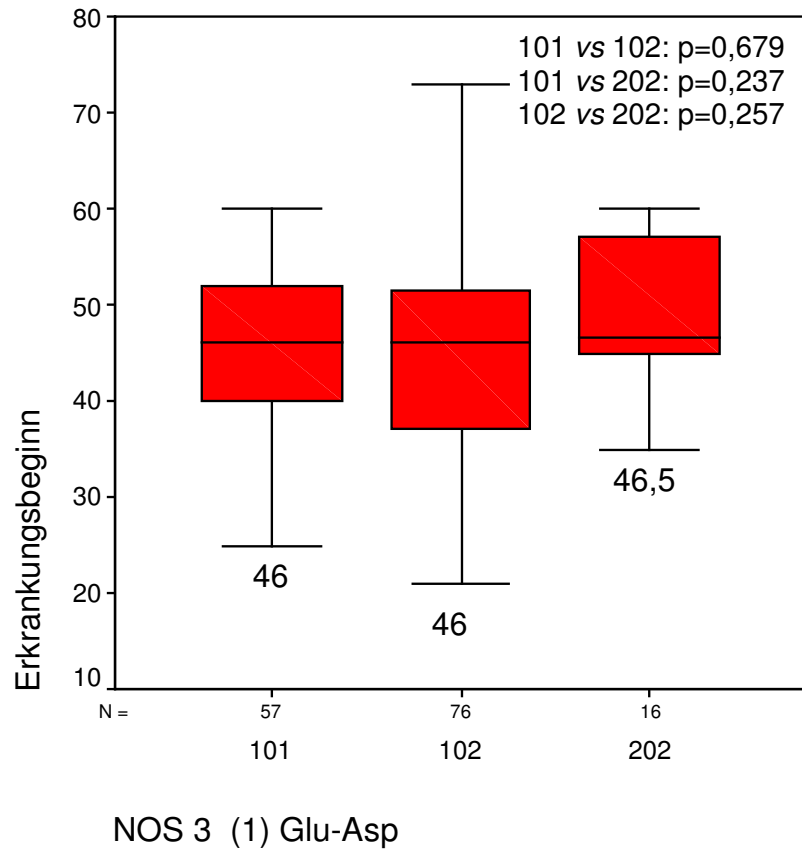
#### 3.4.3.1 NOS 3

Der AS-Austausch von Glu zu Asp befindet sich an Codonposition 298 in Exon 7. Das 200bp lange DNA-Fragment (s. Abb. 3.29 schwarzer Pfeil) wurde mit dem Enzym Mbo1 verdaut. Der Wildtyp Glu/Glu wurde nicht geschnitten. Lag jedoch das Asp-Allel vor so entstanden 2 Fragmente von 101 und 99bp Länge (weißer Pfeil).



**Abb.3.29** Agarosegel NOS 3 Polymorphismus

Die erste Spur enthält den pUC 19 Längenmarker. Die Spuren 3, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 20 und 21 enthalten Proben von Patienten, die homozygot für den Wildtyp (Glu/Glu) sind. Die Patienten 2, 4, 7, 8, 11, 12, 15 und 19 sind heterozygot (Glu/Asp). Homozygot für das Allel Asp/Asp des NOS 3 Polymorphismus ist Patient 16.



**Abb.3.30** Abhängigkeit des Erkrankungsbeginns vom NOS 3(1)-Genotyp

101 = Glu/Glu; 102 = Glu/Asp; 202 = Asp/Asp

**Tab.3.14** NOS3-Genotypaufteilung nach Geschlechtern

NOS 3	101	102	202	Gesamt
<b>Glu-Asp</b>				
<b>Männer</b>	36	34	10	80
<b>Frauen</b>	21	42	6	69
<b>Gesamt</b>	57 (38,26%)	76 (51,01%)	16 (10,74%)	149

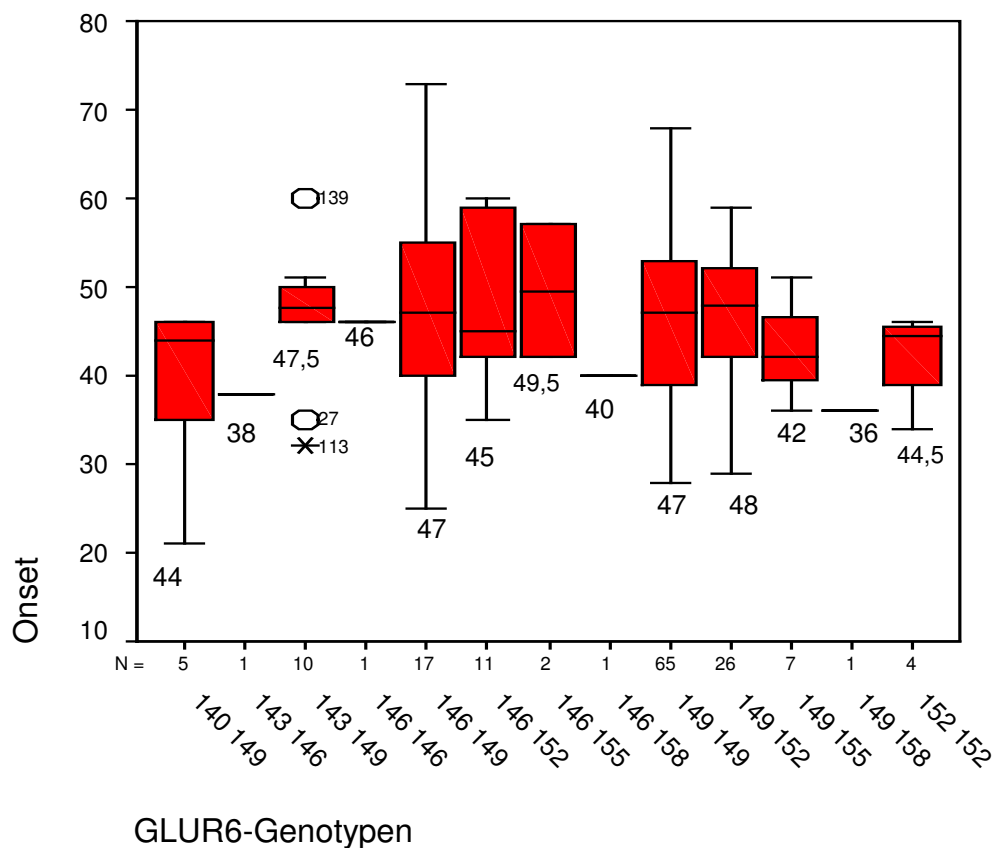
Das Ergebnis der statistischen Auswertung war nicht signifikant.

## 3.5 Ergebnisse der Polymorphismen in den Glutamatrezeptoren

### 3.5.1 *GluR6*

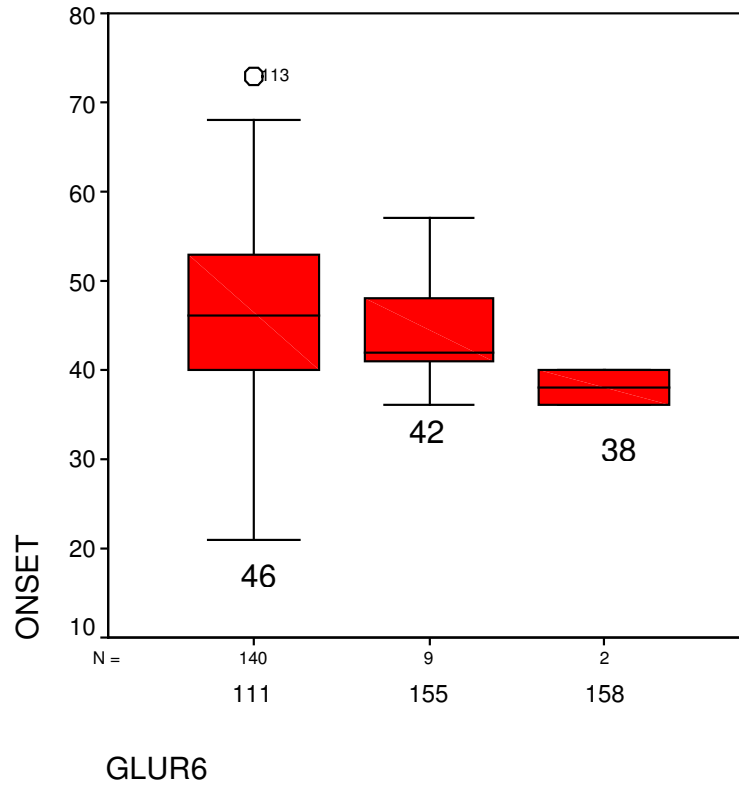
Der TAA-Repeat-Polymorphismus in der 3' untranslatierten Region auf Chromosom 6 nahe dem Gen für den Kainat-Rezeptor *GluR6*, wurde mittels Mikrosatellitengelanalyse untersucht.

Es zeigte sich die in Abb.3.31 wiedergegebene Genotypenverteilung. Die Genotypen wurden durch die Fragmentlänge kodiert wiedergegeben. Am häufigsten trat der 149/149 Genotyp (65 MH-Patienten), gefolgt von dem 149/152, welchen 26 Patienten aufwiesen und dem 146/149 Genotyp (17 Patienten) auf.



**Abb.3.31 Erkrankungsalter (*Onset*) in Abhängigkeit vom *GLUR6*-Genotyp**

Patienten 27 und 139 stellen Ausreißer, Patient 113 einen Extremwert dar.



**Abb.3.32 Erkrankungsalter (Onset) in Abhängigkeit vom GLUR6-Genotyp**  
 111= Gruppe aus allen Genotypen außer 155 & 158

Fasst man die 155 mit den 158 Genotypen zusammen, so erhält man einen Median von 42 Jahren für diese Gruppe. Vergleicht man nun die 111 mit der 155+158 Gruppe ergibt sich ein p-Wert von 0,201. Addiert man zusätzlich die 158 Genotypen zu der 111 Gruppe, so bleibt der Median der 111 Gruppe bei 46 Jahren. Ein Vergleich der 111+158 und der 155 Gruppe durch den MWU-Test ergibt einen p-Wert von 0,484.

**Tab. 3.15**

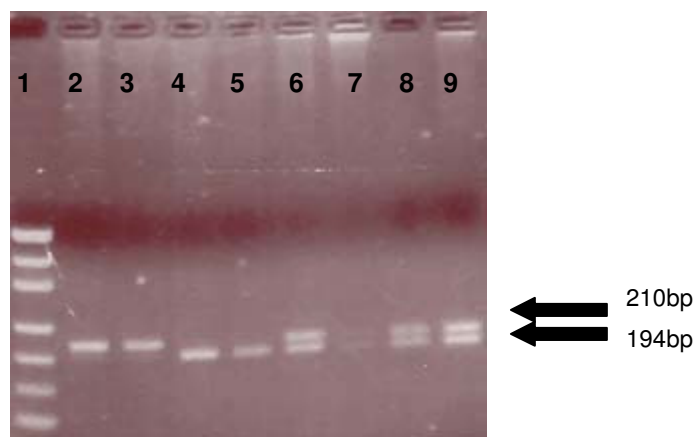
GluR6-Genotyp	Männer	Frauen	Gesamt
140/149	3	2	5 (3,3%)
143/146	-	1	1 (0,7%)
143/149	7	3	10 (6,6%)
146/146	1	-	1 (0,7%)
146/149	8	9	17 (11,3%)
146/152	4	7	11 (7,3%)
146/155	1	1	2 (1,3%)

GluR6-Genotyp	Männer	Frauen	Gesamt
146/158	1	-	1 (0,7%)
149/149	32	33	65 (43,0%)
149/152	16	10	26 (17,3%)
149/155	4	3	7 (4,6%)
149/158	1	-	1 (0,7%)
152/152	2	2	4 (2,6%)
<b>Gesamt</b>	<b>80</b>	<b>71</b>	<b>151(100%)</b>

### 3.5.2 *GRIN2B* (C2664T)

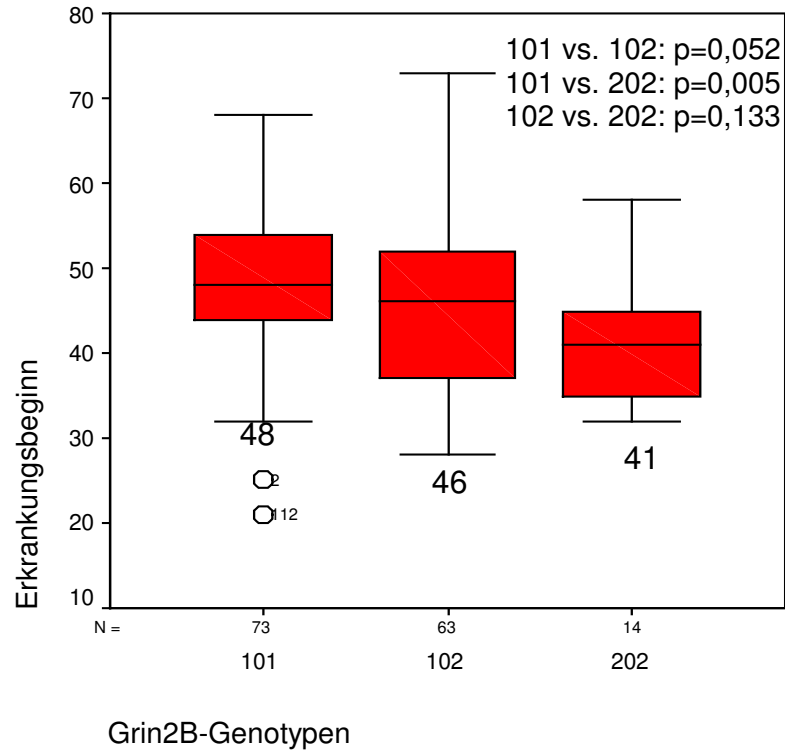
#### 3.5.2.1 *GRIN2B* MH-Patienten

Der C>T Polymorphismus an Nukleotidposition 2664 (=Codon 888 (Tyrosin)) in der *GRIN2B* Untereinheit des N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors wurde mittels RFLP-Methode und PAA-Gelelektrophorese untersucht. Das 210bp lange DNA-Fragment wurde durch das Enzym Pst1 verdaut. Lag das C-Allel (Wildtyp) vor, so blieb das 210bp Fragment ungeschnitten. Bei Vorliegen des T-Allels wurde das Fragment in zwei Fragmente mit 194 und 16bp gespalten. Einen Ausschnitt aus so einem Gel zeigt Abb.3.33.

