

Einfluss von Proteasomshuttlingfaktoren auf die Bildung und Funktion extrazellulärer Vesikel in einem Huntingtinmodell

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Frau Linda Anna Michelle Kulka
geb. am 04.09.1996 in Leipzig

Gutachter:

PD Dr. Iris Thondorf

Prof. Dr. Heidi Olzscha

Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Datum der Verteidigung: 17.08.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Proteine.....	1
1.2 Proteinqualitätskontrolle.....	2
1.3 Proteinschuttlingfaktoren HR23A und HR23B.....	4
1.4 Posttranslationale Modifikationen.....	6
1.5 Proteinefehlfaltung.....	7
1.6 Proteinopathien.....	8
1.7 Huntingtin.....	11
1.8 Extrazelluläre Vesikel.....	14
1.9 Immunsystem.....	15
1.10 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.2 Zellbiologische Reagenzien.....	18
2.1.2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.1.2.2 Zelllinien.....	19
2.1.2.3 Hergestellte Lösungen.....	20
2.1.2.4 Kits.....	21
2.1.2.5 Antikörper.....	21
2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien.....	22
2.1.3.1 Chemikalien und Reagenzien.....	22
2.1.3.2 Bakterien.....	23
2.1.3.3 Hergestellte Lösungen.....	23

2.1.3.4 Kits	23
2.1.3.5 Plasmide	24
2.1.3.6 Primer	24
2.1.4 Proteinbiochemische Reagenzien	25
2.1.4.1 Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.4.2 Hergestellte Lösungen	25
2.1.4.3 Kits	27
2.1.4.4 Antikörper	27
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.6 Geräte	31
2.1.7 Software	34
2.2 Methoden	35
2.2.1 Zellbiologische Methoden	35
2.2.1.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien	35
2.2.1.2 Kultivierung von nicht-adhärenen Zellen	35
2.2.1.3 Kryokonservierung mammalischer Zellen	36
2.2.1.4 Zellzahlbestimmung	36
2.2.1.5 Synchronisation mammalischer Zellen	36
2.2.1.6 Analyse der synchronisierten Zellen mittels Durchflusszytometrie	37
2.2.1.7 Transiente Transfektion mammalischer Zellen mittels GeneJuice®	38
2.2.1.8 Detektion von Huntingtin und HR23B in der Immunfluoreszenzmikroskopie	38
2.2.1.9 Isolation der extrazellulären Vesikel	40
2.2.1.10 Bestimmung der Menge der extrazellulären Vesikel mittels Durchflusszytometrie ..	40
2.2.1.11 Bestimmung des Huntingtingehalts in extrazellulären Vesikeln mittels Durchflusszytometrie	41
2.2.1.12 Analyse der Oberflächenproteine von extrazellulären Vesikeln mittel MACSPlex	41
2.2.1.13 Detektion der von Immunzellen ausgeschütteten Zytokine unter Zugabe von extrazellulären Vesikeln	42
2.2.1.14 Hyperacetylierung adhärenter Zellen	42

2.2.2 Molekularbiologische Methoden	42
2.2.2.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmiden	42
2.2.2.2 Plasmidpräparation	43
2.2.2.3 Isolation genomischer DNS	43
2.2.2.4 Photometrische Quantifizierung der DNS	44
2.2.2.5 Polymerase Kettenreaktion.....	44
2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	45
2.2.2.7 Sequenzierung.....	46
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	46
2.2.3.1 Aufreinigung der Proteine	46
2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	46
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
2.2.3.4 Western Blot.....	47
2.2.3.5 Dot Blot.....	48
2.2.3.6 Filterretardationsassay.....	49
2.2.3.7 Aufreinigung der Huntingtinaggregate mittels Ultrazentrifugation	49
2.2.4 Datenanalyse	49
3 Ergebnisse.....	50
3.1 Nachweis der Expression von Huntingtin und HR23B.....	50
3.1.1 Sequenzierung der verwendeten Plasmide.....	50
3.1.2 Nachweis von überexprimiertem Huntingtin und den Proteasomshuttlingsfaktoren HR23A und HR23B.....	50
3.1.3 Nachweis von geneditiertem endogenen Huntingtin in iPS Zellen.....	54
3.1.4 Vergleich der Aggregation von Huntingtin in neuronalen Vorläuferzellen und Organoiden.....	55
3.1.5 Verteilung von Huntingtin in U2OS Zellen.....	56
3.1.6 Nachweis der Aggregation von Huntingtin	58
3.2 Einfluss von HR23B auf Huntingtinaggregate.....	59
3.2.1 Verteilung von Huntingtin in HR23B-überexprimierenden Zellen	59
3.2.2 Einfluss von HR23B auf das Verhältnis von Huntingtinaggregaten pro Zelle.....	61

3.2.3 Einfluss von HR23B auf das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis	61
3.2.4 Expression von HR23B in einzelnen Zellzyklusphasen	61
3.3 Einfluss der Proteasomshuttlingfaktoren auf extrazelluläre Vesikel in einem Huntingtinmodell	64
3.3.1 Relative Menge der extrazellulären Vesikel und ihr Huntingtingehalt in Abhängigkeit der Expression der Proteasomshuttlingfaktoren im Überstand	64
3.3.2 Einfluss der Proteasomshuttlingfaktoren auf den Huntingtingehalt in aufgereinigten extrazellulären Vesikeln	68
3.3.3 Expression der Oberflächenproteine auf den extrazellulären Vesikeln	70
3.3.4 Bestimmung der Zytokinausschüttung von Immunzellen nach der Behandlung mit den extrazellulären Vesikeln	72
3.3.5 Vergleich des Huntingtingehalts in Mikrovesikeln und Exosomen	74
3.4 Analyse der Huntingtinaggregate	75
3.4.1 Aufreinigung von Huntingtinaggregaten	75
3.4.2 Einfluss der Acetylierung auf Huntingtin in HR23B-überexprimierenden Zellen	75
3.5 Analyse der Doppelknockoutzelllinie HR23A/B ^{KO}	77
3.5.1 Proteinnachweis der Doppelknockoutzelllinie HR23A/B ^{KO}	77
3.5.2 Nachweis des Doppelknockouts auf genetischer Ebene	78
4 Diskussion	79
4.1 Aggregationsverhalten von physiologischem und pathologischem Huntingtin	79
4.1.1 Expression und Aggregation von endogenem Huntingtin in iPS Zellen	79
4.1.2 Expression und Aggregation von überexprimiertem Huntingtin in U2OS Zellen	81
4.2 Einfluss des Proteasomshuttlingfaktors HR23B	84
4.2.1 Verbreitung von Huntingtin in Abhängigkeit der HR23B-Expression	84
4.2.2 Einfluss von HR23B auf das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis	87
4.3 Verbreitung von Chorea Huntington durch extrazelluläre Vesikel in Abhängigkeit von Proteasomshuttlingfaktoren	89
4.3.1 Einfluss der Proteasomshuttlingfaktoren auf extrazelluläre Vesikel und ihren Huntingtingehalt	89
4.3.2 Einfluss der extrazellulären Vesikel auf das Immunsystem	93

4.4 Bedeutung der Acetylierung für Huntingtin.....	95
4.4.1 Einfluss der Acetylierung auf das Aggregationsverhalten von Huntingtin in HR23B- überexprimierenden Zellen.....	95
4.4.2 Einfluss der Acetylierung auf das Nucleus-Zytoplasma-Verhältnis von HR23B- überexprimierenden Zellen.....	96
5 Ausblick.....	97
6 Zusammenfassung.....	99
7 Abstract	100
Literaturverzeichnis.....	101
Anhang	129
Publikationsliste	139
Lebenslauf	140
Danksagung	141
Eidesstattliche Erklärung.....	143

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proteinqualitätskontrolle	3
Abbildung 2: Proteasomshuttlingfaktoren HR23A und HR23B	5
Abbildung 3: Exon 1 des physiologischen und pathologischen Huntingtins	12
Abbildung 4: Nachweis der Expression von Exon 1 von Huntingtin in U2OS Zellen	51
Abbildung 5: Nachweis der Expression von Exon 1 von Huntingtin in der unlöslichen Fraktion.....	52
Abbildung 6: Nachweis der Expression von Exon 1 von Huntingtin sowie der Proteasomshuttlingfaktoren HR23A und HR23B in weiteren Zelllinien.....	53
Abbildung 7: Nachweis des geneditierten Huntingtins aus iPS Zellen	54
Abbildung 8: Detektion der Huntingtinaggregate und des Gesamthuntingtingehalts in neuronalen Vorläuferzellen und Organoiden mit Htt17Q/Htt17Q bzw. Htt70Q/Htt70Q.....	55
Abbildung 9: Quantifizierung des Verhältnisses von Huntingtinaggregaten zu dem Gesamthuntingtingehalt in neuronalen Vorläuferzellen und Organoiden mit Htt17Q/Htt17Q bzw. Htt70Q/Htt70Q.....	56
Abbildung 10: Verbreitung des exprimierten Exon 1 von Huntingtin in mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfizierten U2OS Zellen.....	57
Abbildung 11: Verbreitung des exprimierten Exon 1 von Huntingtin in mit pcDNA3, Htt23Q-HA und Htt74Q-HA transfizierten U2OS Zellen.....	58
Abbildung 12: Nachweis der Htt97Q-Strukturen als Aggregate mittels Proteostat® <i>Protein Aggregation Kit</i> in U2OS Zellen	59
Abbildung 13: Verbreitung des exprimierten Exon 1 von Huntingtin unter HR23B Überexpression ...	60
Abbildung 14: Quantifizierung der Huntingtinaggregate pro Zelle in Tre und HR23B [↑] Zellen	61
Abbildung 15: Quantifizierung des Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis von Tre und HR23B [↑] Zellen	61
Abbildung 16: Überprüfung des Einflusses der Ethanolfixierung auf die Expression von HR23B.....	62
Abbildung 17: Verteilung der U2OS und HR23B ^{KO} Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen	63
Abbildung 18: HR23B Expression in den einzelnen Zellzyklusphasen von U2OS Zellen	64
Abbildung 19: Detektion von CD63 im Überstand in Abhängigkeit der Expression von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q.....	65
Abbildung 20: Quantifizierung des CD63-Signals im Überstand in Abhängigkeit der Expression von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q.....	65
Abbildung 21: Menge der extrazellulären Vesikel im Überstand in Abhängigkeit der Expression von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q.....	66
Abbildung 22: Detektion von GFP-gekoppeltem Huntingtin (Exon 1) im Überstand in Abhängigkeit der Expression von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q	67

Abbildung 23: Quantifizierung des GFP-CD63-Verhältnisses im Überstand in Abhängigkeit der Expression von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q	67
Abbildung 24: Expression von Exon 1 von Huntingtin in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln der U2OS Zellen	68
Abbildung 25: Expression von Exon 1 von Huntingtin in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln weiterer Zelllinien.....	69
Abbildung 26: Expressionslevel von Exon 1 von Huntingtin in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln in der Durchflusszytometrie	70
Abbildung 27: Expression der Oberflächenproteine auf den extrazellulären Vesikeln von U2OS, HR23A ^{KO} und HR23B ^{KO} Zellen in Abhängigkeit ihrer Expression von Huntingtin (Exon 1)	71
Abbildung 28: Expression der Oberflächenproteine auf den extrazellulären Vesikeln von Tre und HR23B [↑] Zellen in Abhängigkeit ihrer Expression von Huntingtin (Exon 1).....	72
Abbildung 29: Bestimmung der Ausschüttung von IL-1 β durch Immunzellen nach Behandlung mit extrazellulären Vesikeln in Abhängigkeit der Expression der Zellen von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q.....	73
Abbildung 30: Bestimmung der Ausschüttung von IL-6 durch Immunzellen nach Behandlung mit extrazellulären Vesikeln in Abhängigkeit der Expression der Zellen von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q.....	73
Abbildung 31: Bestimmung der Ausschüttung von TNF durch Immunzellen nach Behandlung mit extrazellulären Vesikeln in Abhängigkeit der Expression der Zellen von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q.....	74
Abbildung 32: Expression von Exon 1 von Huntingtin in den aufgereinigten Mikrovesikeln und Exosomen in U2OS und HR23B ^{KO} Zellen.....	75
Abbildung 33: Einfluss der Acetylierung auf Huntingtin (Exon 1) in Tre und HR23B [↑] Zellen.....	76
Abbildung 34: Quantifizierung der Huntingtinaggregate pro Zelle in hyperacetylierten Tre und HR23B [↑] Zellen	76
Abbildung 35: Quantifizierung des Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis von hyperacetylierten Tre und HR23B [↑] Zellen.....	77
Abbildung 36: Proteinexpression von HR23A und HR23B in durch CRISPR/Cas9-generierten HR23A/B ^{KO} Zellen	77
Abbildung 37: Nachweis der amplifizierten durch CRISPR/Cas9-veränderten Genfragmente von HR23A/B ^{KO}	78
Abbildung 38: Schematische Darstellung des Einflusses von HR23B auf fehlgefaltetes Huntingtin und seine Ausschüttung in extrazellulären Vesikeln	92

Abbildung S1: Sequenzen der verwendeten Plasmide.....	129
Abbildung S2: Etablierung der Expression von Exon 1 von Huntingtin im Western Blot.....	130
Abbildung S3: Etablierung der Expression von Exon 1 von Huntingtin in der Immunfluoreszenzmikroskopie bei einer Inkubationszeit von 48 h	131
Abbildung S4: Etablierung der Expression von Exon 1 von Huntingtin in der Immunfluoreszenzmikroskopie bei einer Inkubationszeit von 72 h	132
Abbildung S5: Etablierung der Expression von Exon 1 von Huntingtin in der Immunfluoreszenzmikroskopie mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien	133
Abbildung S6: Kontrollen für die Zellzyklusmessung	134
Abbildung S7: Kontrollen für die HR23B-Detektion in den einzelnen Zellzyklusphasen.....	134
Abbildung S8: Etablierung der Synchronisation von U2OS und HR23B ^{KO} Zellen	135
Abbildung S9: Nachweis der extrazellulären Vesikel im Überstand mittels Dot Blot	136
Abbildung S10: Vergleich der Aufreinigungsmethoden von extrazellulären Vesikel.....	136
Abbildung S11: Überblick über die durch extrazelluläre Vesikel ausgeschüttete Zytokine von differenzierten THP-1 Zellen	137
Abbildung S12: Aufreinigung der Huntingtinaggregate mittels Ultrazentrifugation	137
Abbildung S13: Sequenzierung der HR23A/B Doppelknockoutzellen.....	138

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die in den zellbiologischen Methoden verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern.....	21
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Plasmide, ihre Fusionsproteine und ihre Antibiotikaresistenz.....	24
Tabelle 3: Übersicht über die in den proteinbiochemischen Methoden verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern.....	27
Tabelle 4: Pipettierschema für die Polymerase Kettenreaktion	45
Tabelle 5: Theoretisch berechnete Molekülmassen der exprimierten Huntingtinproteine (Exon 1)...	50
Tabelle 6: Genetische Veränderung der CRISPR/Cas9-generierten HR23A/B ^{KO}	78

Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A β	β -Amyloid
BCA	Bicinchoninsäure (englisch: <i>bicinchoninic acid</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CHIP	C-Terminus des HSP70 interagierenden Proteins
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtstreulicht (englisch: <i>forward scatter</i>)
G-418	Geneticin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HA	Hemagglutinin
HDAC	Histondeacetylasen
HR23A	Humanes Rad23A
HR23B	Humanes Rad23B
HRP	Meerrettichperoxidase (englisch: <i>horseradish peroxidase</i>)
Htt	Huntingtin
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
LB	<i>Lysogeny broth</i>

LPS	Lipopolysaccharid
N17	N-terminale Domäne aus 17 Aminosäuren
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
NPC	Neuronale Vorläuferzellen (englisch: <i>neural progenitor cells</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
poly(GA)	Protein mit Dipeptidwiederholung von Glycin-Alanin
PRD	Prolin-reiche Domäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radio-Immunpräzipitationsassay
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAHA	Suberoylanilidhydroxamsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (englisch: <i>sideward scatter</i>)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UBA	Ubiquitin-assoziiert
UBL	Ubiquitin-ähnlich (englisch: <i>ubiquitin-like</i>)
XPC	Xeroderma pigmentosum Komplementationsgruppe C

1 Einleitung

1.1 Proteine

Proteine sind die in der Zelle am häufigsten auftretenden Makromoleküle. Sie erfüllen sowohl intra- als auch interzellulär vielfältige Funktionen und beeinflussen damit die zellulären Prozesse, wie Zellwachstum und Proliferation. Beispielsweise können sie als Transporter, Enzyme, Hormone oder Strukturmoleküle agieren, aber auch bei der Zellmigration und Proteinfaltung assistieren (LaPelusa und Kaushik 2022). Die Relevanz der Proteine zeigt sich bereits im Namen. Dieser wurde erstmals von Johannes Mulder im Jahre 1839 publiziert und von dem griechischen Wort *proteios* abgeleitet, was als vorrangig bzw. von herausragender Bedeutung übersetzt werden kann (Mulder 1839).

Ihre Relevanz resultiert unausweichlich in einer akkuraten Regulation der Proteine. Diese wird als Proteostase beschrieben, welches aus den Wörtern Protein und Homöostase zusammengesetzt ist. Sie spielt demnach eine wichtige Rolle für zelluläre Funktionen, für die Differenzierung der Zellen und Gewebe sowie für deren Anpassung an exogene (z.B. Hitzestress, Infektionen) oder endogene Faktoren (z.B. Altern). Die Proteostase umfasst genauer gesagt die Aufrechterhaltung der Konzentration, die Beeinflussung der Konformation und die Lokalisation der Proteine sowie die Interaktion individueller Proteine mit dem restlichen Proteom. Dies wird unter anderem durch eine Regulation der Proteinbiosynthese, der Proteinfaltung, des Proteintransports und der Proteindegradation erzielt (Kurtishi et al. 2019).

Proteine werden in unterschiedlicher Weise aus 20 verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzt, welche über Peptidbindungen verknüpft sind. Dies wurde bereits 1902 von Emil Fischer und Franz Hofmeister postuliert (Fischer 1902; Hofmeister 1902). Die lineare Abfolge der Aminosäurenkette wird als Primärsequenz bezeichnet und aus der Basensequenz der mRNA translatiert. Die mRNA wird wiederum durch die Transkription der DNS und posttranskriptionalen Modifikationen gebildet. Zur Ausübung seiner physiologischen Funktion wird das Protein gefaltet. Dabei erfolgt die erste räumliche Anordnung der Primärstruktur durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäureresten. Diese wird als Sekundärstruktur bezeichnet und beinhaltet fünf verschiedene Motive: α -Helix, β -Faltblatt, β -Schleifen, Ω -Schleifen und ungeordnete Strukturen. Die Interaktionen dieser Domänen durch Disulfidbrücken, Van-der-Waals-Kräfte, ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen resultieren in einer Tertiärstruktur. In dieser Form sind die meisten Proteine physiologisch aktiv. Einige bilden mit weiteren Makromolekülen supramolekulare Komplexe. Die dabei entstehende Struktur wird als Quartärstruktur beschrieben (Berg et al. 2018).