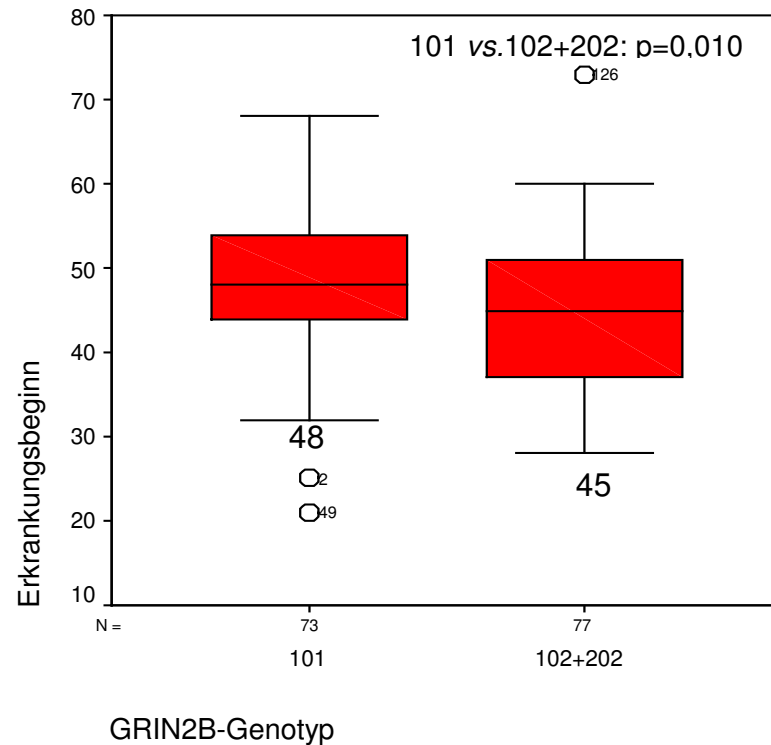


**Abb.3.33** *GRIN2B* Gelausschnitt

Die erste Spur enthält den pUC 19 Längenmarker. Die Spuren 2 und 3 enthalten Proben von Patienten, die homozygot für den Wildtyp (C/C) sind. Die Patienten 6, 8 und 9 sind heterozygot (C/T). Homozygot für das T-Allel sind Patienten 4 und 5.



**Abb.3.34** Erkrankungsbeginn in Abhängigkeit vom GRIN2B-Genotyp bei 150 MH-Patienten  
 101 = CC; 102 = CT; 202 = TT



**Abb.3.35** Erkrankungsbeginn in Abhängigkeit vom GRIN2B-Genotyp bei 150 Patienten  
 101 = CC; 102 = CT; 202 = TT

Insgesamt zeigt sich eine nahezu ausgeglichene Genotypenverteilung des Wildtyps (CC) und der heterozygoten Merkmalsträger (CT). 48,7% bzw. 73 MH-Patienten sind CC homozygot, 42,0 % bzw. 63 Patienten sind heterozygot. Nur 14 (9,3%) von den 150 untersuchten Patienten sind homozygot für das T-Allel.

Wie die Abb.3.36 zeigt, weisen diejenigen Patienten, die homozygot (TT) für den *GRIN2B* C2664T Polymorphismus sind, im Vergleich zu den homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels (CC) ein um 7 Jahre verfrühtes Erkrankungsalter auf. Die statistische Auswertung ergab hier eine starke Signifikanz von  $p=0,005$ . Der Vergleich der Wildtypen (CC) mit den heterozygoten Merkmalsträgern (CT) ergab zwar keine eindeutige statistische Signifikanz ( $p=0,052$ ), lässt jedoch auch hier eine Tendenz zu einem früheren Manifestationsalter erkennen. So erkrankten Heterozygote etwa 2 Jahre eher als Patienten, die den Wildtyp tragen. Vergleicht man abschließend noch die Heterozygoten mit denen, die homozygot für diesen Polymorphismus sind, so zeigt sich ein um 5 Jahre verfrühter Krankheitsbeginn ( $p=0,133$ ). Um auszuschließen, dass es sich in der Gruppe der homozygoten T-Allelträger nur um Patienten mit 45 CAG-Wiederholungen handeln könnte, hier folgende Patientendaten (s.Tab.3.16).

Tab.3.16

Patienten-Nr.	CAG-Repeats Expandiertes Allel	CAG-Repeats Nicht-expandiertes Allel	Onset	Geschlecht
618	41	17	35	m
1744	41	17	46	m
250	42	18	32	m
1412	42	21	35	m
1891	42	16	58	m
434	43	17	45	m
1643	43	19	41	m
1037	44	17	45	m
245	42	18	50	w
1438	43	12	44	w

Patienten-Nr.	CAG- <i>Repeats</i> Expandiertes Allel	CAG- <i>Repeats</i> Nicht-expandiertes Allel	Onset	Geschlecht
1447	43	20	39	w
1713	43	17	33	w
386	44	21	36	w
1061	44	17	41	w

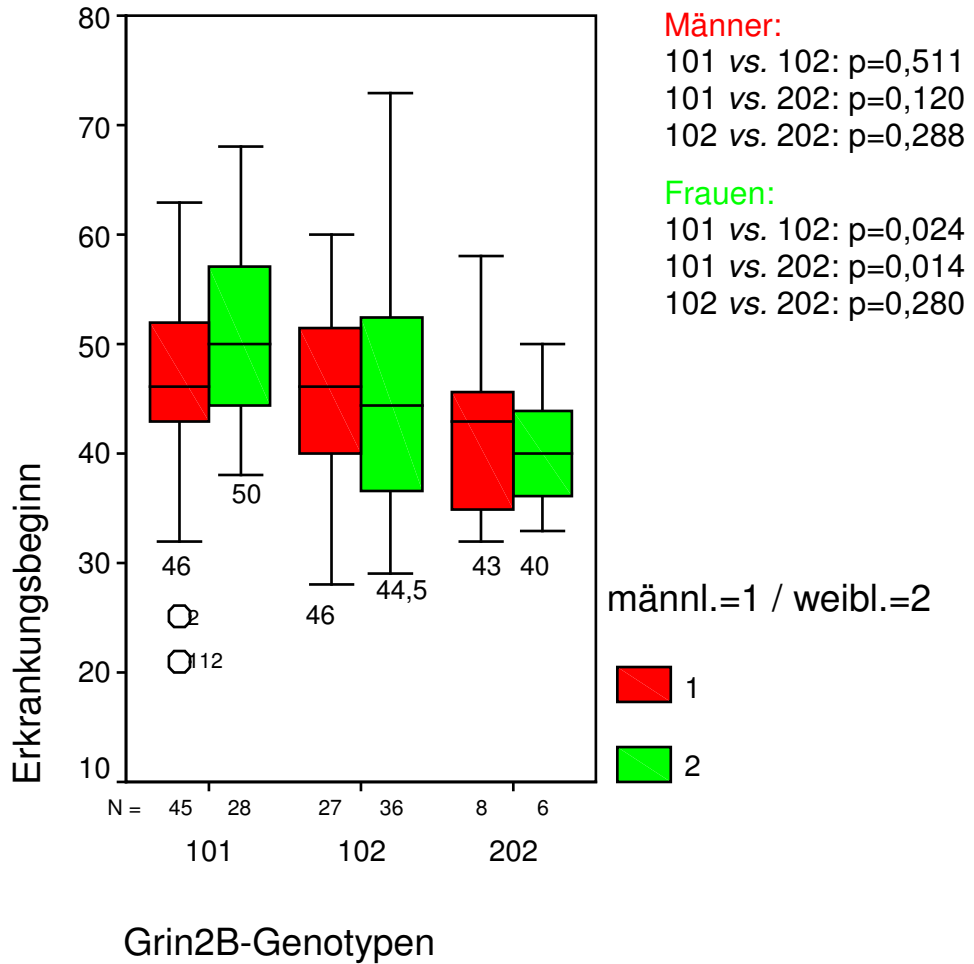
Wie Tab.3.16 zeigt handelt es sich bei den 14 homozygoten Trägern des T-Allels um eine gemischte Gruppe mit verschiedenen langen CAG-Wiederholungen. Der durchschnittliche expandierte CAG-Wert beträgt insgesamt 42,62 Wiederholungen. Die durchschnittliche CAG-*Repeat*zahl der 6 homozygoten Frauen beträgt 43,17 CAG- Wiederholungen, die der 8 Männer 42,25.

Die Genotypenaufteilung nach dem jeweiligen Geschlecht (s.Abb.3.36 & Tab.3.17) spiegelt ebenfalls die Tendenz wieder, dass ein heterozygoter MH-Patient früher erkrankt als ein Patient mit dem Wildtyp und ein homozygoter Träger des T-Allels früher als ein heterozygoter Patient.

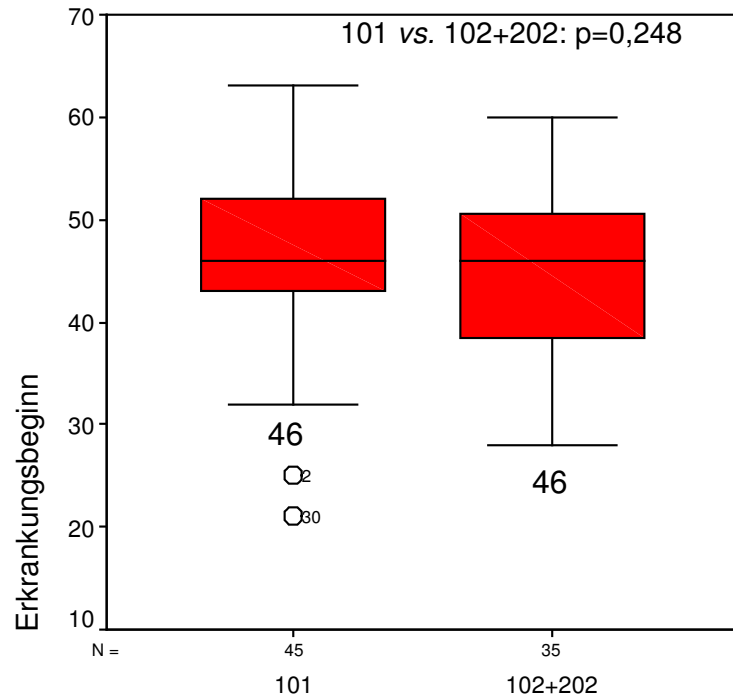
**Tab.3.17 GRIN2B-Genotypenaufteilung nach Geschlechtern**

Grin2B	101 (CC)	102 (CT)	202 (TT)	Gesamt
<b>Männer</b>	45	27	8	80 (53,3%)
<b>Frauen</b>	28	36	6	70 (46,7%)
<b>Gesamt</b>	73 (48,7%)	63 (42,0%)	14 (9,3%)	150

Die Frequenz für das C-Allel beträgt 0,70 und für das T-Allel 0,30.

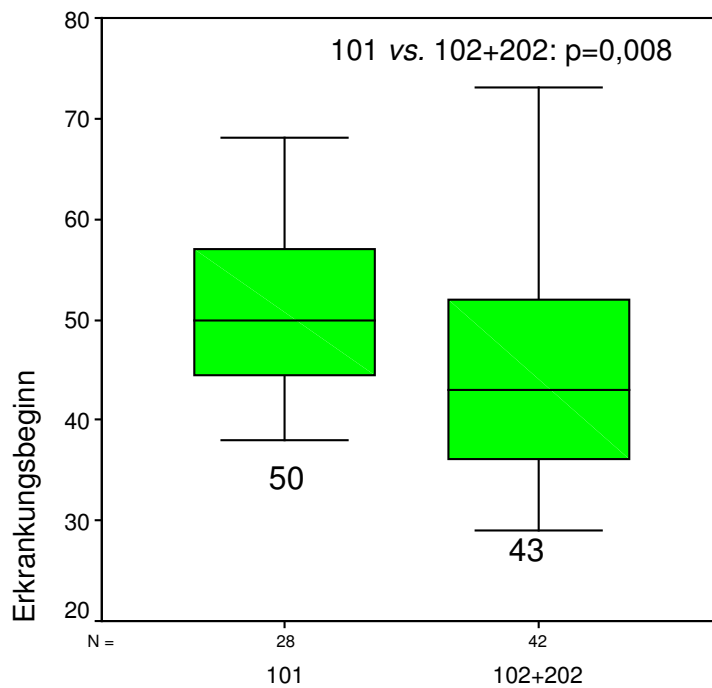


**Abb.3.36** Erkrankungsbeginn in Abhängigkeit vom GRIN2B-Genotyp bei 150 MH-Patienten aufgetrennt nach Geschlechtern  
 101 = CC; 202 = CT; TT = TT  
 1 = rote Box = Männer  
 2 = grüne Box = Frauen