1.2 Proteinqualitätskontrolle

Die Faltung der Proteine wird durch verschiedene Einflüsse bestimmt. Dazu zählt neben der Aminosäuresequenz, die Länge des Proteins (Anfinsen et al. 1954), die Anzahl und Substrukturen der Domänen (Komplexität), der verfügbare Platz für das entsprechende Protein sowie die Zell- bzw. Gewebeart (van den Berg et al. 1999). Entsprechend des Levinthal-Paradoxons kann das Protein nicht zufällig seine native Konformation durch Ausprobieren aller Möglichkeiten annehmen (Levinthal 1969). Stattdessen erfolgt die spontane Faltung *in vivo* entlang eines Energiegefälles (Dobson und Ellis 1998). Das bedeutet, dass die Konformation nativer Proteine, welche in lebenden Organismen gefaltet wurden, oft mit der unter physiologischen Bedingungen thermodynamisch stabilsten Struktur korreliert und für die physiologische Funktion der Proteine optimiert ist.

Zusätzlich zu der Faltung entlang des Energiegefälles werden die Proteine durch unterschiedliche intra- und intermolekulare Interaktionen beeinflusst. Diese Wechselwirkungen werden unter anderem von dem Proteinqualitätskontrollsystem genutzt. Das Proteinqualitätskontrollsystem ist ein zellulärer Schutzmechanismus, der für die Aufrechterhaltung des funktionierenden Proteoms und somit für die physiologische Aktivität der Zelle zuständig ist. Es kommt in allen eukaryotischen Zellen vor und befindet sich zum großen Teil im Zytoplasma, aber auch in anderen Zellkompartimenten (Pohl und Dikic 2019).

Eine wichtige Aufgabe der Proteinqualitätskontrolle ist die Überwachung der Proteinfaltung (Abbildung 1). Dabei spielen Molekulare Chaperone eine tragende Rolle. Der Begriff *Chaperon* kommt aus dem französischen und bedeutet so viel wie „Anstandsdame“. Er wurde erstmal 1978 von Ron Laskey eingeführt und beschreibt Proteine, welche die Faltung von ungefalteten Proteinen und Intermediaten unterstützen ohne dabei selbst verbraucht zu werden (Laskey et al. 1978). Sie treten im Zytoplasma, Nukleus, endoplasmatischen Retikulum sowie in den Mitochondrien auf (Daugaard et al. 2007). Weiterhin sortieren die molekularen Chaperone die nativen Proteine in ihre Kompartimente und erkennen fehlgefaltete Proteine. Ein prominenter Vertreter für die Erkennung fehlgefalteter Proteine ist das Hitzeschockprotein HSP70 (Rosenzweig et al. 2019).

Neben der Proteinfaltung ist die Degradation der Proteine ein wichtiger Teil der Proteinqualitätskontrolle. Sie dient der Regulation der Proteinkonzentrationen, insbesondere von metabolischen Enzymen, Transkriptionsfaktoren oder für den Zellzyklus benötigte Proteine und spielt somit eine tragende Rolle beim Zellwachstum, der Proliferation und der Signaltransduktion. Der Abbau erfolgt über zwei verschiedene Mechanismen: über das Ubiquitin-Proteasom-System oder über die Autophagie (Pohl und Dikic 2019). Letztere leitet sich von dem griechischen Wort *autophagos* ab, was „sich selbst essend“ bedeutet. Für ihre Entdeckung bekam Ohsumi 2016 den Nobelpreis verliehen.

Dabei werden unerwünschte Proteine, aber auch eigene Zellorganellen in Lysosomen degradiert (Tsukada und Ohsumi 1993). Die Autophagie konnte in den meisten Eukaryoten detektiert werden und wird in Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie unterschieden (Wong et al. 2020). Letztere ist ein Beispiel für das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten des Proteinqualitätskontrollsystems. Neben der Autophagie erfolgt die Proteindegradation ebenfalls über das Ubiquitin-Proteasom-System. Die Regulation über welchen Mechanismus die Proteine abgebaut werden, wird unter anderem von der Menge und der Größe der abzubauenen Proteine bestimmt (Zientara-Rytter und Subramani 2019).

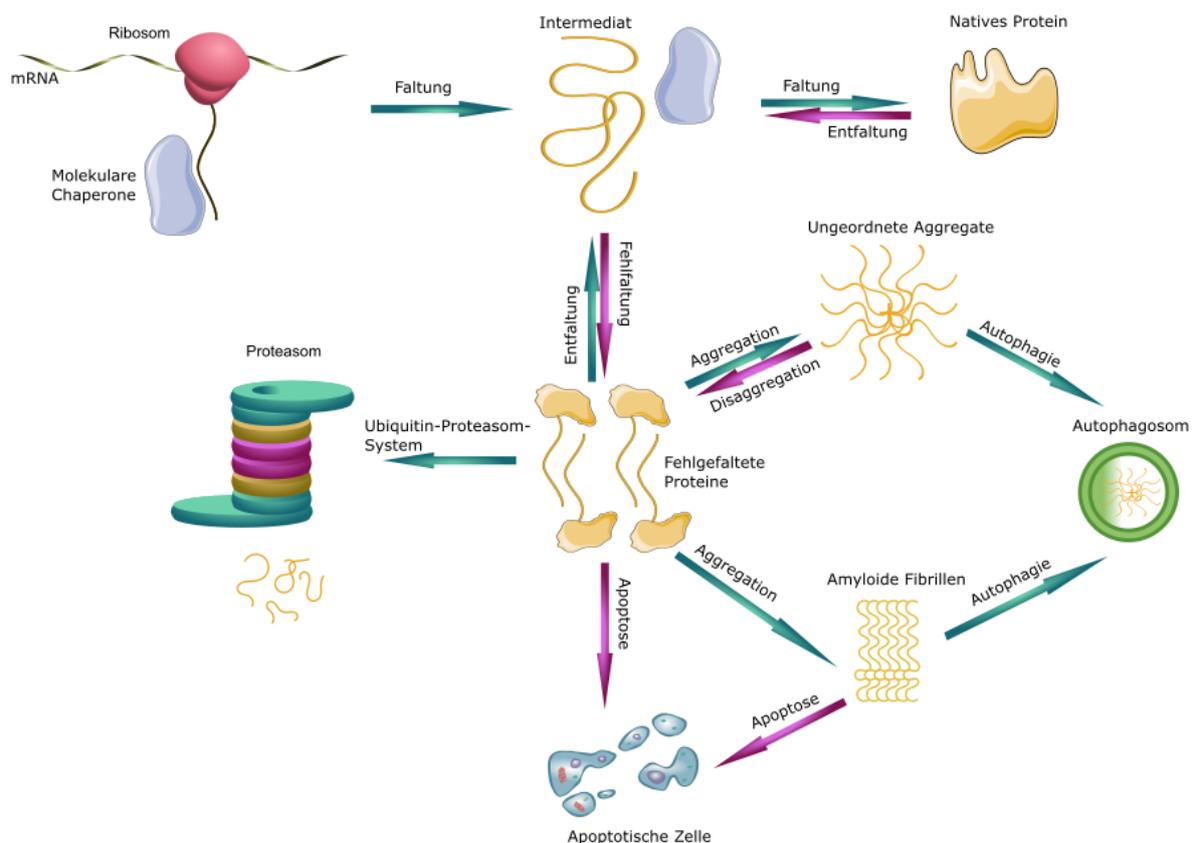


Abbildung 1: Proteinqualitätskontrolle

Die von der mRNA translatierte Aminosäurekette wird bei der Faltung von molekularen Chaperonen unterstützt. Dabei entstehen zunächst die Sekundärstrukturen (Intermediat), welche anschließend das native Proteine bilden oder fehlgefaltet werden. Beide Prozesse sind reversibel. Zur Regulation der Proteinkonzentration und bei einem Überschuss an fehlgefalteten Proteinen werden die Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System oder über Autophagie degradiert. Bei einem erfolglosen Abbau der Proteine induziert die Zelle die Apoptose (Kulka et al. 2020).

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist ein mehrstufiger Prozess zum kontrollierten Abbau von Proteinen (Hershko et al. 1981). Für seine Entdeckung erhielten Avram Hershko, Aaron Ciechanover, und Irwin Rose 2004 den Nobelpreis. Das Ubiquitin-Proteasom-System oder ähnliche Vertreter konnten in Eukaryoten, Archaeen (Fu et al. 2016) und einigen Bakterien (Bode und Darwin 2014) beobachtet

werden und tritt im Zytoplasma und Nukleus auf (Pohl und Dikic 2019). Die Markierung der Proteine erfolgt über eine Polyubiquitinierung (s. 1.4), welche in einer Degradation der Proteine durch das Proteasom resultiert. Das Proteasom ist ein Proteinkomplex aus multikatalytischen Proteasen. Zum Abbau der Proteine werden die markierten Proteine entfaltet und von den katalytischen Untereinheiten in kurze Peptide gespalten (Chowdhury und Enenkel 2015). Diese werden meistens im Zytoplasma durch weitere Peptidasen in ihre Aminosäuren zerlegt, sodass die Aminosäuren für eine erneute Proteinbiosynthese zur Verfügung stehen (Vigneron und van den Eynde 2014). Damit sind die Proteinbiosynthese und die Proteindegradation innerhalb der Zellen stark miteinander verknüpft.

Neben der Regulation der Proteinkonzentrationen und der Produktion von Aminosäuren für die Biosynthese neuer Proteine sind weitere wichtige Aufgaben des Proteasoms der Abbau von fehlgefalteten Proteinen (s. 1.5), sowie die Auslösung einer Immunantwort. Um eine Immunantwort auslösen zu können, werden die Peptide nicht im Zytoplasma in ihre Aminosäuren gespalten, sondern im endoplasmatischen Retikulum an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes I gebunden und auf der Oberfläche der Zellen für Immunzellen präsentiert (Vigneron und van den Eynde 2014).

Wie bereits erwähnt, spielt die Polyubiquitinierung eine wichtige Rolle für die Erkennung der abzubauenen Proteine. Das Proteasom besitzt selbst intrinsische Ubiquitin-Rezeptoren, sodass Substrate, welche sich in der Nähe befinden, erkannt und degradiert werden können, jedoch können weiter entfernte, markierte Proteine nicht abgebaut werden. Dazu greift die Zelle auf sogenannte Proteasomshuttlingfaktoren zurück.

1.3 Proteinschuttlingfaktoren HR23A und HR23B

Proteasomshuttlingfaktoren erkennen polyubiquitinierte Proteine und leiten sie zum Proteasom weiter. Dazu besitzen sie eine N-terminale UBL-Domäne (*Ubiquitin-like*, Ubiquitin-ähnliche Domäne), welche an das Proteasom bindet und mindestens eine C-terminale UBA-Domäne (Ubiquitin-assoziierte Domäne), welche die Polyubiquitinierung der markierten Proteine erkennt (Su und Lau 2009). Zwei Vertreter der Proteasomshuttlingfaktoren sind das humane Rad23A (HR23A) und das humane Rad23B (HR23B) (Elsasser et al. 2004; Verma et al. 2004), wobei HR23B in embryonalen Fibroblasten von Mäusen in einer zehnfach höheren Konzentration in den Zellen auftritt (Okuda et al. 2004). Beide Proteasomshuttlingfaktoren besitzen eine N-terminale UBL-Domäne sowie zwei C-terminale UBA-Domänen. HR23A ist mit 363 Aminosäuren kleiner als HR23B, welches aus 409 Aminosäuren besteht (Yokoi und Hanaoka 2017). Sie sind Homologe zu Rad23, welches zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und im Zusammenhang mit der Nukleotidexzisionsreparatur beschrieben wurde (Sugasawa et al. 1997; Okuda et al. 2004; Ng et al. 2003).

Diese Funktion wird auf die STI-Domäne zurückgeführt (Abbildung 2A). Die STI-Domäne bindet an XPC (Xeroderma pigmentosum Komplementationsgruppe C) und bildet einen Komplex, welcher Läsionen, die DNS-Doppelstränge thermodynamisch destabilisieren, erkennt. Daraufhin assembliert der Komplex zur DNS-Reparatur mit weiteren NER-Faktoren (Maltseva et al. 2007). Die Nukleotidexzisionsreparatur ist besonders in der G1-Phase des Zellzyklus prominent (Sarkar et al. 2006; Katiyar und Lennarz 2005), tritt aber auch während andere Zellzyklusphasen auf.

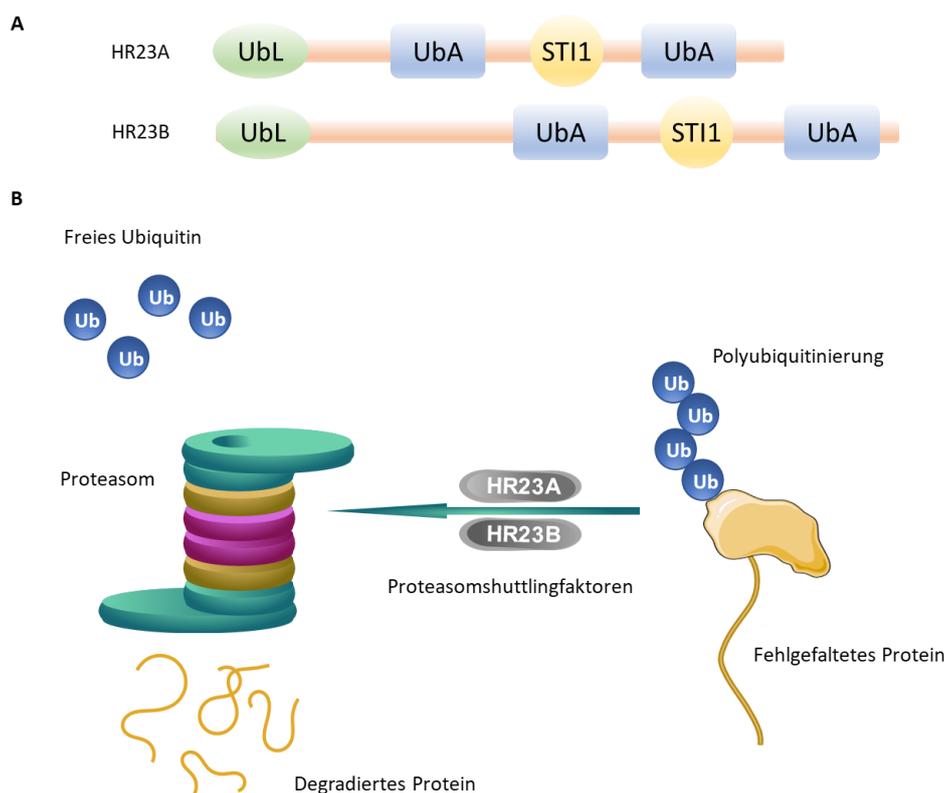


Abbildung 2: Proteasomshuttlingfaktoren HR23A und HR23B

Die Proteasomshuttlingfaktoren HR23A und HR23B besitzen jeweils eine UBL-Domäne, welche an das Proteasom bindet, und zwei UBA-Domänen, welche polyubiquitinierte fehlgefaltete Proteine erkennen und zum Proteasom weiterleiten. In Abbildung 2A ist der Aufbau der Proteasomshuttlingfaktoren dargestellt, Abbildung 2B zeigt die Markierung und Weiterleitung der fehlgefalteten Proteine (Tsuchiya et al. 2020).

Weiterhin wurde für HR23B der Transport zwischen Nucleus und Zytoplasma als Funktion beschrieben (Okeke et al. 2020), sowie die Rolle von HR23A und HR23B in der Proteindegradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Abbildung 2B). Die N-terminale UBL-Domäne der Proteasomshuttlingfaktoren interagiert mit dem Proteasom an der Untereinheit Rpn10 (auch als PSMD4 bzw. S5a bezeichnet) (Ryu et al. 2003; Walters et al. 2003). Dabei bindet die Domäne nicht nur an das Proteasom sondern aktiviert gleichzeitig seine Peptidase sowie ATPase, sodass die Proteasomshuttlingfaktoren einen Einfluss auf die Kapazität der Proteindegradation haben (Collins und Goldberg 2020). Dies wird durch die Phosphorylierung der UBL-Domäne reguliert (Liang et al. 2014). Die C-terminalen UBA-Domänen binden hingegen an polyubiquitinierte Proteine (Chen et al.

2001; Chen und Madura 2002; New et al. 2013). Proteasomshuttlingfaktoren können eine unterschiedliche Anzahl an UBA-Domänen haben, HR23A und HR23B besitzen jeweils zwei. Eine bereits beschriebene Interaktion der UBA-Domänen ist beispielsweise eine Bindung an Ataxin-3 (s. 1.6) (Chen und Madura 2006).

1.4 Posttranslationale Modifikationen

Der Einfluss der Ubiquitinierung auf die Degradation von Proteinen verdeutlicht ihre Bedeutung in der Zelle. Die Ubiquitinierung ist eine posttranslationale Modifikation. Neben der Proteindegradation können posttranslationale Modifikationen auch durch veränderte intra- und intermolekulare Interaktionen Einfluss auf die Proteinfaltung und -aktivierung nehmen (Wang et al. 2013). Somit sind sie an vielen zellulären Prozessen beteiligt, darunter die Regulation von Transkription und Translation, in der Signaltransduktion, der Endozytose, der DNS-Reparatur und der Regulation von Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Entzündungsreaktionen (Olzscha 2019). Weiterhin kann die Bindung von molekularen Chaperonen an Proteine durch posttranslationale Modifikationen verändert werden (Wang et al. 2013).

Posttranslationale Modifikation werden entweder als Reaktion auf endogene oder exogene Stimuli hin an Proteine gebunden und können sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus der Proteine oder an den Seitenketten der Aminosäuren auftreten (Chen und Kashina 2021). Posttranslationale Modifikationen werden durch anorganische oder organische Gruppen gebildet, es ist aber auch eine Modifikation durch Peptide oder weitere Proteine möglich (Olzscha 2019). Insgesamt wurden circa 300 verschiedene posttranslationale Modifikationen beschrieben, wozu auch die Ubiquitinierung gehört (Zhao und Jensen 2009).