GRIN2B-Genotypen Männer

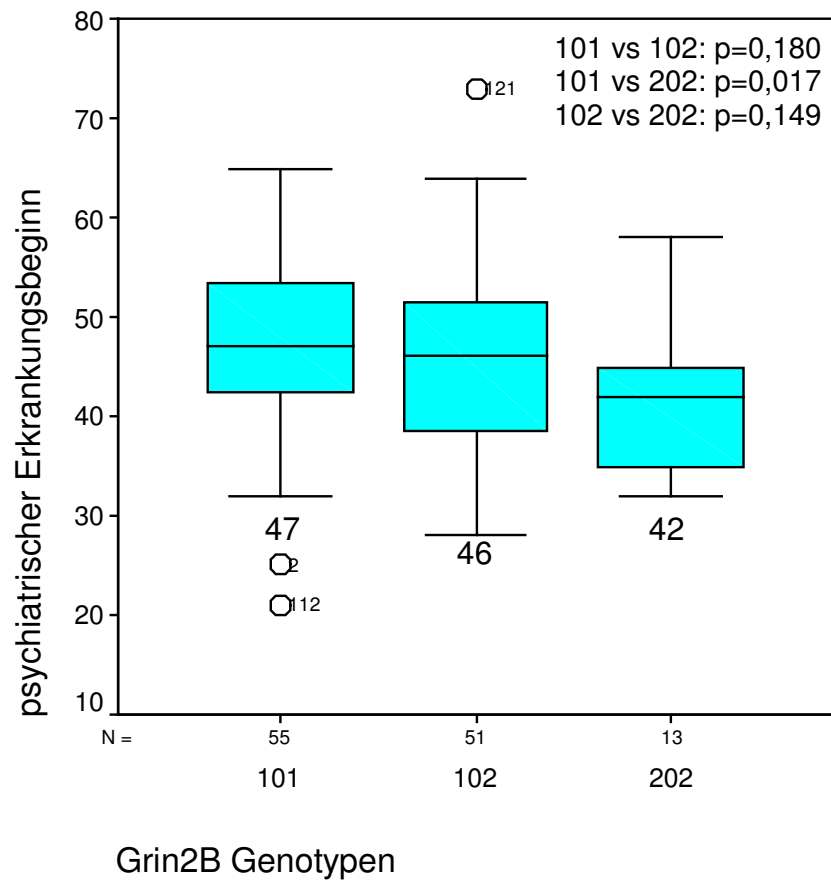
**Abb.3.37** Erkrankungsbeginn in Abhängigkeit vom GRIN2B-Genotyp bei 80 männlichen Patienten (101 = CC; 102 = CT; 202 = TT)



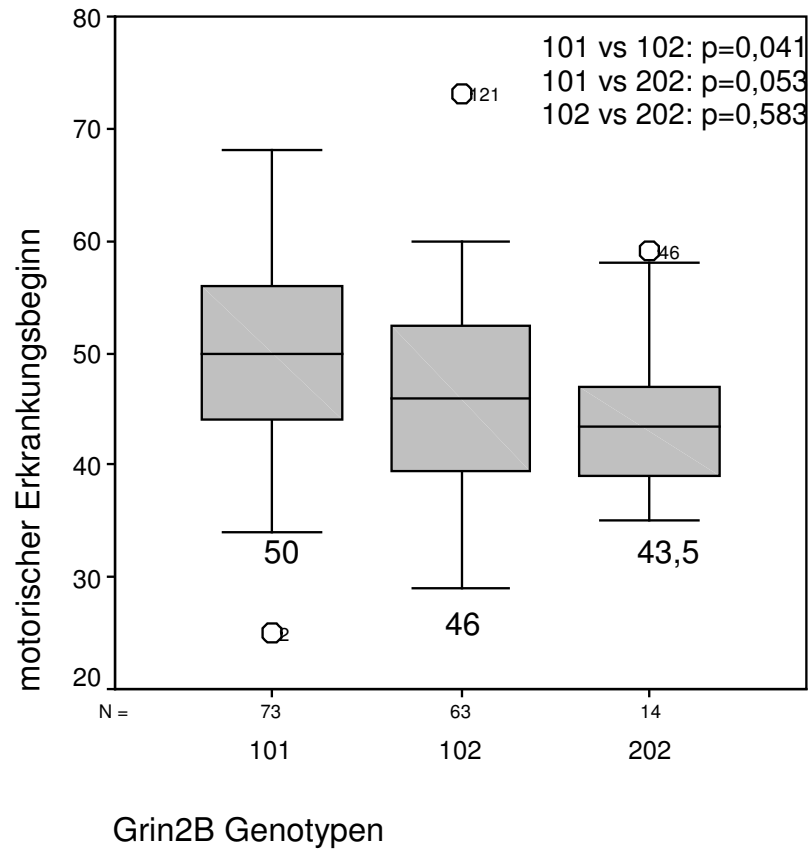
GRIN2B-Genotypen Frauen

**Abb.3.38** Erkrankungsbeginn in Abhängigkeit vom GRIN2B-Genotyp bei 70 weiblichen Patientinnen (101 = CC; 102 = CT; 202 = TT)

Auch die Berechnungen bezüglich des psychiatrischen und motorischen Erkrankungsbeginns ergaben die unten in den Abb.3.41 und 3.42 wiedergegeben Signifikanzen.



**Abb.3.39 Psychiatrischer Erkrankungsbeginn von 119 Patienten in Abhängigkeit von den GRIN2B-Genotypen**  
101 = CC; 102 = CT; 202 = TT



**Abb.3.40 Motorischer Erkrankungsbeginn von 150 Patienten in Abhängigkeit von den GRIN2B-Genotypen**  
101 = CC; 102 = CT; 202 = TT

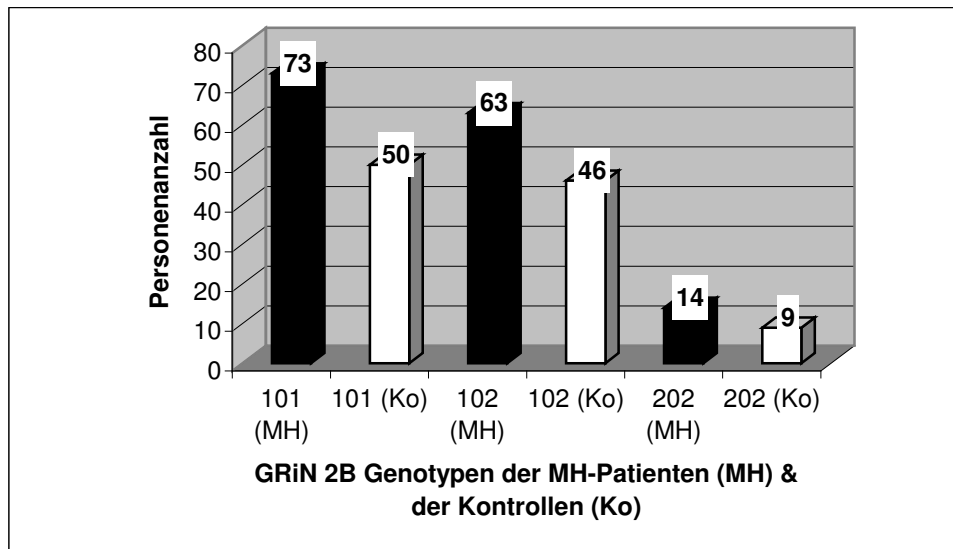
### 3.5.2.2 GRIN2B Kontrollen

Aufgrund der signifikanten Werte bei Untersuchung der MH-Patienten, wurde anschließend die Genotypenverteilung der 105 Kontrollprobanden analysiert. Die gewonnenen Daten sind Tab.3.18 zu entnehmen.

**Tab.3.18**

<b>GRIN 2B Kontrollen</b>	<b>101 (CC)</b>	<b>102 (CT)</b>	<b>202 (TT)</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Männer</b>	26	23	2	51 (48,57%)
<b>Frauen</b>	24	23	7	54 (51,43%)
<b>Gesamt</b>	50 (47,62%)	46 (43,81%)	9 (8,57%)	105

Die Frequenz für das C-Allel beträgt 0,70 und für das T-Allel 0,30.



**Abb.3.41** Personenanzahl in Abhängigkeit von den GRIN2B-Genotypen bei 150 MH-Patienten (MH) und 105 Kontrollpersonen (Ko)

101 = CC; 102 = CT; 202 = TT

Vergleicht man die Genotypenverteilung der MH-Patienten und der Kontrollen so lässt sich prozentual eine ähnliche Häufigkeitsverteilung erkennen. 47,62% der Kontrollen und 48,7% der MH-Patienten tragen den Wildtyp in homozygoter Form (CC). Heterozygot (CT) sind 43,81% der Kontrollen und 42,0% der MH-Patienten. Letztendlich sind 8,57% der Kontrollgruppe und 9,3% der erkrankten Patienten homozygot für das T-Allel.

### 3.6 Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsanalyse

Die Tabellen 3.19 und 3.20 zeigen die Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsanalyse (s. auch 2.2.6). Von den untersuchten Polymorphismen zeigt allein der GRIN2B-Polymorphismus einen statistisch signifikanten p-Wert von 0,002 (Berechnung mit allgemeinem Erkrankungsalter) bzw. 0,007 (Berechnung mit nur motorischem Erkrankungsbeginn). Er ist für 6,72 bzw. 5,35% der ungeklärten Varianz im Erkrankungsalter des MH verantwortlich.

Tab. 3.19 Multiple Regression berechnet mit allgemeinem Erkrankungsalter

Model (allgemeines Erkrankungsalter)	R <sup>2</sup>	Δ R <sup>2</sup>	% unerklärter Varianz	p-Wert
HD CAG	0,212	-	-	<b>0,0001</b>
HD CAG + CAG normales Allel	0,216	0,004	0,51	0,409
HD CAG x CAG normales Allel (Interaktion)	0,216	0,004	0,51	0,401
HD CAG + MTHFR 677 Genotyp	0,214	0,002	0,25	0,701
HD CAG + MTHFR 1298 Genotyp	0,217	0,005	0,63	0,189
HD CAG + MS 2756 Genotyp	0,213	0,001	0,13	0,705
HD CAG + MSR 66 Genotyp	0,213	0,001	0,13	0,703
HD CAG + CBS 68 Genotyp	0,227	0,015	1,90	0,100
HD CAG + NOS1(2) Genotyp	0,216	0,004	0,51	0,290
HD CAG + nNOS Genotyp	0,219	0,007	0,89	0,774
Nos2a	0,214	0,002	0,25	0,639
HD CAG + iNOS Genotyp	0,223	0,011	1,4	0,448
HD CAG + NOS3 Genotyp	0,215	0,003	0,38	0,374
HD CAG + GRIN2B Genotyp	0,265	0,053	<b>6,72</b>	<b>0,002</b>
HD CAG + GLUR6 Genotyp Allel1	0,227	0,015	1,90	0,092
HD CAG + GLUR6 Genotyp Allel2	0,212	-	-	0,848
HD CAG + GLUR6 Genotyp Allel1x Allel2 (Interaktion)	0,218	0,006	0,76	0,293
HD CAG + Htt 2642 Genotyp	0,212	-	0,00	0,941
HD CAG + Htt Promotor Genotyp Allel1	0,215	0,003	0,38	0,509
HD CAG + Htt Promotor Genotyp Allel2	0,227	0,015	1,90	0,098
HD CAG + Htt Promotor Genotyp Allel1x Allel2 (Interaktion)	0,212	-	-	0,873
HD CAG + Htt CCG Genotyp Allel1	0,212	-	-	0,849
HD CAG + Htt CCG Genotyp Allel2	0,219	0,007	0,89	0,274
HD CAG + Htt CCG Genotyp Allel1x Allel2 (Interaktion)	0,216	0,004	0,51	0,395

Tab.3.20 Multiple lineare Regressionsanalyse berechnet mit motorischem Erkrankungsbeginn

Model (motorisches Erkrankungsalter)	R <sup>2</sup>	Δ R <sup>2</sup>	% unerklärter Varianz	p-Wert
HD CAG	0,276	-	-	<b>0,0001</b>
HD CAG + CAG normales Allel	0,276	-	-	0,905
HD CAG x CAG normales Allel (Interaktion)	0,276	-	-	0,921
HD CAG + MTHFR 677 Genotyp	0,280	0,004	0,55	0,453
HD CAG + MTHFR 1298 Genotyp	0,279	0,003	0,41	0,112
HD CAG + MS 2756 Genotyp	0,276	-	-	0,902
HD CAG + MSR 66 Genotyp	0,279	0,003	0,41	0,424
HD CAG + CBS 68 Genotyp	0,280	0,004	0,55	0,354
HD CAG + NOS1(2) Genotyp	0,285	0,009	1,24	0,122
HD CAG + nNOS Genotyp	0,287	0,011	1,52	0,670
Nos2a	0,279	0,003	0,41	0,530
HD CAG + 1NOS Genotyp	0,293	0,017	2,35	0,264
HD CAG + NOS3 Genotyp	0,280	0,004	0,55	0,240
HD CAG + GRIN2B Genotyp	0,314	0,038	<b>5,25</b>	<b>0,007</b>
HD CAG + GLUR6 Genotyp Allel1	0,284	0,008	1,10	0,209
HD CAG + GLUR6 Genotyp Allel2	0,281	0,005	0,69	0,324
HD CAG + GLUR6 Genotyp Allel1x Allel2 (Interaktion)	0,276	-	-	0,781
HD CAG + Htt2642 Genotyp	0,276	0	0,00	0,983
HD CAG + Htt Promotor Genotyp Allel1	0,278	0,002	0,28	0,525
HD CAG + Htt Promotor Genotyp Allel2	0,286	0,01	1,38	0,153
HD CAG + Htt Promotor Genotyp Allel1x Allel2 (Interaktion)	0,276	-	-	0,843
HD CAG + Htt CCG Genotyp Allel1	0,278	0,002	0,28	0,488
HD CAG + Htt CCG Genotyp Allel2	0,285	0,009	1,24	0,171
HD CAG + Htt CCG Genotyp Allel1x Allel2 (Interaktion)	0,279	0,003	0,41	0,435

## 4. Diskussion

1993 wurde die für den MH ursächliche Mutation, eine pathologisch verlängerte Expansion eines sich wiederholenden CAG-Basentriplets auf Chromosom 4, beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Länge dieses expandierten CAG-Blocks mit dem Erkrankungsalter negativ korreliert (*The Huntington Disease Collaborative Research Group* 1993). Verschiedene Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass das Erkrankungsalter aufgrund der CAG-Wiederholungen nicht zuverlässig vorhergesagt werden kann, da innerhalb der Gruppen einer bestimmten CAG-Repeatzahl eine breite Streuung des Erkrankungsalters gefunden wurde (Kremer *et al.* 1994). Welche Faktoren außerdem noch einen Einfluss auf ein verfrühtes oder verzögertes Erkrankungsalter haben könnten, wurde bisher nur ansatzweise in einzelnen Studien untersucht (Rubinsztein *et al.* 1997, Holbert *et al.* 2001). Daher könnten Polymorphismen in Genen, die möglicherweise in der Pathogenese des MH eine Rolle spielen, Hinweise auf die Ursachen von Unterschieden im Erkrankungsalter liefern. Aus diesen Erkenntnissen könnten neue Behandlungsstrategien für den MH entwickelt werden.

### 4.1 CAG-Wiederholungen und Erkrankungsalter

Die Ergebnisse, die bei der Charakterisierung der MH-Patientengruppe ermittelt wurden, bestätigen die negative Korrelation zwischen Erkrankungsalter und CAG-Repeatlänge auch für dieses selektive Klientel ( $R = -0,470$  und  $p = 0,01$ ). Bei Betrachtung der unterschiedlichen Längen der CAG-Wiederholungen fällt innerhalb einer CAG-Gruppe eine große Spannbreite im Erkrankungsalter auf, die schon durch Rosenblatt (2001) beschrieben wurde. So erkrankten Patienten mit beispielsweise 44 CAG-Wiederholungen zwischen dem 29. und 60. Lebensjahr. Die lineare Regressionsanalyse der expandierten CAG-Wiederholungen, welche die Abhängigkeit des Erkrankungsalters von der CAG-Anzahl darstellt, zeigt einen Einfluss von 21,2% ( $R^2 = 0,212$ ) bzw. 27,6% ( $R^2 = 0,276$ ) auf das Manifestationsalter mit einem p-Wert von 0,0001. Die 21,2 bzw. 27,6% stellen zahlenmäßig einen relativ geringen Wert da, jedoch handelt es sich bei der ausgewählten Patientengruppe um ein künstlich eng begrenztes Klientel mit nur 41 bis 45 CAG-Wiederholungen, so dass der geringe Einfluss der CAG's auf das

Erkrankungsalter vermutlich darauf zurückzuführen ist. Ähnliche Beobachtungen wurden von Duayo *et al.* 1993 gemacht. Duayo konnte den CAG-Wiederholungen unter 52 Wiederholungen nur einen Einfluss von ungefähr 20% auf das Erkrankungsalter zuschreiben. Ein Einfluss der CAG-Wiederholungen des nicht expandierten Allel auf den Erkrankungsbeginn wie kürzlich durch (Djousse and A. 2003) beschrieben, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden ( $R^2 = 0,216$ ;  $\Delta R^2 = 0,004$ ;  $p = 0,409$  bzw.  $R^2 = 0,276$ ;  $p = 0,921$  (s.3.6)).

Die statistisch ermittelte Abhängigkeit zwischen den expandierten CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter spiegelt sich einerseits zwar in der relativ eng gefassten untersuchten Patientengruppe mit 41 bis 45 Wiederholungen in der vorliegenden Arbeit wider, andererseits zeigt sich jedoch auch, dass eine Anwendung der Statistik auf die Praxis keine zutreffende Aussage über das Manifestationsalter zulässt.

#### 4.2 Polymorphismen im *Htt*-Gen

Die Auswertung der Ergebnisse für die Polymorphismen im *Htt*-Gen untermauern größtenteils die bereits veröffentlichten Ergebnisse. Eine Assoziation zwischen der Anzahl der CCG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter konnte, wie bereits auch u.a. durch Andrew (1994) beschrieben, nicht entdeckt werden. Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen zeigte im Einklang mit der bisher existierenden Literatur (Vuillaume 1998; Hecimovic 2002), dass 7 CCG-Wiederholungen auf dem expandierten Allel bei 90,7% (Vuillaume= 98,8%, Hecimovic= 94,6%) der MH-Patienten am häufigsten vertreten sind. Insgesamt herrschte der Genotyp 707 (d.h. auf beiden Allelen 7 CCG-*Repeats*) mit 58,3% (Vuillaume= 60,7%) vor. Auch die Korrelation der Ergebnisse der verschiedenen Genotyp-Gruppen untereinander, zeigte keine statistische Signifikanz.

Große Übereinstimmungen mit den bisherigen Publikationen weisen auch die Ergebnisse der Untersuchung des  $\Delta 2642$  Polymorphismus im *Htt*-Gen auf: Die Mehrzahl der MH-Patienten wies mit 55,63% (Vuillaume=54,8%) keine  $\Delta 2642$  Deletion an Kodonposition 2642 auf. 41,06% Patienten (Vuillaume=40,5%) waren heterozygot, 3,31% (Vuillaume=4,7%) homozygot für die Deletion. Ein Zusammenhang zwischen der  $\Delta 2642$  Deletion und einem verfrühten Manifestationsalter, wie von Vuillaume (1998) angenommen, konnte nicht bestätigt

werden. Vielmehr stehen die Ergebnisse mit den Beobachtungen von Novelletto *et al.* (1994) und Lucotte *et al.* (1996) in Einklang, die ebenfalls keine Abhängigkeit zwischen der Deletion und dem Erkrankungsalter feststellen konnten.

Die Ergebnisse des *Htt*-Promotors zeigen, wie bereits durch Coles (1997) beschrieben, dass der am weitesten verbreitete Haplotyp aus einem 6bp und zwei 20bp Wiederholungen besteht. So wiesen 145 (96,03%) der 151 untersuchten MH-Patienten diesen Genotyp auf. 1,99% der Patienten (Coles= 1,2%) zeigten auf einem Allel nur einen 20bp *Repeat*. Ein Vergleich der verschiedenen Genotyp-Gruppen war auf Grund der geringen Personenanzahl in 3 der 4 gefundenen Genotyp-Gruppen nicht möglich. Coles vermutete in der bereits zitierten Arbeit, dass ein 20bp *Repeat* über eine reduzierte Htt-Expression eine Verzögerung des Erkrankungsalters oder einen geringeren Schweregrad der Symptome vermittelt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen eine solche Vermutung nicht nahe, können sie aber wegen der kleinen Patientengruppe aus 3 Personen auch nicht eindeutig widerlegen. Eine Weiterführung der Studie mit einem entsprechend größeren Patientenkollektiv könnte zur Beantwortung der Fragen weiterhelfen.

### 4.3 MH und die Exzitotoxizitätstheorie

Der erste substanzielle Schritt in Richtung des Verständnisses der pathologischen Mechanismen, die dem Fortschreiten der MH-Erkrankung unterliegen, war die Demonstration, dass intrastriale Injektionen von Kainat ähnliche Veränderungen produziert wie diejenigen, die man bei MH beobachten kann. Dieses Modell wurde weitergehend verfeinert durch die Verwendung von Chinolinsäure, einem Agonisten an NMDA-Rezeptoren. Diese Erkenntnisse führten zu der Vermutung, dass glutamerge Überstimulation (Exzitotoxizität) eine zentrale Rolle in der Pathogenese von MH spielt. In der vorliegenden Arbeit wurden Polymorphismen in Genen untersucht, die im Zusammenhang mit der Exzitotoxizitätstheorie stehen. So wurde einerseits überprüft, ob Polymorphismen in Enzymen des Homocystein-Stoffwechsels eine vermehrte glutamerge Überstimulation auslösen könnten: Homocystein zählt zu den Aminosäuren mit exzitatorischer Wirkung an NMDA-Rezeptoren. Störungen im Stoffwechsel des HC könnten zu einer Hyperhomocysteinämie und somit zu einer glutamergen Überstimulation führen. Andererseits wurden außerdem Polymorphismen in Genen von

Glutamatrezeptoren und in Genen für Nitritoxidsynthasen untersucht, denen in der exzitotoxischen Theorie eine gewisse Bedeutung zukommt.

#### 4.4 MH und Homocystein (HC)

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch nicht untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen MH und Homocystein bzw. einer Hyperhomocysteinämie besteht. Allerdings gibt es Veröffentlichungen, die einen Zusammenhang von Hyperhomocysteinämie mit einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, dem Morbus Alzheimer, belegen. Um Einflüsse von HC bei MH zu untersuchen, wurden so Polymorphismen in den Genen von Enzymen des HC-Stoffwechsels untersucht, die verantwortlich sind für eine milde bzw. z.T. starke Erhöhung des HC-Spiegels im Blut. Es konnte kein Hinweis gefunden werden, dass die untersuchten Polymorphismen der MSR, MS und CBS einen Einfluss auf das Erkrankungsalter für MH haben. Allerdings zeigten MH-Patienten, die homozygot für den MTHFR 1298 A>C-Polymorphismus waren, einen um ungefähr 5 Jahre früheren Erkrankungsbeginn. Auch bei der geschlechtsspezifischen Aufteilung der Genotypen ließ sich diese Tendenz weiterhin beobachten. Allerdings umfasste die Gruppe der homozygoten C-Allelträger nur 11 Personen, so dass es sinnvoll erscheint, dieses Ergebnis noch einmal in einer größeren Studienpopulation zu überprüfen. Einflüsse der CAG-Repeatanzahl auf ein verfrühtes Erkrankungsalter der homozygoten Patienten, die im Mittel 43,36 CAG-Wiederholungen aufwiesen, konnten nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Hierbei würde es sich anbieten, eine solche Studie mit einem größeren Patientenkollektiv durchzuführen, die auch ein größeres Spektrum an CAG-Wiederholungen (z.B. zwischen 41 und 50 CAG-Wiederholungen) liefert. Neben der geringen Personenzahl in der Gruppe mit homozygotem Allelträgerstatus für den MTHFR 1298 A>C Polymorphismus spricht noch eine weitere Beobachtung für eine sinnvolle Ausweitung der Studie unter den genannten Bedingungen: bei einer Patientin dieser Gruppe (41 CAG-*Repeats*) ist das Erkrankungsalter mit 73 Jahren angegeben (s. Tab.3.6). Die Auswertung wäre statistisch noch eindeutiger ausgefallen, wenn diese Patientin sich nicht als Ausreißer in dieser Gruppe befunden hätte. Von einem früheren Erkrankungsbeginn durch das Merkmal „homozygoter C-Allelträger“ kann also in diesem Fall bei der oben genannten Patientin nicht gesprochen werden. Möglicherweise liegen bei der Patientin bisher nicht identifizierte modifizierende

Gene vor, die protektive Mechanismen fördern und somit den späten Erkrankungsbeginn trotz homozygotem Allelträgerstatus für den MTHFR 1298 A>C Polymorphismus erklären könnten.

Die Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsanalyse geben allerdings keinen Hinweis auf einen Einfluss des 1298-*MTHFR*-Polymorphismus auf das Erkrankungsalter ( $p= 0,189$  bzw.  $p= 0,112$ ). So zeigt der Polymorphismus nur einen 0,63 bzw. 0,41%igen Einfluss auf das Erkrankungsalter.

Beim Vergleich der Allelfrequenzen für den MTHFR 1298 A>C Polymorphismus bei den MH-Patienten mit den Allelfrequenzen, die bereits durch Geisel (2001) für gesunde Deutsche beschrieben wurden (s.Tab.4.1), fällt auf, dass bis auf die Frequenz des C-Allels bei dem MTHFR 1298 Polymorphismus und des G-Allels bei dem MSR 66 Polymorphismus (s. weiter unten) keine wesentlichen Unterschiede bestehen. Die Frequenz des C-Allels beim MTHFR 1298-Polymorphismus wurde nochmals in einer eigenen Kontrollgruppe gesunder Personen bestimmt und zeigt eher eine Übereinstimmung mit der Frequenz, die bereits für die MH-Patienten beschrieben wurde. Auffällig war nur, dass das Merkmal „homozygoter C-Allelträger“ doppelt so häufig in der Kontrollgruppe vertreten war wie in der Gruppe der MH-Patienten. Die Genfrequenzen aller untersuchten Polymorphismen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

**Tab.4.1 Polymorphismen und ihre Allelfrequenzen**

Polymorphismus	Allelfrequenzen (Geisel 2001)	Allelfrequenzen MH-Patienten	Allelfrequenzen Kontrollgruppe
MTHFR 677-T	0,34	0,35	Nicht untersucht
MTHFR 1298-C	0,23	0,30	0,34
MS 2756-G	0,19	0,20	Nicht untersucht
MSR 66-G	0,46	0,38	Nicht untersucht
CBS 68bp Insertion	0,08	0,07	Nicht untersucht

Der MTHFR 1298 A>C Polymorphismus befindet sich in der potentiell regulatorischen Domäne des Enzyms und führt bis zu einer 50-60% verringerten Enzymaktivität (Geisel 2001). Diese verminderte Aktivität führt zu einem Anstieg der Homocysteinkonzentration im Plasma. Die Wirkungen von Homocystein als Agonist an NMDA-Rezeptoren wurde bereits in der Einleitung (s.1.10.2) beschrieben. Um den durch die verminderte MTHFR-Aktivität bedingten erhöhten

Homocysteinspiegel zu verringern, könnten MH-Patienten durch eine langzeitige und regelmäßige Folsäure-Substitution profitieren, die den Metabolismus von Homocystein zu Methionin katalysiert und somit (Malinow 1998; Malinow 1999) fördert. Eine zusätzliche Gabe von Vitamin B<sub>12</sub> und Pyridoxin würde sich ebenfalls positiv auf die Enzymaktivität ausüben (Van Guldener 2001). Die Behandlung einer Hyperhomocysteinämie könnte demnach eine neuroprotektive Strategie darstellen, die zu einer möglichen Verzögerung des Krankheitsbeginns bei MH führen könnte.