Die Erkennung der zu degradierenden Proteine erfolgt durch Polyubiquitinketten an der Seitenkette von Lysinen. In Abhängigkeit davon, welche Lysine polyubiquitiniert sind, baut die Zelle die markierten Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System oder über die Autophagie ab (Wang et al. 2013). Das Ubiquitin wird vor der Proteindegradation abgespalten und steht zur weiteren Ubiquitinierung wieder zur Verfügung (Tanaka 2009). Ubiquitin ist mit 76 Aminosäuren und 8,5 kDa ein verhältnismäßig kleines Protein, welches hochkonserviert in allen eukaryotischen Zellen und Zelltypen auftritt. Daher wurde sein Name aus dem Lateinischen von *ubique* (allgegenwärtig) abgeleitet (Goldstein et al. 1975; Swatek und Komander 2016). Die Ubiquitinierung erfolgt durch Ubiquitin-Protein-Ligasen, ihre Gegenspieler werden als Deubiquitinasen bezeichnet. Neben der Polyubiquitinierung zum Abbau von Proteinen, können Proteine auch mono- oder multiubiquitiniert sein. Anhand der Anzahl und der Art der Ubiquitinbindung wird neben der Proteindegradation, die Bindung zu anderen Proteinen beeinflusst, die Proteinaktivität verändert oder die Lokalisation der Proteine reguliert (Chen et al. 2022).

In Konkurrenz zu der Ubiquitinierung steht die Acetylierung, welche ebenfalls an Lysinresten stattfinden kann (Olzscha et al. 2017). Acetylierung ist die am häufigsten vorkommende posttranslationale Modifikation (Choudhary et al. 2009), da 85 % des eukaryotischen Proteoms an der N^α-Aminogruppe des Proteins acetyliert sind (Gottlieb et al. 2021; van Damme et al. 2011). In Konkurrenz mit der Ubiquitinierung tritt sie jedoch an der N^ε-Aminogruppe der Lysinreste auf.

Die Lysinacetylierung wird von den Acetyltransferasen (häufig auch als Histonacetyltransferasen bezeichnet) katalysiert. Sie ist eine reversible posttranslationale Modifikation, die durch Deacetylasen (häufig als Histondeacetylasen (HDAC) bezeichnet) wieder entfernt werden kann. Eine gut untersuchte Deacetylase ist HDAC6, welcher eine Interaktion mit HR23B nachgewiesen werden konnte. Dabei wurde gezeigt, dass in Zellen mit einem hohen HR23B-Gehalt durch HDAC-Inhibitoren, wie Suberoylanilidhydroxamsäure (SAHA; Vorinostat), die Apoptose ausgelöst wird, während Zellen mit einer geringen Expression von HR23B eine erhöhte Autophagie aufwiesen (Olzscha et al. 2015). HDAC-Inhibitoren werden heutzutage als Chemotherapeutika bei malignen Erkrankungen eingesetzt, sodass ihr Einfluss auf weitere Proteine eine relevante Rolle in Bezug auf Nebenwirkungen und Kreuzreaktionen spielt (Kulka et al. 2020; Xu et al. 2007).

Die Namen Histonacetyltransferase und Histondeacetylase sind historisch bedingt, da diese Enzyme im Zusammenhang mit der Histonacetylierung entdeckt wurde. Lysin ist eine positiv geladene Aminosäure, welche durch die Acetylierung neutralisiert wird. Dadurch entspannt sich das Chromatin und die Transkription der DNS kann in diesen Bereichen stattfinden. Demnach wird die Genexpression unter anderem über die Histonacetylierung reguliert. Es ist jedoch bekannt, dass auch Lysinreste anderer Proteine durch diese Enzyme acetyliert bzw. deacetyliert werden können (Olzscha 2019).

Auch dabei wird die Ladung des Lysinrests verändert, was wiederum einen Einfluss auf die Faltung der Proteine haben kann und sowohl in einer Regulation der Proteinfunktion als auch in einer Proteinefehlfaltung, einschließlich einer Aggregation, resultieren kann (Olzscha et al. 2017). Dies wurde auch in den für Proteinopathien (s. 1.6) relevanten Proteinen Tau (Cohen et al. 2011), β -Amyloid (A β) (Adhikari et al. 2020) und α -Synuclein (Vinueza-Gavilanes et al. 2020) beschrieben.

1.5 Proteinefehlfaltung

Posttranslationale Modifikationen können Proteine so verändern, dass sie sich fehlfalten. Das Wort „Fehlfaltung“ impliziert, dass die vorherrschende Faltung schlecht für die Zelle ist. Es gibt jedoch auch gewünschte Inaktivierungen durch Fehlfaltungen. Demnach bedeutet Proteinefehlfaltung zunächst erstmal nur, dass das Protein in einer Konformation vorliegt, in der es seine physiologische Funktion nicht ausführen kann (Nussinov und Ma 2012).

Neben posttranslationalen Modifikationen gibt es weitere Ursachen für die Fehlfaltung von Proteinen. Diese können endogen sein, wie spontane Genmutationen in den Exons, Fehler bei der Transkription bzw. Translation, die zu Veränderungen der Primärstruktur führen, oder das Altern. Es gibt jedoch auch exogene Umwelteinflüsse, wie Strahlung, Infektionen mittels Prionen oder Stress durch pH-Veränderungen bzw. Hitze (Chaudhuri und Paul 2006; Nakajima und Suzuki 2013; Shacham et al. 2019). In den Zellen liegen in etwa 30 % der Proteine falsch gefaltet vor, welche jedoch unter physiologischen Bedingungen innerhalb von Minuten bis Stunden von dem Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden können (Schubert et al. 2000).

Bei einer Überlastung der Proteinqualitätskontrolle durch einen Anstieg von fehlgefalteten Proteinen wird auch die Konzentration der normalerweise unschädliche Proteine nicht mehr länger reguliert und es kommt zu einer Dysfunktion der zellulären Funktionen (Gidalevitz et al. 2006). In einem mehrstufigen Prozess können sich die fehlgefalteten Proteine über nicht-kovalente, intermolekulare Interaktionen zusammenlagern und amyloide bzw. amyloid-ähnliche Aggregate bilden (Chiti und Dobson 2006). Diese liegen häufig als β -Faltblätter, welche senkrecht zur Fibrillenachse verlaufen, vor (Poirier et al. 2005). Die Aggregation ist theoretisch ein reversibler Prozess. Da aggregierte Strukturen eine geringe freie Energie besitzen und thermodynamisch extrem stabil sind, ist der Prozess in der Praxis jedoch meist nicht reversibel (Dee und Woodside 2016). Während in proliferierenden Zellen noch ein Abbau der Aggregate beobachtbar ist, zeigen postmitotische, differenzierte Zellen häufig gar keine Degradation der Aggregate (Scior et al. 2018; Bufalino und van der Kooy 2014).

Abgesehen von dem Verlust der Proteinfunktion durch die Aggregation ist bis heute unklar, ob die Aggregate selbst eine protektive oder eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen haben (Slow et al. 2006; Wolfe und Cyr 2011). Durch die Aggregation kann die Toxizität der Proteine beispielsweise unterbunden werden (Fassler et al. 2021), es wurde jedoch auch gezeigt, dass die Aggregate eine Porenbildung, den Einschluss funktionaler Proteine, die Beschädigung des Proteinqualitätskontrollsystems sowie die Auslösung einer Immunantwort zur Folge haben (Olzscha 2019). Unabhängig davon sind die Aggregate ein Charakteristikum verschiedener Erkrankungen. Aufgrund der ursächlichen Proteinefehlfaltung werden diese als Proteinopathien bezeichnet.

1.6 Proteinopathien

Als Proteinopathien (auch Proteopathien, abgeleitet aus den Wörtern *Proteo-* = Protein und *-pathie* = Erkrankung) werden Proteinefehlfaltungserkrankungen bezeichnet. Dabei wird unterschieden, ob die Proteinopathie durch die Bildung toxischer Proteinaggregate (*gain of toxic function*) oder durch den Abbau der fehlgefalteten Proteine und dem damit einhergehenden Funktionsverlust des Proteins (*loss of physiological function*) entsteht (Winklhofer et al. 2008). Zu letzterem zählt beispielsweise Diabetes,

häufig kommt es aber auch zu einem Zusammenspiel aus der Bildung toxischer Produkte und der fehlenden Aktivität des Proteins. Insgesamt sind viele verschiedene Proteinopathien bekannt, wovon die Amyloidosen eine Untergruppe bilden. Diese sind durch amyloide bzw. amyloid-ähnliche Aggregate charakterisiert (Dogan 2017). Im Folgenden wird näher auf neurodegenerative Amyloidosen eingegangen.

Ihnen ist gemein, dass Ablagerung der fehlgefalteten Proteine insbesondere im zentralen Nervensystem vorzufinden ist, wobei die Aggregate zytoplasmatisch, nukleär sowie extrazellulär auftreten können. Die Behandlung dieser Erkrankungen ist bisher nur palliativ möglich, wobei der Ausbruch vieler dieser Krankheiten altersbedingt ist. Der Zusammenhang des Alters mit dem Ausbruch der Krankheit ist unter anderem auf die im Alter sinkenden proteolytischen Kapazitäten zurückzuführen (Hou et al. 2019).

Die bekannteste altersbedingte, neurodegenerative Amyloidose ist Morbus Alzheimer, welche erstmals 1906 von dem Arzt Alois Alzheimer beschrieben wurde. Betroffene leiden unter der Abnahme kognitiver Fähigkeiten, die in Orientierungslosigkeit und Sprachstörungen resultieren kann, häufig treten auch Verhaltensänderungen auf (Alzheimer 1906). Die Krankheit wird durch die Proteinablagerungen von extrazellulärem A β und hyperphosphoryliertem Tau charakterisiert (Morishima-Kawashima und Ihara 2002). Eine nicht von Neurodegeneration betroffene Region ist hingegen das Cerebellum (Hu et al. 2017). Interessanterweise wurde hier eine erhöhte Expression von HR23B nachgewiesen (Jensen et al. 2018).

Die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung ist Morbus Parkinson. Sie äußert sich vor allem in motorischen Einschränkungen, wie Bradykinesie, Rigor und Tremor, es sind jedoch auch vegetative und kognitive Störungen möglich (Reich und Savitt 2019). Im Gehirn der erkrankten Personen nachweisbar sind vor allem sogenannte Lewy-Körperchen, welche nach dem Neurologen Friedrich Lewy benannt wurde, der diese 1912 im Zusammenhang mit Parkinson entdeckte (Lewy 1912). Sie enthalten unter anderem Ubiquitin, das für das Ubiquitin-Proteasom-System relevant ist (Ross und Pickart 2004), sowie das fehlgefaltete Protein α -Synuclein, welches häufig als prionähnlich beschrieben wird (Leak et al. 2019).

Ein Beispiel für eine Prionerkrankung ist die Creutzfeld-Jakob-Krankheit. Hierbei handelt es sich um eine Enzephalopathie, die zu einer spongiformen Auflösung der Hirnstrukturen führt. Sie wurde erstmals in den 1920er Jahren von Hans Creutzfeld und Alfons Jakob beschrieben und ist durch die Verbreitung fehlgefalteter Prionen charakterisiert (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921). Prionen sind Proteine, welche benachbarte Proteine dazu anregen, ihre native Konformation zu verändern. Der

Begriff wurde von Stanley Prusiner aus den Wörtern *protein* und *infection* 1982 gebildet, welcher 1997 den Nobelpreis für die Entdeckung erhielt (Prusiner 1982).

Weitere neurodegenerative Erkrankungen sind die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und die Machado-Joseph-Krankheit. Bei beiden Krankheiten leiden die Patienten unter einem Abbau ihrer motorischen Fähigkeiten (Hardiman et al. 2017; Paulson 2012). Bei der ALS gibt es verschiedene Theorien zur Entstehung dieser Krankheit. Eine befasst sich mit der Wiederholung des Dipeptid Glycin-Alanin (poly(GA)). Die Toxizität von poly(GA) konnte durch die Überexpression von HR23B reduziert werden (Zhang et al. 2016). Auch die Machado-Joseph-Krankheit wird durch eine pathologische Wiederholung charakterisiert, in dem Fall von einer Glutaminwiederholung im Protein Ataxin-3. Die Krankheit wird häufig mit Chorea Huntington verglichen (Paulson 2012).

Chorea Huntington ist die am häufigsten autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung bei Erwachsenen. Die weltweite Prävalenz liegt bei 2,71:100.000, die Inzidenz bei 0,38:100.000 (Pringsheim et al. 2012). In Deutschland sind derzeit zwischen 8.000 und 12.000 Menschen betroffen (Deutsche Huntington-Hilfe e.V. | Leben mit der Huntington-Krankheit 2023). Sie wurde erstmals von George Huntington im Jahre 1872 mit folgenden Merkmalen beschrieben: erblich, Psychosen und Suizidneigungen, nur im Erwachsenenalter (Huntington 1872). Die Krankheit wurde jedoch bereits im Mittelalter als Veitstanz bezeichnet (*Choreia* = Tanz). Diese Bezeichnung entstand vor allem aus den symptomatischen, unwillkürlichen Bewegungsstörungen. Weiterhin leiden die Erkrankten am Abbau kognitiver Fähigkeit, der zu Vergesslichkeit, Konzentrations- und Sprachstörungen und später auch zu unkontrollierten Emotionen und Psychosen führt (Stoker et al. 2022).

Mit seiner Vermutung, die Krankheit träte nur im Erwachsenenalter auf, lag Huntington jedoch falsch. Zwar zeigen Betroffene häufig die ersten Symptome zwischen 30 und 50 Jahren (Essa et al. 2019), jedoch unterliegt die Krankheit der Antizipation. Dies bedeutet das über Generationen hinweg ein früherer Ausbruch der Krankheit erfolgt und die Erkrankung schwerwiegender verläuft (Paulson 2018). Es wurde jedoch auch ein späterer Ausbruch beobachtet. Die durchschnittliche Lebenserwartung nach dem Auftreten der ersten Symptome beträgt 15 bis 18 Jahre (Caron et al. 1993).

Neben der klinischen Zuordnung über die Symptome, besteht die Möglichkeit Chorea Huntington über Magnetresonanztomographie zu diagnostizieren (Johnson und Gregory 2019). Dabei kann die Atrophie der Hirnstrukturen, allen voran des Corpus Striatum, nachgewiesen werden (Tabrizi et al. 2013). Das Corpus Striatum ist sowohl ein Teil vom motorischen, kognitiven als auch limbischen System. Dies spiegelt sich auch in den Symptomen der Betroffenen wider (Provost et al. 2015).

Einzelne Symptome der Erkrankung können durch Medikamente, wie Riluzol (Verminderung der motorischen Einschränkungen) (Mittal und Eddy 2013), Gabapentin (neuroprotektive Wirkung) (Kumar et al. 2012) oder L-Dopa (Verminderung des motorischen Einschränkungen) (Deroover et al. 1984) gelindert werden. Dies kann durch Ergo- bzw. Physiotherapie, Logopädie und eine psychiatrische Behandlung unterstützt werden. Eine kurative Therapie der Erkrankung ist jedoch bisher nicht möglich. Die Ursache von Chorea Huntington ist das fehlgefaltete Protein Huntingtin (Htt) (Sun et al. 2017). Seine Fehlfaltung ist genetisch codiert und kann somit bereits im Fruchtwasser über eine genetische Analyse detektiert werden (Piña-Aguilar et al. 2019).

Zur Behandlung der Ursache gibt es aktuell verschiedene Ansätze. In vielen Fällen wird die Reduktion des fehlgefalteten Proteins Huntingtin angestrebt. Dazu laufen aktuell mehrere klinische Studien mit beispielsweise folgenden Medikamenten: Tominersen, WVE-120103, PTC518 und Branaplam (Estevez-Fraga et al. 2022).

1.7 Huntingtin

Die Fehlfaltung des Proteins Huntingtin ist auf sein Gen, welches auch als *IT15* beschrieben wird, zurückzuführen. Das Gen liegt auf Chromosomen 4 (4p16.3) und kann über einen Marker, der von James F. Gusella entdeckt wurde, detektiert werden (Gusella et al. 1983). Es hat in etwa 180 kb und 67 Exons, welche zwischen 48 und 341 bp besitzen (Ambrose et al. 1994). In Exon 1 befinden sich eine unterschiedliche Anzahl an CAG-Wiederholungen, welche für Glutamin codieren (Abbildung 3). Diese beeinflussen nachweislich die Faltung des Proteins Huntingtin und den damit verbundenen Ausbruch der Krankheit (Jimenez-Sanchez et al. 2017).

Huntingtin hat eine molekulare Masse von 350 kDa. Interessanterweise ist jedoch Exon 1 ausreichend, um die Krankheit auszulösen. Dies wurde sowohl in einer transgenen Maus gezeigt (Mangiarini et al. 1996; Yang et al. 2020) als auch in *Drosophila* (Barbaro et al. 2015). Demnach wird in der heutigen Forschung häufig auf Exon 1 von Huntingtin zurückgegriffen (Ghosh et al. 2020; Ceccon et al. 2022; Guan et al. 2022). Exon 1 enthält eine N-terminale Domäne, welche drei Lysinreste beinhaltet (K6, K9 und K15), die potentielle Angriffspunkte für eine Ubiquitinierung oder Acetylierung darstellen. Weiterhin besteht Exon 1 aus der Polyglutamindomäne, welche durch die CAG-Wiederholungen codiert wird, und aus einer prolinreichen Domäne (Pigazzini et al. 2021).

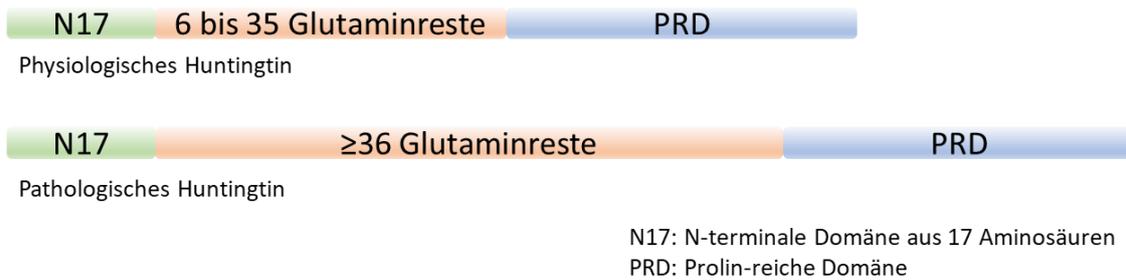


Abbildung 3: Exon 1 des physiologischen und pathologischen Huntingtins

Exon 1 von Huntingtin beinhaltet eine N-terminale Domäne aus 17 Aminosäuren (N17), eine Polyglutamin-domäne sowie eine Prolin-reiche Domäne (PRD). Das native, physiologische Protein hat dabei zwischen 6 und 35 Glutaminreste (CAG-Wiederholungen), während das pathologische Protein mindestens 36 Glutaminwiederholungen aufweist (Bravo-Arredondo et al. 2018).