Für ein Routineverfahren wäre es möglicherweise einfacher und auch kostengünstiger, die Bestimmung des HC-Spiegels im Serum von MH-Patienten vorzunehmen, anstatt die Erkrankten mit molekulargenetischen Methoden auf den MTHFR-Polymorphismus zu untersuchen. Diese Vorgehensweise ist aber nicht sinnvoll, da der HC-Spiegel aufgrund der bei MH oft notwendigen neuroleptischen bzw. antidepressiven Medikation starken Schwankungen unterworfen ist, da verschiedene Wirkstoffe hemmende bzw. induzierende Eigenschaften auf den Folatstoffwechsel bzw. den HC-Spiegel haben (Apeland 2001). Aus diesem Grund wurde bei unseren Patienten auf eine Bestimmung der Homocysteinkonzentration im Blut verzichtet.

Im *MTHFR*-Gen wurde darüber hinaus ein weiterer Polymorphismus untersucht: der Basenaustausch C>T an Position c.677 in Exon 4 führt auf AS-Ebene zu einem Austausch von Alanin zu Valin. Dieser AS-Austausch führt zu einer thermolabilen Form des Enzyms mit einer um 50% verringerten Aktivität bei 37°C (Frosst 1995). Diese thermolabile MTHFR-Enzymvariante führt in Abhängigkeit vom Folsäurespiegel zu milden HC-Erhöhungen von im Mittel 5mmol/l im Serum von homozygoten Patienten. Der erhöhte Homocystein-Spiegel ließ sich bei Erwachsenen mit thermolabiler MTHFR durch Folsäurezufuhr wieder normalisieren (Blom 1998). Ein Einfluss dieses MTHFR-Polymorphismus auf das Erkrankungsalter ließ sich indes im Rahmen der vorliegenden Arbeit statistisch nicht nachweisen ( $p=0,595$  bzw.  $p=0,785$ ). Darüber hinaus konnte auch kein Hinweis gefunden werden, dass die untersuchten Polymorphismen der *MSR*, *MS* und *CBS* einen Einfluss auf das Erkrankungsalter für MH haben. Für die durch Boutell (1998) beobachtete Interaktion zwischen Htt und CBS liefern die Ergebnisse dieser Arbeit also keine weiteren Anhaltspunkte.

Da diese Polymorphismen ebenso wie der MTHFR c.1298 A>C Polymorphismus zu einem Anstieg des HC-Spiegels führen, im Gegensatz zu diesem pathogenetisch aber nicht relevant zu sein scheinen, könnte man folgern, dass die Hyperhomocysteinämie allein keine für die morphologischen Veränderungen der Neurone wichtige Rolle spielt. Möglicherweise kommt es aber auch erst ab einem bestimmten HC-Spiegel zu MH-charakteristischen Veränderungen der Zelle. Denkbar ist in diesem Zusammenhang, dass die untersuchten Polymorphismen der *MSR*, *MS*, *CBS* und der MTHFR c.677 erst durch die Kombination mit bisher noch nicht untersuchten, selbst funktionell relevanten Polymorphismen des jeweiligen Gens pathogenetisch bedeutsam werden.

#### 4.5 MH und Nitritoxidsynthasen-Polymorphismen

Die Beobachtung, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren eine Generierung von NO bewirkt, führte zu der Überlegung, dass NO eine besondere Rolle in der Neurotoxizität spielen könnte. Durch eine gesteigerte NO-Produktion kommt es zur vermehrten Bildung von Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), einem sehr reaktiven und toxischen Molekül. Eine andere Untersuchung zeigte beispielsweise, dass Peroxynitrit einen Glutamat-Transporter hemmt und dadurch die *Uptake*-Funktion für Glutamat reduziert (Trotti *et al.* 1996). So bleiben die Glutamatkonzentrationen im synaptischen Spalt erhöht, was zu einer exzessiven Aktivierung der NMDA-Rezeptoren führt. Die Ergebnisse von Ferrante (1985) lassen jedoch eher auf eine Schutzfunktion vor dem Zelltod durch NO schließen: in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die striatale Neuronen von MH-Erkrankten, die NADPH-Diaphorase-Aktivität aufwiesen, vom Zelltod verschont blieben (Ferrante *et al.* 1985). NADPH-Diaphorase ist ein Enzym, das man sich zum Nachweis von nNOS zunutze macht und als histologischen Marker einsetzt. Die nNOS-positiven und damit auch NO-enthaltenden Zellen wurden vom Zelltod relativ verschont. In der vorliegenden Arbeit wurden Polymorphismen in den Nitritoxidsynthasen untersucht, um einen positiven oder negativen Einfluss dieser Polymorphismen auf den Verlauf des MH zu überprüfen. Keiner der untersuchten Polymorphismen lieferte aber statistisch signifikante Ergebnisse. Eine Bedeutung der NOS in der Pathogenese des MH kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, da andere Polymorphismen in den NOS eine Rolle spielen könnten.

#### 4.6 MH und Glutamatrezeptor-Polymorphismen

Glutamatrezeptoren spielen bei der Vermittlung der exzitatorischen Neurotoxizität eine wesentliche Rolle, da sie den Startpunkt für die exzitatorische Kaskade darstellen. Sie sind verantwortlich dafür, dass sie bei Stimulierung  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle einströmen lassen, das für die Aktivierung verschiedener Enzyme wie u.a. auch die Nitritoxidsynthasen (s.4.5) zuständig ist.

Bei der Untersuchung des TAA-*Repeats* im *GluR6*-Gen, das für einen Ampa-Kainat-Glutamat-Rezeptor kodiert, wurden 7 verschiedene Allele (PCR-Fragmentlängen im Bereich von 140 bis 158 Basenpaaren) und 13 verschiedene Genotypen gefunden. Die Patienten wurden an Hand ihrer Genotypen in Gruppen eingeteilt. Da sich aber eine inhomogene Verteilung der Patientenzahl auf diese Gruppen ergab (die Genotypen 143/146 und 146/146 kamen beispielsweise nur einmal im gesamten Patientenkollektiv vor), war es nicht möglich, die einzelnen Genotypgruppen miteinander zu vergleichen. Die Ergebnisse hätten keine statistisch verwertbare Aussage erlaubt. Da ein Vergleich der verschiedenen Genotypen untereinander nicht möglich war, wurde die von MacDonald (1999) aufgestellte Vermutung überprüft, dass das 155-Allel mit einem früheren Erkrankungsbeginn assoziiert sei. Zu diesem Zweck wurden alle Genotypen, die nicht das 155-Allel aufwiesen, in einer Gruppe zusammengefasst und mit denen verglichen, die das 155-Allel trugen. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Einfluss des 155-Allels nachgewiesen werden ( $p=0,484$ ). Auch die Zusammenfassung der neun Patienten, die das 155-Allel trugen, in einer Gruppe mit den zwei Patienten mit dem 158-Allel konnte die von MacDonald geäußerte Vermutung nicht bestätigen ( $p=0,201$ ). Um statistisch eindeutiger Aussagen treffen zu können, wäre eine Wiederholung mit einem größeren Patientenkollektiv sinnvoll.

Der 2664 C>T Polymorphismus im Gen der GRIN2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors führt zu keiner Veränderung in der AS-Sequenz (Hong 2001). Es wäre aber dennoch möglich, dass der Basenaustausch mit anderen funktionell relevanten Polymorphismen dieses Gens gekoppelt ist. Die Untersuchung dieses Polymorphismus zeigte, dass MH-Patienten, die homozygot für das T-Allel sind, signifikant früher erkranken ( $p=0,005$ ) als Patienten, die homozygot für das C-Allel sind. Ferner erkranken heterozygote Allelträger im Trend eher als homozygote C-

Allelträger ( $p=0,052$ ). Auch wenn der p-Wert formal nicht signifikant ist, zeigt er dennoch deutliche Tendenz zu früherem Erkrankungsalter an.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte in der Patientengruppe keine auffällige Verteilung eines Allels oder Genotyps gefunden werden. Alle Allelfrequenzen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Bemerkenswert war hingegen die Tatsache, dass sich sowohl die Genotypverteilung als auch die Allelfrequenzen in der MH-Gruppe wie in der Kontrollgruppe von den beschriebenen Verteilungen und Frequenzen z.T. erheblich unterscheiden: Hong beschrieb für eine Gruppe von chinesischen Schizophreniepatienten eine Allelfrequenz für das C-Allel von 0,495 und für das T-Allel von 0,505. 25% der untersuchten Patienten wiesen dabei den homozygoten Wildtyp (CC) auf. 49% waren heterozygot, 26% homozygot für das T-Allel. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Allelfrequenz beträgt sowohl bei den MH-Patienten als auch bei den Kontrollen für das C-Allel 0,70 und für das T-Allel 0,30. Jeweils ca. 48% der Patienten und Kontrollen waren homozygot für das Wildtyp-Allel, 42 bzw. 44% waren heterozygot und ungefähr 9% homozygot für das T-Allel. Dies weist auf ethnische Unterschiede der Genotyp- bzw. Allelverteilung hin.

Die mittlere CAG-Wiederholungszahl bei diesen für den Polymorphismus homozygoten Patienten betrug 42,62. Nicht bei allen Patienten dieser Gruppe kann daher sicher ausgeschlossen werden, dass ein frühes Erkrankungsalter durch eine hohe CAG-Repeatanzahl bedingt ist. Es bietet sich daher an, die Studie unter veränderten Bedingungen durchzuführen, um zu verifizieren, dass das Ergebnis für den 2664 C>T Polymorphismus des NMDA-Rezeptors nicht durch eine gleichzeitig vorhandene hohe CAG-Repeatanzahl bei diesen Patienten verfälscht wird. Ähnlich wie beim MTHFR 1298 A>C Polymorphismus (s.4.2) könnte und sollte die Untersuchung mit einem größeren Patientenkollektiv wiederholt werden. Auch die Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsanalyse weisen auf einen deutlichen Einfluss des *GRIN2B*-Polymorphismus hin ( $p= 0,002$  bzw.  $p= 0,007$ ). Sowohl die Berechnung mit dem allgemeinen als auch mit dem motorischen Manifestationsalter zeigt, dass 6,72 bzw. 5,52% für die Varianz im Erkrankungsalter verantwortlich sind. Gegebenenfalls könnte der Einfluss des Polymorphismus noch größer sein, wenn man ein Patientenkollektiv auswählt, welches ein größeres CAG-Wiederholungsspektrum (z.B. zwischen 41 und 100) bietet.

Da beide statistischen Analysen (MWU und Regressionsanalyse) eindeutige Assoziationen mit dem Erkrankungsalter aufzeigen, ist davon auszugehen, dass der Polymorphismus einen bedeutenden Stellenwert bei den Einflüssen auf die MH-Entwicklung einnimmt. Um diese Ergebnisse weitergehend abzusichern, böte sich zudem eine Expressionstudie an, um zu untersuchen, ob der Polymorphismus - auch wenn er nicht die AS-Sequenz verändert - verantwortlich für eine verminderte oder vermehrte Expression der GRIN2B ist.

## 5. Ausblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten

Die Bemühungen zahlreicher Neurowissenschaftler zielen darauf ab, Behandlungsmöglichkeiten für MH zu definieren, die den Krankheitsausbruch um möglichst viele Jahre hinauszögern und / oder den Krankheitsverlauf verlangsamen, so dass eine möglichst normale Lebenserwartung und verbesserte Lebensqualität erreicht werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Exzitotoxizitätstheorie als wichtiger Ansatzpunkt für die Pathogenese des MH in den Vordergrund gestellt. Die Bedeutung dieser Theorie spiegelt sich auch in klinischen Studien wider: Viele bislang durchgeführten klinischen Untersuchungen orientierten sich nämlich an der Hypothese, dass energetische Defizite und exzitotoxische Mechanismen zum selektiven Neuronenuntergang bei dieser Erkrankung beitragen. Klinisches Ziel ist bei allen diesen Untersuchungen die Verlangsamung der Krankheitsprogression. Dies trifft auch auf zwei zurzeit durchgeführte große randomisierte Studien zu (CARE-HD mit Remacemide bei 350 Patienten bzw. EHDl-TRIAL mit Riluzol bei 450 Patienten).

Die Bedeutung, die der Exzitotoxizität bei der Entstehung und dem Verlauf des MH zugesprochen wird, zeigt sich auch in einem anderen Ansatz: mit dem Ziel, Neurone vor einer Überstimulation durch die exzitatorische Aminosäure Glutamat zu schützen, werden schon seit längerem Therapiemöglichkeiten getestet, MH-Patienten mit Hemmstoffen des Glutamat-Transmittersystems zu behandeln. Effektive Substanzen sind jedoch bisher mit dem Problem behaftet, neuropsychologische Nebenwirkungen hervorzurufen. Daneben gibt es mehrere Studien zur Neuroprotektion bei MH, die ohne den klinischen Nachweis einer günstigen Beeinflussung des Krankheitsverlaufs (Shoulson 1989; Kremer 1999) blieben.

Auch eine Begrenzung der Glutamatfreisetzung oder eine partielle Antagonisierung von Glutamatrezeptoren, die selektiv auf vulnerablen Neuronen exprimiert werden, könnte dem Zweck dienen, die Einwirkung der exzitatorischen Aminosäuren auf das Neuron zu begrenzen. Dadurch könnte der neuronale Zellverlust verlangsamt werden. Diese therapeutischen Ansatzpunkte lassen sich an transgenen Tiermodellen präklinisch überprüfen.

Andere klinische Überlegungen zielen darauf ab, den Energiestoffwechsel der Neurone zu verbessern. Dabei wird Stoffen wie Koenzym Q oder Kreatin, die den

mitochondrialen Stoffwechsel optimieren, eine vielversprechende Bedeutung beigemessen. So konnte gezeigt werden, dass bei MH Patienten die Konzentration von Laktat, dem Stoffwechselprodukt der anaeroben Glykolyse, der damit ein Marker für die ineffektive Energiegewinnung ist, im Gehirn gegenüber Kontrollpersonen erhöht ist. Durch eine Behandlung mit Koenzym Q konnte die Laktatkonzentration gesenkt werden.