Die Anzahl der CAG-Wiederholungen und damit einhergehend die Anzahl der Glutamine bestimmt nicht nur, ob die Krankheit ausbricht, sondern auch in welchem Alter (Capiluppi et al. 2020; Duyao et al. 1993) und wie schwer der Krankheitsverlauf ist (Foroud et al. 1999; Langbehn 2022). In gesunden humanen Gehirnzellen liegt die Anzahl der Glutaminreste unter 36 Glutaminen, ab 40 Glutaminen ist der Ausbruch der Krankheit manifestiert, zwischen 36 und 39 Glutaminresten besteht die Möglichkeit zu erkranken (MacDonald et al. 1993; Nørremølle et al. 1993; Rubinsztein et al. 1996; Agostinho et al. 2012). Die Anzahl der Glutamine kann sich im Verlauf des Lebens (somatische Instabilität) und über Generationen hinweg (Antizipation) ändern. Dies ist auf eine Leserasterverschiebung der DNS-Polymerase um drei Basen zurückzuführen, weil die DNS-Polymerase durch die ständigen Wiederholungen ins „Stottern“ geraten kann (Kacher et al. 2021). Je höher die Anzahl der Glutaminreste, desto jünger sind die Patienten beim Ausbruch der Krankheit und desto schneller verläuft die Erkrankung.

Die pathologische Verlängerung der Polyglutamin-domäne resultiert in einer Fehlfaltung, welche zu amyloid-ähnlichen Ablagerungen (Aggregaten) führt (Hoffner et al. 2007; Mangiarini et al. 1996). Mit einer steigenden Anzahl an Glutaminresten erhöht sich auch die Anzahl der Aggregate (Layburn et al. 2022). Diese Aggregate bestehen aus β -Strukturen (Poirier et al. 2005) und werden auch als Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) beschrieben. Sie können unter anderem mittels Ameisensäure gelöst werden (Hazeki et al. 2000; Iuchi et al. 2003) Huntingtinaggregate treten häufig perinukleär auf, was auf ihre Interaktion mit β -Tubulin zurückzuführen ist (Hoffner et al. 2002). Viele Publikationen gehen von einer Toxizität der Aggregate aus, welche die Erkrankung auslösen (*gain of toxic function*). Dies ist bisher jedoch nicht abschließend bewiesen, insbesondere da die genaue Funktion des physiologischen Proteins bisher nicht geklärt werden konnte (Tabrizi et al. 2019).

Das Protein konnte in allen Geweben nachgewiesen werden, ist jedoch am höchsten im Corpus Striatum und dem Neocortex konzentriert (Young 2003; Blumenstock und Dudanova 2020). Dies

erklärt, dass Chorea Huntington Patienten vor allem unter Neurodegeneration leiden. Während die pathologische Form von Huntingtin zu einem Absterben der Neuronen führt, ist das physiologische Huntingtin lebensnotwendig. Mäuse, in denen kein Huntingtin produziert wird, sterben bereits im Embryonalstadium (Zeitlin et al. 1995), ältere Mäuse, bei denen Huntingtin merklich reduziert wurde, zeigten hingegen eine abnormale Hirnentwicklung sowie neuronale Dysfunktionen (Dietrich et al. 2017). Demnach wird vermutet, dass das Protein Huntingtin eine wichtige Rolle bei der pränatalen Entwicklung des Gehirns spielt (Young 2003). Die Ausprägung einiger neurodegenerativen Symptome durch die Reduktion von Huntingtin lässt darauf schließen, dass auch ein Verlust der Proteinfunktion für die Erkrankung relevant sein kann.

Die Aggregation des Proteins ist altersabhängig, was zu einem altersabhängigen Ausbruch der Krankheit führt. Ein möglicher Grund ist die Veränderung der posttranslationalen Modifikation sowie die bereits oben erwähnte sinkende proteolytische Kapazität des Proteinqualitätskontrollsystems mit zunehmendem Alter. In einigen Publikationen konnte eine Beeinträchtigung des Proteasoms beobachtet werden, sodass ein Abbau des fehlgefalteten Huntingtins, aber auch anderer Proteine nicht mehr über das Ubiquitin-Proteasom-System möglich ist (Waelter et al. 2001; Seo et al. 2004). Bei einer Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems wurde eine erhöhte Aggregation detektiert (Martín-Aparicio et al. 2001). Diese Hypothese wird durch die Publikation von Riguet et al. unterstützt (Riguet et al. 2021). Sie konnten Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems in den Huntingtinaggregaten nachweisen. Yang et al. zeigten weiterhin, dass HR23B in den Aggregaten gebunden ist (Yang et al. 2018). Der genaue Mechanismus ist jedoch ungeklärt, insbesondere weil Schipper-Krom et al. beobachteten, dass Teile des Ubiquitin-Proteasom-Systems zwar in den Aggregaten auftraten, diese jedoch aktiv waren (Schipper-Krom et al. 2014). Weiterhin untersuchten Díaz-Hernández et al., wie Huntingtin über das Proteasom abgebaut werden sollten und fanden heraus, dass die drei Peptidasen des Proteasoms Huntingtin nicht degradieren (Díaz-Hernández et al. 2003). Demnach wurde die Beeinträchtigung des Proteasoms mit einem „Verstopfen des Proteasoms“ erklärt. Dies konnte jedoch widerlegt werden (Hipp et al. 2012; Juenemann et al. 2013). DiFiglia et al. und Sieradzan et al. detektierten eine Polyubiquitinierung von postmortem isolierten Huntingtinaggregaten (DiFiglia et al. 1997; Sieradzan et al. 1999). Diese Polyubiquitinierung findet an den Lysinresten der N-terminalen Domäne des pathologisch verlängerten Huntingtins statt (Juenemann et al. 2015), sodass dieses für einen Abbau markiert wurde, während das lösliche Huntingtin nicht ubiquitiniert vorlag (Hipp et al. 2012).

1.8 Extrazelluläre Vesikel

Im frühen Stadium der Erkrankung sind die Huntingtinaggregate im Corpus Striatum detektierbar (Tabrizi et al. 2013). Im Verlauf der Krankheit breiten sich die Aggregate sowie die Neurodegeneration weiter im Gehirn aus (Costanzo et al. 2013; Pecho-Vrieseling et al. 2014). Bis heute gibt es keine genaue Erklärung dieser Ausbreitung. Eine Hypothese vermutet die Verbreitung der Huntingtinaggregate über extrazelluläre Vesikel (Pink et al. 2021). Extrazelluläre Vesikel sind membranumschlossene Partikel, welche von Zellen sezerniert und aufgenommen werden können. Sie können Proteine und Nukleinsäuren enthalten und dienen der Informationsweitergabe, des Transportes, der Ausschleusung von Zellorganellen und der interzellulären Kommunikation im Gewebe (Budnik et al. 2016; Rajendran et al. 2014).

Bei der Erforschung der Verbreitung von neurodegenerativen Erkrankungen konnten extrazelluläre Vesikel als mögliches Transportmittel identifiziert werden. Die Proteine A β (Rajendran et al. 2006; Vingtdeux et al. 2007; Gabrielli et al. 2022), Tau (Saman et al. 2012) und α -Synuclein (Emmanouilidou et al. 2010) wurden bereits in extrazellulären Vesikeln nachgewiesen. Weiterhin konnte Huntingtin extrazellulär detektiert werden (Cicchetti et al. 2014) und die Aufnahme des Proteins durch humane Zellen wurde von Ren et al. und Yang et al. gezeigt (Ren et al. 2009; Yang et al. 2002). Die Verbreitung von Huntingtin wurde von Jeon et al. und Pearce et al. als prionähnlich beschrieben (Jeon et al. 2016; Pearce et al. 2015). Prionen können wiederum in extrazellulären Vesikeln transportiert werden (Ecroyd et al. 2004; Fevrier et al. 2004; Robertson et al. 2006). Der Mechanismus konnte bisher jedoch nicht vollständig geklärt werden.

Extrazelluläre Vesikel können die Blut-Hirn-Schranke passieren und sind daher für Therapien interessant. Sie bieten zum Beispiel die Möglichkeit RNS und Proteine als Impfung oder Medikament zielgerichtet zu verabreichen. Diese Therapiemöglichkeit wird aktuell in Autoimmunerkrankheiten, Krebserkrankung sowie neurodegenerative Erkrankungen getestet (Ramos-Zaldívar et al. 2022). Für eine zielgerichtete Therapie der neurodegenerativen Erkrankungen einschließlich Chorea Huntington ist jedoch ein besseres Verständnis für die Abläufe in den Patienten notwendig.

Aktuell sind drei verschiedene extrazelluläre Vesikel bekannt. Diese werden aufgrund ihrer Herkunft unterschieden. Exosomen sind mit einem Durchmesser von 40 bis 150 nm die kleinsten bekannten extrazellulären Vesikel. Sie werden aus multivesikulären Körpern gebildet und über die Exozytose ausgeschüttet (Bebelman et al. 2020). Die Mikrovesikel (auch Ektosomen genannt) werden hingegen direkt aus der Zellmembran abgeschnürt. Sie haben einen Durchmesser von 100 bis 1.000 nm (Laberge et al. 2018). Die letzte Gruppe bilden die apoptotischen Körperchen. Sie sind mit bis zu 5.000 nm im

Durchmesser die größten extrazellulären Vesikel und können neben Proteinen und RNS auch DNS und andere Zellbestandteile enthalten (Borges et al. 2013).