Ob Transplantationen striatalen Gewebes einen funktionellen Gewinn mit sich bringen, müssen weitere Beobachtungen zeigen (Bachoud-Levi 2000; Gaura 2003). Theoretisch besteht noch die Möglichkeit, auf der DNA-Ebene die krankheitsverursachende unphysiologische Zahl an CAG-Wiederholungen zu eliminieren. Dies ließe sich aber nur durch Keimzellmanipulation, welche derzeit international verboten ist, realisieren. Mit Hilfe eines rekombinanten Vektors, der zum 5'-Ende des *Htt*-Gens homolog ist und eine physiologische CAG-Repeatzahl enthält, könnte versucht werden, die Mutation aufzuheben.

Auf der RNA-Ebene könnte die Transkription und Translation des mutierten *Htt*-Gens, z.B. durch Ribozyme unterdrückt werden. Für eine Interaktion auf Proteinebene wird bereits sehr aktiv nach Substanzen (z.B. spezifischen Antikörpern (Heiser 2000)) gesucht, die gezielt die bei MH zu beobachtende Bildung von Einschlusskörperchen behindern: wenn dadurch der neurodegenerative Prozess gestoppt werden könnte, wäre ein kausaler Zusammenhang zwischen der Aggregatbildung und der Neurodegeneration bewiesen.

Die Hemmung der Polyglutamin-induzierten Proteinaggregation durch Disaccharide wie z.B. Trehalose könnte ebenfalls ein Therapieansatz sein. Eine aktuelle Studie (Tanaka *et al.* 2004) zeigt, dass die orale Administration von Trehalose in einem transgenen MH-Mausmodell zu einer verminderten Aggregation der expandierten Polyglutaminketten führt, und es gleichzeitig zu einer Verbesserung der motorischen Dysfunktionen und einer Verlängerung der Lebenszeit kommt.

## 6. Zusammenfassung

Morbus Huntington (MH) ist eine autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, die durch eine Mutation im *Huntingtin(Htt)*-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 bedingt ist und letal verläuft. Der genetische Defekt beruht auf einer pathologischen Verlängerung einer variablen Anzahl eines CAG-Basentriplets. Durch die CAG-Wiederholungen entsteht ein Polyglutamintrakt am NH<sub>2</sub>-Terminus des Htt-Proteins. Klinisch ist die Erkrankung durch Bewegungsstörungen, Persönlichkeitsveränderungen und kognitiven Verfall charakterisiert. Neuropathologisch zeichnet sich die Erkrankung durch einen selektiven Verlust von Neuronen - hauptsächlich in den Basalganglien und im Cortex - aus.

Das Ausmaß der CAG-Verlängerung korreliert negativ mit dem Alter bei Krankheitsbeginn: je höher die CAG-Wiederholungszahl, desto früher kommt es zum Ausbruch der Erkrankung. Ebenfalls zeigte sich jedoch, dass Individuen mit gleicher *Repeatlänge* signifikante Unterschiede in ihrem Manifestationsalter aufweisen können. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass noch andere Faktoren, z.B. modifizierende Gene, einen bedeutenden Einfluss auf die Effekte des expandierten Htts haben könnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Polymorphismen in Genen untersucht, die einen modifizierenden Einfluss auf den Verlauf des MH haben könnten. Die Auswertungen der drei Polymorphismen, die sich im *Htt*-Gen befinden, stehen im Einklang mit den bereits in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen und zeigen keinen Einfluss auf einen verfrühten oder verzögerten Erkrankungsbeginn.

Eine Mehrzahl der untersuchten Gene steht in Zusammenhang mit der sog. Exzitotoxizitätstheorie, einem Modell, das die neuropathologischen Veränderungen der Neurone bei MH auf eine Überstimulation der Zellen durch exzitatorische glutamerge Aminosäuren zu erklären versucht und dadurch einen besonderen Stellenwert einnimmt. Eine dieser exzitatorischen und glutamatähnlichen Substanzen könnte die im Körper weitverbreitete Aminosäure Homocystein (HC) sein, die vor allem in hohen Konzentrationen zu einer Überstimulation der Neurone führen könnte. Daher wurden Polymorphismen in Genen von Enzymen des HC-Stoffwechsels untersucht, die darin übereinstimmen,

dass sie alle zu einer leichten bis mäßigen Erhöhung des HC-Spiegels führen. Von den untersuchten Polymorphismen in den Genen *MSR*, *MS*, *CBS* und *MTHFR* (1298 A>C und 677 C>T) zeigte lediglich der 1298 A>C *MTHFR*-Polymorphismus einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Erkrankungsbeginn im MWU-Test: MH-Patienten, die den 1298 A>C *MTHFR*-Polymorphismus aufweisen, erkranken durchschnittlich fünf Jahre früher als diejenigen, die den Polymorphismus nicht tragen. Da vom untersuchten Kollektiv nur 11 Patienten homozygot für das seltenere C-Allel waren, sollte das Ergebnis mit einer größeren Patientenanzahl bestätigt werden. Schnelle und kostengünstige Korrektur eines erhöhter HC-Spiegel ließe sich durch regelmäßige Folsäuregaben bewirken und würde so bei Bestätigung der vorliegenden Ergebnisse zu einem verspäteten Erkrankungsalter führen. Die multiple lineare Regressionsanalyse zeigt allerdings keinen signifikanten Einfluss dieses Polymorphismus auf das Erkrankungsalter.

Die weiteren untersuchten Polymorphismen in den Genen der Nitritoxidsynthasen und im Gen für den GluR6-Rezeptor, die auch im Zusammenhang mit der Exzitotoxizitätstheorie stehen, zeigten keine auffälligen Einflüsse auf das Erkrankungsalter, was aber deren Bedeutung in der exzitotoxischen Kaskade nicht minder wichtig macht.

Einen Zusammenhang mit dem Manifestationsalter zeigte der untersuchte 2664 C>T Polymorphismus in der GRIN2B Untereinheit des NMDA-Rezeptors, der bei der Vermittlung der exzitatorischen Neurotoxizität eine wesentliche Rolle spielt. Obwohl der Polymorphismus zu keiner Veränderung der AS-Sequenz führt, scheint er dennoch indirekt Auswirkungen auf das Erkrankungsalter zu haben. So erkranken MH-Patienten, die homozygot für das T-Allel sind, signifikant um im Mittel ca. 6 Jahre eher als Patienten, die homozygot für das C-Allel sind. Da auch hier die Patientengruppe der homozygoten T-Allelträger mit einer Personenzahl von n=14 relativ klein ist, bietet sich ebenfalls eine Ausweitung der Untersuchung auf ein größeres Patientenkollektiv an. Auch die multiple lineare Regressionsanalyse zeigte einen eindeutigen Einfluss auf den Erkrankungsbeginn. So erklärt der Polymorphismus im untersuchten Patientenkollektiv eine 6,72 bzw. 5,25%ige Varianz im Erkrankungsalter ( $p=0,002$  bzw.  $0,007$ ).

---

## 7. Literaturverzeichnis

- 1) ACMG/ASHG Statement (1998). "Laboratory guidelines for Huntington Disease genetic testing." Am J Hum Genet **62**: 1243-1247.
- 2) Albin, R., Greenamyre, J. (1992). "Alternative excitotoxic hypotheses." Neurology **42**: 733-738.
- 3) Albin, R.L., Tagle, D.A. (1995). "Genetics and molecular biology of Huntington's disease." Trends Neurosci **18**: 11-14.
- 4) Almqvist, E.W., Bloch, M., Brinkmann, R. (1999). "A worldwide assessment of the frequency of suicide, suicide attempts, or psychiatric hospitalization after predictive testing for Huntington disease." Am J Hum Genet **64**: 1293-1304.
- 5) Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Barnes, G., Bates, G.P., Lin, C.S., Srinidhi, J., Baxendale, S., Hummerich, H., Lehrach, H., Altherr, M. (1994). "Structure and expression of the Huntington's disease gene: Evidence against simple inactivation due to expanded CAG repeat." Somatic Cell Mol Genet **20**: 27-38.
- 6) Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M.A. (1993). "The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease." Nat Genet **4**: 398-403.
- 7) Andrew, S.E., Goldberg, Y. P., Hayden, M. R. (1997). "Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders." Hum Mol Genet **6**: 2005-2010.
- 8) Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Theilmann, J., Zeisler, J., Hayden, M.R. (1994). "A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing." Hum Mol Genet **3**: 65-67.

- 9) Apeland, T., Mansoor, M.A., Strandjord, R.E. (2001). "Antiepileptic drugs as independent predictors of plasma total homocysteine levels." Epilepsy Res **47**: 27-35.
- 10) Bachoud-Levi, A.C., Remy, P., Nguyen, J.P. *et al.* (2000). "Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neuronal transplantation." Lancet **356**: 1975-1979.
- 11) Beal, M.F. (1995). "Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases." Ann Neurol **38**: 357-366.
- 12) Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Rosen, B.R., Hyman, B.T. (1993). "Neurochemical and histological characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid." J Neurosci **13**: 4181-4192.
- 13) Beal, M. F., Ferrante, R.J., Swartz, K.J., Kowall, N.W. (1991). "Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease." J Neurosci **11**: 1649-1659.
- 14) Beal, M.F., Henshaw, D.R., Jenkins, B.G., Rosen, B.R., Schulz, J.B. (1994). "Coenzyme Q10 and nicotinamide block striatal lesions produced by the mitochondrial toxin malonate." Ann Neurol **36**: 882-888.
- 15) Becher, M.W., Kotzuk, J.A., Sharp, A.H., Davies, S.W., Bates, G.P. (1998). "Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length." Neurobiol. Dis. **4**: 387-397.
- 16) Behl, C., Moosmann, B. (2001). "Freie Radikale und Antioxidantien." in Grundlagen der klinischen Neuroprotektion, UNI-MED-Verlag, 2001: 46-54.

- 17) Block, F., Kunkel, M., Schwarz, M. (1993). "Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performances in rats." Neurosci Lett **149**: 126-128.
- 18) Blom, H.J. (1998) "Mutated 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and moderate hyperhomocysteinaemia." Eur J Pediatr. **157** Suppl 2:S131-4.
- 19) Boutell, J.M., Wood, J.D., Harper, P.S., Jones, A.L. (1998). "Huntingtin interacts with cystathionine beta-synthase." Hum Mol Genet **7**(3): 371-8.
- 20) Browne, S.E., Beal, M.F. (1994). "Oxidative damage and mitochondrial dysfunction in neuro-degenerative diseases." Biochem Soc Trans **22**: 1002-1006.
- 21) Browne, S.E., Bowling, A.C., MacGarvey, U., Baik, M.J., Berger, S.C., Muqit, M.M., Bird, E.D., Beal, M.F. (1997). "Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia." Ann Neurol **41**: 646-653.
- 21a) Brune, N., Andrich, J., Gencik, M., Saft, C., Müller, T., Valentin, S., Przuntek, H., Epplen, J.T. (2004) "Methyltetrahydrofolate reductase polymorphism influences onset of Huntington's disease." J Neural Transmission (*in press*)
- 22) Butterworth, N.J., Williams, L., Bullock, J.Y., Love, D.R., Faull, R., Dragunow, m. (1998). "Trinucleotide (CAG) repeat length is positively correlated with the degree of DNA fragmentation in Huntington's disease striatum." Neurosci **87**: 49-53.
- 23) Cepeda, C., Ariano, M.A., Clavert, R., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Levine, M.S. (2001). "NMDA receptor function in mouse models of Huntington's disease." J Neurosci Res **66**: 525-539.
- 24) Cha, J.H. (2000). "Transcriptional dysregulation in Huntington's disease." Trends Neurosci **23**: 387-392.

- 25) Cha, J.H., Kosinski, C.M., Kerner, J.A., Alsdorf, S.A., Mangiarini, L., Davies, S.W., Penney, J.B., Bates, G.P., Young, A.B. (1998). "Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene." Proc Natl Acad Sci USA **95**: 6480-6485.
- 26) Chen, M., Ona, V.O., Li, M., Ferrante, R.J., Vonsattel, J.P., Cha, J.H., Friedlander, R.M. (2000). "Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington's disease." Nature Med **6**: 797-801.
- 27) Chiu, H.J., Wang, Y.C., Liou, Y.J., Lai, I.C., Chen, J.Y. (2003). "Association analysis of the genetic variants of the N-methyl D-aspartate receptor subunit 2b (NR2b) and treatment-refractory schizophrenia in the Chinese." Neuropsychobiology **47**: 178-81.
- 28) Choi, D. W. (1987). "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system." Neuron **1**: 623-634.
- 29) Cicchetti, F., Parent, A. (1996). "Striatal interneurons in Huntington's disease: selective increase in the density of Calretinin-immunoreactive medium-sized neurons." Mov Disord **11**: 619-626.
- 30) Coles, R., Caswell, R., Rubinzstein, D.C. (1998). "Functional analysis of the Huntington's disease (HD) gene promotor." Hum Mol Genet **7**: 791-800.
- 31) Coles, R., Leggo, J., Rubinsztein, DC (1997). "Analysis of the 5' upstream sequence of the Huntington's disease (HD) gene shows six new rare alleles which are unrelated to the age at onset of HD." J Med Genet **34**: 371-374.
- 32) Collingridge, G.L., Lester, R.A.J. (1989). "Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system." Pharmacol Rev **40**: 143-207.

- 33) Cooper, A., Sheu, K-F., Burke, J.R., Onodera, O., Strittmatter, W.J., Roses, A.D., Blass, J.P. (1997). "Transglutaminase-catalyzed inactivation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by polyglutamine domains of pathological length." Proc Natl Acad Sci USA **94**: 12604-12609.
- 34) Coyle, J., Schwarcz, R. (1976). "Lesions of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's Chorea." Nature **263**: 244-246.
- 35) Curtis, D.R., Philis, J.W., Watkins, J.C. (1959). "Chemical excitation of spinal neurons." Nature **183**: 611 - 612.
- 36) Curtis, D.R., Watkins, J.C. (1960). "The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids." J Neurochem **6**: 117-141.
- 37) Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M. (1997). "Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice for the HD mutation." Cell **90**: 537-548.
- 38) Dawson, V.L., Dawson, T.M. (1996). "Nitric oxide neurotoxicity." J Chem Neuroanat **10**: 179-190.
- 39) Deckel, A.W., Cohen, D., Duckrow, R. (1998). "Cerebral blood flow velocity decreases during cognitive stimulation in Huntington's disease." Neurology **51**: 1576-1583.
- 40) Deckel, A.W., Duffy, J.D. (2000). "Vasomotor hyporeactivity in the anterior cerebral artery during motor activation in Huntington's disease patients." Brain Res **872**: 258-261.
- 41) DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. (1995). "Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons." Neuron **14**: 1075-1081.

- 42) DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Davies, S., Bates, G., Vonsattel, J., Aronin, N. (1997). "Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain." Science **277**: 1990-1993.
- 43) Diggers, W. J., Holmquist, G.P., LeDoux, S.P., Wilson, G.L. (1997). "Mapping frequencies of endogenous oxidative damage and the kinetic response to oxidative stress in a region of rat mtDNA." Nucleic Acids Res **25**: 4362-4369.
- 44) Djousse, L., Knowlton, B., Hayden, M., Almqvist, E.W., Brinkman, R., Ross, C., Margolis, R., Rosenblatt, D. A., A., Dode, C., Morrison, P.J., Novelletto, A., Frontali, M., Trent, R.J.A., McCusker, E., Gómez-Tortosa, E., Mayo, D., Jones, R., Zanko, A., Nance, M., Abramson, R., Suchowersky, O., Paulsen, J., Harrison, M., Yang, Q., Cupples, L.A., Gusella, J.F., MacDonald, M.E. and Myers, R.H. (2003). "Interaction of Normal and Expanded CAG Repeat Sizes Influences Age at Onset of Huntington Disease." Am J Med Genet **119**: 279-282.
- 45) Duayo, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F. (1993). "Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease." Nat Genet **4**: 387-392.
- 46) Duayo, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., MacDonald, M.E. (1995). "Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog (Hdh)." Science **269**: 407-410.
- 47) Dugan, L. L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Handran, S.D., Goldberg, M.P., Choi, D.W. (1995). "Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate." J Neurosci **15**: 6377-6388.
- 48) Durr, A., Hahn-Barma, V., Brice, A., Pecheux, C., Dode, C., Feingold, J. (1999). "Homozygosity in Huntington's disease." J Med Genet **36**: 172-173.
- 49) Epplen, J.T., Gencik, M., Epplen, A., Andrich, J., Saft, C., Przuntek, H. (2000). "Morbus Huntington - a human genetic model disease." Cytogenet Cell Genet **91**: 90-96.

- 50) Farrer, L.A. (1986). "Suicide and attempted suicide in Huntington disease: implications for preclinical testing of persons at risk." Am J Med Genet **24**: 305-331.
- 51) Feldmeyer, D., Kask, K., Brusa, R., Kornau, H.-C. (1999). "Neurological dysfunction in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B." Nat Neurosci **2**: 57-64.
- 52) Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Beal, M.F., Bird, E.D., Richardson, E.P., Martin, J.B. (1985). "Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease." Science **230**: 561-563.
- 53) Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Beal, M.F., Martin, J.B., Bird, E.D., Richardson, E.P. (1987). "Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease." J Neuropathol Exp Neurol **46**: 12-27.
- 54) Folstein, S. E. (1989). "Huntington's Disease: A Disorder of Families." The John Hopkins University Press.
- 55) Foroud, T., Gray, J., Ivashina, J., Conneally, P.M. (1999). "Differences in duration of Huntington's disease based on age of onset." J Neurol Neurosurg Psychiatry **66**: 52-56.
- 56) Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Shepard, C.A., Matthews, R.G. (1995). "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase." Nat Genet **10**: 111-3.
- 57) Galpern, W.R., Matthews, R.T., Beal, M.F., Isacson, O. (1996). "NGF attenuates 3-nitrotyrosin formation in a 3-NP model of Huntington's disease." Neuroreport **7**: 2639-2642.
- 58) Geisel, J., Zimbelmann, I., Schorr, H., Knapp, J-P, Bodis, M., Hübner, U., Herrmann, W. (2001). "Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemie." Clin Chem Lab Med **39**: 698-704.

- 59) Gervais, F.G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Metzler, M., Hackam, A.S., Tam, J., Vaillancourt, J.P., Houtzager, V., Rasper, D.M., Roy S., Hayden, M.R., Nicholson, D.W. (2002). "Recruitment and activation of caspase-8 by the huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi." Nat Cell Biol. **4**: 95-105.
- 60) Goldberg, Y.P., Nicholson, D.W., Rasper, D.M. (1996). "Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract." Nat Genet **13**: 442-449.
- 61) Gordinier, A.L., Deckel, A.W. (2000). "Differential effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on symptom progression and peroxynitrite formation in R6/2 mice transgenic for Huntington's disease." Soc Neurosci Abstr **26**: 498.
- 62) Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., Schapira, A.H. (1996). "Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus." Ann Neurol **39**: 385-389.
- 63) Gusella, J.F., Mac Donald, M.E. (1996). "Trinucleotide instability: a repeating theme in human inherited disorders." Annu Rev Med **47**: 201-209.
- 64) Gusella, J. F., Wexler N. S., Conneally P.M. (1983). "A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease." Nature **306**: 234 - 238.
- 65) Gutekunst, C.A., Levey, A.I., Heilmann, G.J. (1995). "Identification and localisation of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies." Proc Natl Acad Sci USA **92**: 8710-8714.
- 66) Harper, P. S. (1992). "The epidemiology of Huntington's disease." Hum Genet **89**: 365 - 376.
- 67) Harper, P. S. (1991). "Huntington's disease." in : Harper, P.S., ed. London: WB Saunders Company Ltd. 1991 pp.127-139.

- 68) Harrington, K.M., Kowall, N.W. (1991). "Parvalbumin immunoreactive neurons resist degeneration in Huntington's disease striatum." J Neuropathol Exp Neurol **50**: 309.
- 69) Hecimovic, S., Klepac, N., Vlastic, J., Voita, A., Bozikov, J., Relja, M., Pavelic, K. (2002). "Genetic background of Huntington disease in Croatia: Molecular analysis of CAG, CCG and Delta2642 (E2642del) polymorphisms." Hum Mutat **20**: 233.
- 70) Heiser, V., Scherzinger, E., Boedderich, A., Lehrach, H., Wanker, E.E. (2000). "Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy." Proc Natl Acad Sci USA **97**: 6739-6744.
- 71) Henke W, H. K., Jung K, Schnorr D, Loening SA (1997). "Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences." Nucl Acids Res **25**: 3957-3958.  
Herrmann, W. (2001). "The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview." Clin Chem Lab Med **39**: 666-674.
- 72) Ho, P.I., Collins, S.C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E., Shea, T.B. (2001). "Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress." J Neurochem **78**: 249-253.
- 73) Holbert, S., D Nghien, I., Kiechle, T., Rosenblatt, A., Wellington, C., Hayden, M.R., Margolis, R.L., Ross, C.A., Dausset, J., Ferrante, R.J., Neri, C. (2001). "The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis." Proc Natl Acad Sci USA **98**: 1811-1816.
- 74) Hollmann, M., Heinemann, S. (1994). "Cloned glutamate receptors." Annu Rev Neurosci **17**: 31-108.
- 75) Hong, C.-J., Yu, Y., Lin, C.-H., Cheng, C.-Y., Tsai, S.-H. (2001). "Association analysis for NMDA receptor subunit 2B (GRIN2B) genetic variants and

psychopathology and clozapine response in schizophrenia." Psychiatric Genet **11**: 219-222.

76) Huntington, G. (1872). "On chorea." Med Surg Rep. **26**: 320-321.

77) Ignarro, L.J. (1991). "Signal transduction mechanisms involving nitrite oxide." Biochem Pharmacol **41**: 485-490.

78) International Huntington's Association (1994). "Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington's disease." J Med Genet **31**: 555-559.

79) Jenkins, B.G., Koroshetz, W.J., Beal, M.F. Rosen, B.R. (1993). "Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized 1H NMR spectroscopy." Neurology **43**: 2689-2695.

80) Koroshetz, W.J., Jenkins, B.G., Rosen, B.R., Beal, M.F. (1997). "Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10." Ann Neurol **41**: 160-165.

81) Koshy, B.T., Zoghbi, H.Y. (1997). "The CAG/polyglutamine tract diseases: gene products and molecular pathogenesis." Brain Pathol. **7**: 927-942.

82) Kosinski, C., Standaert, D., Counihan, T., Scherzer, C., Kerner, J., Landwehrmeyer, G. (1998). "Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the human brain: striatum and globus pallidus." J Comp Neurol **390**: 63-74.

83) Kosinski, C.M., Cha, J. H., Young, A. B., Schwarz, M. (1999). "[Huntington chorea. Animal models reveal new hypotheses for pathophysiology and therapy]." Nervenarzt **70**: 878-88.

84) Kovtun, I.V., McMurray, C.T. (2001). "Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair." Nat Genet **27**: 407-411.

- 85) Kremer, B., Goldberg, P., Andrew, S.E., Theilmann, J., Telenius, H. (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.
- 86) Kremer, B., Clark, C.M., Almqvist, E.W., Raymond, L.A., Martin, W., Hayden, M.R. (1999). "Influence of lamotrigine on progression of early Huntington's disease: a randomized clinical trial." Neurology **53**: 1000-1011.
- 87) Kuwert, T., Lange, H.W., Langer, K-J., Herzog, H., Aulich, A., Feinendegen, L.E. (1990). "Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease." Brain **113**: 1405-1423.
- 88) Landwehrmeyer, B. (2001). "Striatäre Degeneration." in Grundlagen der klinischen Neuroprotektion, UNI-MED Verlag (2001): 111.
- 89) Landwehrmeyer, G. B., McNeil, S.M., Dure, L.S. (1995). "Huntington's disease gene: Regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals." Ann Neurol **37**: 218-230.
- 90) Leavitt, B.R., Guttman, J.A., Hodgson, J.G., Kimel, G.H., Singaraja, R., Vogl, A.W., Hayden, M.R. (2001). "Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo." Am J Hum Genet **68**: 313-324.
- 91) Li, S.H., Lam, S., Cheng, A.L., Li, X.J (2000). "Intranuclear huntingtin increases the expression of caspase-1 and induces apoptosis." Hum Mol Genet **9**: 2859-2867.
- 92) Li, S.H., Schilling, G., Young, W.D., Li, X.J (1993). "Huntington's disease gene (IT 15) is widely expressed in human and rat tissues." Neuron **11**: 985-993.
- 93) Lipton, S.A. (1997). "Neurotoxicity associated with with dual actions of homocysteine at the NMDA-receptor." Proc Natl Acad Sci USA **94**: 5923-5928.

- 94) Lucas, D.R., Newhouse, J.P. (1957). "The toxic activity of sodium-L-glutamate on the inner layers of the retina." Arch Ophthalmol **58**: 193 -201.
- 95) Lucotte, G., Gerard, N., Roubertoux, P., Schmitt, I., Riess, O. (1996). "Relationships of the 2642 deletion polymorphism (delta 2642) in the huntingtin gene with the CAG repeat expansion length and age at onset of the disease." Genet Couns **7**: 297-302.
- 96) Ludolph, A.C., Spencer, P.S. (1996). "Toxic models of upper motor neuron disease." J Neurol Sci **139 (Suppl.)**: 53-59.
- 97) MacDonald, M.E., Vonsattel, J.P., Shrinidhi, J., Couropmitree, N.N., Cupples, L. A., Bird, E.D., Gusella, J.F., Myers, R.H. (1999). "Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease." Neurology **53**: 1330-1332.
- 98) MacMillan, J. C., Snell, R.G., Tyler, A., Houlihan, G.D., Fenton, I., Cheadle, J.P., Lazarou, L.P., Shaw, D.J., Harper, P.S. (1993). Molecular analysis and clinical correlations of the Huntington's disease mutation. Lancet **342**: 954-958.
- 99) Malinow, M. R. (1999). "Homocyst(e)ine, vitamins and genetic interactions in vascular disease." Can J Cardiol **15 Suppl B**: 31B-34B.
- 100) Malinow, M. R., Duell, P.B., Hess, D.L., Anderson, P.H., Kruger, W.D., Phillipson, B.E., Gluckman, R.A., Block, P.C., Upson, B.M. (1998). "Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease." N Engl J Med **338**: 1009-1015.
- 101) Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Haper, A. (1996). "Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice." Cell **87**: 493-506.
- 102) Martin, J.B., Gusella, J.F (1986). "Huntington's disease. Pathogenesis and management." N Engl J Med **315**: 1267-1276.

- 103) Matthews, R.T., Yang, L., Jenkins, B.J., Ferrante, R.J., Rosen, B.R., Kaddurah-Daouk, R., Beal, M.F. (1998). "Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease." J Neurosci **18**: 156-163.
- 104) McPherson, M., Quirke P, Taylor GR (1991). "PCR - A practical approach." Oxford University Press, New York.
- 105) Meierkord, H., Pfeiffer, L., Ludolph, A. (1994). "Neue Erkenntnisse zu Ätiologie und Pathogenese der Chorea Huntington." Nervenarzt **65**: 519-526.
- 106) Meldrum, B., Garthwaite, J. (1990). "Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease." Trends Pharmacol Sci **11**: 379-387.
- 107) Moore, P., El-sherbeny, A., Roon, P., Schoenlein, P.V., Ganapathy, V., Smith, S.B. (2001). "Apoptotic cell death in the mouse retinal ganglion cell layer, induced in vivo by excitatory amino acid homocysteine." Exp Eye Res **73**: 45-57.
- 108) Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 Pt 1:263-73.
- 109) Myers, R.H., Leavitt, J., Farrer, L.A., Jagadeesh, J., McFarlane, H., Mastromauro, C.A. (1989). "Homozygote for Huntington disease." Am J Hum Genet **45**: 615-618.
- 110) Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Rochman, J.M., Philips, A.G., Hayden, M.R. (1995). "Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes." Cell **81**: 811-823.
- 111) Nicotera, P., Ankarcona, M., Bonfoco, E., Orrenius, S., Lipton, S.A. (1997). "Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress." Adv Neurol **72**: 95-101.

- 112) Norris, P.J., Waldvogel, H.J., Faull, R.L., Love, D.R., Emerson, P.C. (1996). "Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease." Neurosci **72**: 1037-1047.
- 113) Novelletto, A., Persichetti, F., Sabbadini, G., Mandich, P., Bellone, E., Ajmar, F., Squitieri, F., Campanella, G., Bozza, A., MacDonald, M.E. (1994). "Polymorphism analysis of the huntingtin gene in Italian families affected with Huntington disease." Hum Mol Genet **3**: 1129-1132.
- 114) Nucifora, F.C., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Ross, C.A. Interference by Huntingtin and Atrophin-1 with CBP-Mediated Transcription Leading to Cellular Toxicity Science, **291**: 2423-2428
- 115) Olney, J. W. (1978). "Neurotoxicity of excitatory amino acids." in Kainic acid as a tool in Neurobiology. Raven Press, New York\_1978: pp.95-102.
- 116) Olney, J.W., Sharpe, L.G. (1969). "Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate." Science **166**: 386-388.
- 117) Ona, V.O., Li, M., Vonsattel, J.P., Andrews, L.J., Khan, S.Q., Chung, W.M., Frey, A.S., Menon, A.S., Li, X.J., Stieg, P.E., Yuan, J., Penney, J.B., Young, A.B., Cha, J.H., Friedlander, R.M. (1999). "Inhibition of caspase -1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease." Nature **399**: 263-267.
- 118) Paschen, W., Blackstone, C.D., Haganir, R.L., Ross, C.A. (1994). "Human GluR6 kainate receptor (GRIK2): molecular cloning, expression, polymorphism, and chromosomal assignment." Genomics **20**: 435-440.
- 119) Perez-Severiano, F., Escalante, B., Rios, C. (1998). "Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity." Neurochem Res **23**: 1297-1302.

- 120) Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M., Finch, J.T. (1994). "Glutamin repeats as polar zippers - their possible role in inherited neurodegenerative diseases." Proc Natl Acad Sci USA **91**: 5355-5358.
- 121) Puchalski, R.B., Louis, J.C., Brose, N., Traynelis, S.F., Morrison, J.H., Heinemann, S. (1994). "Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors." Neuron **13**: 131-147.
- 122) Ranen, N., Stine, O., Abbot, M., Brandt, J., Folstein, S., Ross, C. (1995). "Anticipation and instability of IT-15 (CAG)<sub>n</sub> repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease." Am J Hum Genet **57**: 593-602.
- 123) Read, A.P. (1993). "Huntington's disease: testing the test." Nature Genetics **4**: 329-330.
- 124) Reddy, P.H., Williams, M., Tagle, D.A. (1999). "Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease." Trends Neurosci **22**: 248-255.
- 125) Rosenblatt, A., Brinkman, R.R., Liang, K.Y., Almqvist, E.W., Margolis, R.L., Huang, C.Y., Sherr, M., Franz, M.L., Abbott, M.H., Hayden, M.R., Ross, C.A. (2001). "Familial influence on age of onset among sibilings with Huntington's disease." Am J Hum Genet **105**: 399-403.
- 126) Rubinsztein, D. C., Barton, D.E., Davison, B.C., Ferguson-Smith, M.A. (1993). "Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number." Hum Mol Genet **2**: 1713-1715.
- 127) Rubinsztein, D. C., Leggo, J., Chiano, M., Dogde, A., Norbury, G., Rosser, E., Craufurd, D. (1997). "Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease." Proc Natl Acad Sci USA **94**: 3872-3876.

- 128) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. **239**: 487-91.
- 129) Sarkar, G., Sommer, S.S. (1990). "Formamide can dramatically improve the specificity of PCR." Nucleic Acids Res **18**: 7465.
- 130) Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lehrach, H., Wanker, E.E. (1999). "Self-assembly of polyglutamin-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology." Proc Natl Acad Sci USA **96**: 4604-4609.
- 131) Schulz, J. B., Matthews, R.T., Henshaw, D.R., Beal, M.F. (1996). "Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins: implications for neurodegenerative diseases." Neurosci **71**: 1043-1048.
- 132) Schwarz, M., Block, F., Topper, R., Sontag, K.H., Noth, J. (1992). "Abnormalities of somatosensory evoked potentials in the quinolinic acid model of Huntington's disease: evidence that basal ganglia modulate sensory cortical input." Ann Neurol **32**: 358-364.
- 133) Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jaques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P., Wolf, P.A (2002). "Plasma Homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease." N Engl J Med **346**: 467-483.
- 134) Sharp, A.H., Ross, C.A. (1996). "Neurobiology of Huntington's disease." Neurobiol Dis **3**: 3-15.
- 135) Shoulson, I. (1998). "Experimental therapeutics of neurodegenerative disorders: unmet needs." Science **282**: 1072-1074.
- 136) Shoulson, I., Odorff, C., Oakes, D., Behr, J., Rubin, A. (1989). "A controlled clinical trial of baclofen as a protective therapy in early Huntington's disease." Ann Neurol **25**: 252-259.

- 137) Snell, R.G., MacMillan, J.C., Cheadle, J.P., Fenton, I., Lazarou, L.P., Davies, P., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Harper, P.S., Shaw, D.J. (1993). "Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease." Nat Genet **4**: 393-397.
- 138) Squitieri, F., Gellera, C., Cannella, M., Rubinsztein, D.C., Almqvist, E.W., Hayden, M.R., Di Donato, S. (2003). "Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with more severe clinical course." Brain **126**: 946-955.
- 139) Stine, O.C., Pleasant, N., Franz, M.L., Abbott, M.H., Folstein, S.E., Ross, C.A. (1993). Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. Hum Mol Genet **2**: 1547-1549.
- 140) Strong, T.V., Tagle, D.A., Valdes, J.M., Elmer, L.W. (1993). "Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneuronal tissues." Nat Genet **5**: 259-265.
- 141) Sucher, N.J., Awobulyi, M., Choi, Y.B., Lipton, S.A. (1996). "NMDA receptors: From genes to channels." Trends Pharmacol Sci **17**: 348-355.
- 142) Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P.H., Liu, Y.F. (2001). "Polyglutamine-expanded Huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via Post-synaptic Density 95." J Biol Chem **276**: 24713-24718.
- 143) Tabrizi, S. J., Cleeter, M.W., Xuereb, J., Taanman, J.W., Cooper, J.M., Schapira, A.H. (1999). "Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain." Ann Neurol **45**: 25-32.
- 144) Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N.R., Doi, H., Kurosawa, M., Nekooki, M., Nukina, N. (2004) Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. Nat Med **10**:148-54.

- 145) Telenius, H., Almqvist, E., Kremer, B., Spence, N., Squitieri, F., Nichol, K., Grandell, U., Starr, E., Benjamin, C., Castaldo, I. (1995). "Somatic mosaicism in sperm is associated with intergenerational (CAG)<sub>n</sub> changes in Huntington disease." Hum Mol Genet **4**: 189-195.
- 146) The Huntington Disease Collaborative Research Group (1993). "A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome." Cell **72**: 971-983.
- 147) Trotti, D., Rossi, D., Gjesdal, O., Levy, L.M., Racagni, G., Danbolt, N.C. (1996). "Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes." J Biol Chem **271**: 5976-5979.
- 148) Tsai, S.J., Liu, H.C., Liu T.Y., Cheng, C.Y., Hong, C.J. (2002). "Association analysis for genetic variants of the NMDA receptor 2b subunit (GRIN2B) and Parkinson's disease." J Neural Transm **109**: 483-488.
- 149) Van Guldener, C., Stehouwer, C.D. (2001). "Homocysteine-lowering treatment: an overview." Expert Opin Pharmacother **2**: 1449-14460.
- 150) Vonsattel, J.P., DiFiglia, M. (1998). "Huntington disease." J Neuropathol Exp Neurol **57**: 369-384.
- 151) Vuillaume, I., Vermersch, P., Destee, A., Petit, H., Sablonniere, B. (1998). "Genetic polymorphisms adjacent to the CAG repeat influence clinical features at onset in Huntington's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **64**: 758-762.
- 152) Wellington, C.L., Singaraka, R., Ellerby, L., Savill, J., Roy, S., Leavitt, B., Hayden, M.R. (2000). "Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells." J Biol Chem **275**: 19831-19838.
- 153) Westphal, C. (1883). "Über eine dem Bilde der cerebrospinalen grauen Degeneration ähnlichen Erkrankung des centralen Nervensystems ohne

anatomischen Befund, nebst einigen Bemerkungen über paradoxe Contractionen." Arch Psychiatr Nervenkr **14**: 187 - 194.

154) Wexler, N.S., Young, A.B., Tanzi, R.E., Travers, H., Starosta-Rubinstein, S., Penney, J.B. (1987). "Homozygotes for Huntington's disease." Nature **326**: 194-197.

155) White, J.K., Auerbach, W., Duyao, M.P. (1997). "Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion." Nat Genet **17**: 404-410.

156) Williams, K., Pahk, A.J., Kashiwagi, K., Igarishi, K. (1998). "The selectivity filter of the N-methyl-D-aspartate receptor: a tryptophan residue controls block and permeation of Mg<sup>2+</sup>." Mol Pharmacol **53**: 933-941.

157) Yamamoto, A., Lucas, J.J., Hen, R. (2000). "Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease." Cell **101**: 57-66.

158) Young, A.B., Penney, J.B. (1991). "Benzodiazepine, GABA, and glutamate receptors in cerebral cortex, hippocampus, basal ganglia, and cerebellum." Academic Press, San Diego 1991: pp 9-47.

159) Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., Efstratiadis, A. (1995). "Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue." Nat Genet **11**: 155-163.

160) Zhang, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Snyder, S.H. (1994). "Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose)synthase in neurotoxicity." Science **263**: 687-689.

161) Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R., Timmusk, T., Sipione, S., Cattaneo, E. (2001). "Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease." Science **293**: 493-498.

---

## 8. Danksagung

- Herrn Prof. Dr. Jörg Thomas Eppel danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, sowie für seine Unterstützung und das Vertrauen, dass er mir bei der Durchführung meiner Arbeit entgegenbrachte.
- Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Stephan Wieczorek, der stets bereit war, mein Projekt durch sein fachliches Wissen zu unterstützen und diese Arbeit Korrektur zu lesen.
- Dr. Nils Brune, Dr. Martin Gencik und Larissa Arning danke ich ebenfalls für ihre Betreuung und Hilfsbereitschaft.
- Manuela, Yvonne und Ingrid möchte ich für die stets gute Stimmung im Labor danken, und dass sie mir so manche Tricks und Tipps gezeigt haben.
- Allen anderen Mitarbeitern der Humangenetik danke ich für ihre vielfältige Hilfe.

---

## 9. Lebenslauf

Name: Valentin  
Vorname: Sandra  
Geburtsdatum: 6.10.1978  
Geburtsort: Bochum

### Schulbildung

1985-1989: Grundschule An der Maarbrücke (Bochum)  
1989-1998: Besuch des Goethe-Gymnasiums (Bochum)  
April 1993: Teilnahme am Schüleraustausch mit der King Edward School in Sheffield (England)  
Juli 1997: Stipendium für einen Sprachaufenthalt in Levico Terme (Italien)  
1998: Erwerb des Abiturs

### Hochschulbildung

Oktober 1998 bis August 2000: Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum  
August 2000: Physikum  
September 2000: Fortsetzung des Medizinstudiums an der Université Louis Pasteur in Strasbourg (Frankreich)  
September 2001: Erstes Staatsexamen in Strasbourg  
Oktober 2001: Fortsetzung des Medizinstudiums an der Ruhr-Universität Bochum  
September 2003: Zweites Staatsexamen  
Oktober 2003: Praktisches Jahr:  
1.Tertial: Chirurgie im Universitätskrankenhaus Hautepierre in Strasbourg (Frankreich)

- 
- 2.Tertial: Innere Medizin im Universitätsklinikum Bergmannsheil (Bochum)
- 3.Tertial: Pädiatrie im Kinderspital der Universitätsklinik Zürich (Schweiz)
- November 2004: Drittes Staatsexamen

### Stipendien

- August 2001: Stipendium der Allianz-Vereinte Krankenversicherung für eine einmonatige Famulatur in Strasbourg
- Oktober 2003 bis Februar 2004 Stipendium der Deutsch-Französischen Hochschule (DFH) für das in Strasbourg absolvierte PJ-Tertial
- April 2004: Stipendium der Allianz-Vereinte Krankenversicherung für das Chirurgie-Tertial in Strasbourg

### Studentische Hilfskraft

- 2002 im Büro für studentische Austauschprogramme der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Uni Bochum (Leiter: Prof. Dr. H. Preuschoft)

### Veröffentlichungen

- Juli 2001 und Januar 2002 Veröffentlichung von zwei Artikeln im Online-Bereich der Zeitschrift „Viamedici“ ([www.thieme.de/viamedici](http://www.thieme.de/viamedici)) über den Auslandsaufenthalt in Frankreich
- 2004: Brune N, J Andrich, M Gencik, C Saft, T Müller, S Valentin, H Przuntek, JT Epplen: Methyltetrahydrofolate reductase polymorphism influences onset of Huntington's disease. J Neural Transm Suppl(68): 105-10.

---

**Berufliche Tätigkeit**

ab Februar 2005                      Klinik für Innere Medizin I (Endokrinologie),  
Universitätsklinik Bergmannsheil Bochum (Direktor:  
Prof. Dr. H.H. Klein)