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft besitzen die extrazellulären Vesikel unterschiedliche Oberflächenproteine. Diese sind zelltypspezifisch (Garcia-Martin et al. 2022; Di Wu et al. 2019) und können eine Immunantwort auslösen (Buzas 2022). Als bekannteste Marker für extrazelluläre Vesikel gelten die Tetraspanine CD9, CD63 und CD81 (*cluster of differentiation*) (Crescitelli et al. 2013). Sie werden sowohl auf den Exosomen als auch auf den Mikrovesikeln exprimiert. Barranco et al. stellten jedoch fest, dass die Expression in Abhängigkeit der Art der extrazellulären Vesikel unterschiedlich stark auftritt (Barranco et al. 2019). Weiterhin gibt es Oberflächenproteine, wie Calnexin für Mikrovesikel, welche spezifisch für die einzelnen Gruppen der extrazellulären Vesikel sind (Haraszti et al. 2016; Mears et al. 2004).

1.9 Immunsystem

Die extrazellulären Vesikel sind unter anderem dafür bekannt Immunantworten auszulösen (Hu et al. 2021). Das Immunsystem ist ein komplexes System zur Abwehr von körperfremden Stoffen und Krankheitserregern (Hirayama et al. 2017). Ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems im zentralen Nervensystem sind Mikroglia, welche als Makrophagen fungieren (Bachiller et al. 2018). Makrophagen sind wiederum Leukozyten, die sowohl fremde Stoffe als auch gealterte oder abgestorbene, körpereigene Zellen phagozytieren können. Die Proteine der phagozytierten Zellen werden über das Proteinqualitätskontrollsystem zu Peptiden degradiert, welche an die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes II binden und anschließend auf der Oberfläche präsentiert werden, sodass eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden kann (Münz 2012).

Makrophagen werden aus Monozyten differenziert und können grob in proinflammatorische M1-Makrophagen und antiinflammatorische M2-Makrophagen unterschieden werden (Murray 2017). Demnach sind die M1-Makrophagen für die Auslösung der Immunantwort verantwortlich und die M2-Makrophagen wirken regulierend entgegen. Dabei schütten sie spezifische Zytokine aus. Bekannte Zytokine für die M1-Makrophagen sind unter anderem IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF und IL-12p70. Ihre Aufgabe besteht sowohl aus einer lokalen Entzündung als auch aus der Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen. Das Zytokin IL-10 wird hingegen von M2-Makrophagen ausgeschüttet und wirkt nach erfolgreicher Bekämpfung der Krankheitserreger entzündungshemmend, sodass die Immunantwort inhibiert wird (Yao et al. 2019).

In den neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Alzheimer (Halle et al. 2008; Hüll et al. 1996; Ou et al. 2021) und Morbus Parkinson (Leal et al. 2013; Sterling et al. 2022) konnte bereits eine Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine und somit eine Auslösung der Immunantwort beobachtet werden.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Chorea Huntington ist eine letal verlaufende Erkrankung, die für die Patienten und ihre Angehörigen eine große Belastung ist. Auslöser der Erkrankung ist nachweislich das fehlgefaltete Protein Huntingtin (Jimenez-Sanchez et al. 2017). Vieles in Bezug auf die Erkrankung Chorea Huntington ist jedoch noch ungeklärt, sodass bisher keine rationale Therapie dieser Erkrankung entwickelt werden konnte.

Beim Abbau des fehlgefalteten Huntingtins spielt das Proteinqualitätskontrollsystem eine große Rolle. Ein Teil davon ist das Ubiquitin-Proteasom-System. In der folgenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der Proteasomshuttlingfaktor HR23B einen positiven Einfluss auf den Abbau des fehlgefalteten Proteins Huntingtin haben.

Die Degradation fehlgefalteter Proteine wird über Polyubiquitinierung reguliert (Wang et al. 2013). Da die Acetylierung wie die Ubiquitinierung an Lysinresten stattfindet, sind die beiden posttranslationalen Modifikation als konkurrierend zu betrachten (Olzscha et al. 2017). Demnach sollte untersucht werden, ob die Acetylierung einen Einfluss auf den Abbau von Huntingtin über das Ubiquitin-Proteasom-System hat.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Verbreitung von neurodegenerativen Erkrankungen und in diesem Kontext von Chorea Huntington im Gehirn. Eine Hypothese besagt, dass diese Verbreitung durch extrazelluläre Vesikel erfolgt (Pink et al. 2021). Ziel der Arbeit war deshalb auch, die Ausbreitung von Huntingtin durch extrazelluläre Vesikel nachzuweisen, indem die Menge und der Inhalt der extrazellulären Vesikel untersucht wurde. Eine weitere Fragestellung war, ob diese Merkmale durch den Proteasomshuttlingfaktor HR23B verändert werden können. Zur genaueren Untersuchung des Mechanismus der Verbreitung von Chorea Huntington wurden die Oberflächenproteine der extrazellulären Vesikel detektiert und Immunzellen mit den sezernierten extrazellulären Vesikeln behandelt, sodass eine Veränderung der ausgeschütteten Zytokine analysiert werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung, 30 % in H ₂ O (Verhältnis 37,5:1)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Desoxycholat	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MG-132	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat	Bio-Techne® Corporation, Minneapolis, Vereinigte Staaten von Amerika
N-Lauroylsarcosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nonylphenoxypolyethoxyethanol (NP-40)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Polysorbat 20 (Tween® 20)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail (PIC) P8340	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ribonuklease (RNase A)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Saccharose	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SAHA	Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trichloressigsäure	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Zellbiologische Reagenzien

2.1.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Doxycyclin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM), Gibco™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Eindeckmittel Dako <i>Mounting</i> Medium	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika
Fetales Kälberserum (FKS), Gibco™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Geneticin (G-418)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Hoechst H33258	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hydroxyurea	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hygromycin B	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Vereinigte Staaten von Amerika
Immersionsöl	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Interferon- γ (IFN- γ ; human rekombinant)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) O111:B4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Natriumazid (NaN ₃)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Nocodazol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Octoxinol 9 (Triton™ X-100)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Opti-MEM™, Gibco™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Paraformaldehyd	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml, 10.000 µg/ml), Gibco™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Polyethylenimin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Propidiumiodid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium, Gibco™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot, Gibco™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Thymidin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Transfektionsreagenz GeneJuice®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypanblaulösung (0,4 %)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Trypsin-EDTA	Biozym® Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

2.1.2.2 Zelllinien

iPS Zellen (induzierte pluripotente Stammzellen) (<i>HTT17Q/HTT17Q</i>)	Dr. Pawel Lisowski, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin
iPS Zellen (<i>HTT70Q/HTT70Q</i>)	Dr. Pawel Lisowski, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin
iPS Zellen (<i>HTT70Q/HTT17Q</i>)	Dr. Pawel Lisowski, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin
iPS Zellen (<i>HTT0Q/HTT0Q</i>)	Dr. Pawel Lisowski, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin
THP-1 Zellen (Monozyten von Patienten mit akuter Leukämie)	Dr. J. Lehmann, Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig

U2OS Zellen (Epithelzellen von Patienten mit Osteosarkom; ATCC-Nummer: HTB-96) (U2OS)	ATCC, Manassas, Vereinigte Staaten von Amerika
U2OS Zellen mit CRISPR/Cas9-generiertem HR23A ^{KO} (HR23A ^{KO})	Diana Panfilova, Institut für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
U2OS Zellen mit CRISPR/Cas9-generiertem HR23B ^{KO} (HR23B ^{KO})	Diana Panfilova, Institut für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
U2OS Zellen mit HR23B-Überexpression durch ein <i>Tet-on</i> System (HR23B [↑])	Prof. Dr. Heidi Olzscha, Institut für Biochemie, Medical School Hamburg
U2OS Zellen mit <i>Tet-on</i> System ohne Gen als Kontrolle (Tre)	Prof. Dr. Heidi Olzscha, Institut für Biochemie, Medical School Hamburg

2.1.2.3 Hergestellte Lösungen

Zellkulturmedium zur Kultivierung von

U2OS, HR23A^{KO} und HR23B^{KO}	Tre und HR23B[↑]	THP-1
DMEM	DMEM	RPMI 1640
10 % FKS	10 % FKS	10 % FKS
1 % Penicillin-Streptomycin	1 % Penicillin-Streptomycin	1 % Penicillin-Streptomycin
	0,1 mg/ml Hygromycin B	
	0,1 mg/ml G-418	

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4	Kryomedium
Wasser	FKS
137 mM NaCl	10 % DMSO
2,7 mM KCl	
10 mM Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	
1,8 mM KH ₂ PO ₄	

Färbepuffer	Färbelösung
1x PBS	1x PBS
1 % BSA	4,4 % (v/v) Propidiumiodid
0,09 % NaN ₃	100 µg RNase A

Fixierlösung	Permeabilisierungslösung	Blockierlösung
1x PBS	1x PBS	1x PBS
4 % (w/v) Paraformaldehyd	0,5 % (v/v) Triton™ X-100	1 % (w/v) BSA

Differenzierungsmedium

RPMI 1640
 10 % FKS
 1 % Penicillin-Streptomycin
 100 ng/ml PMA
 50 µM β-Mercaptoethanol

Polarisierungsmedium

RPMI 1640
 10 % FKS
 1 % Penicillin-Streptomycin
 100 ng/ml LPS
 20 ng/ml IFN-γ

2.1.2.4 Kits

<i>Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Kit</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>MACS Exosome Isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>MACSPlex Exosome Kit</i>	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>Minute™ High-Efficiency Exosome Precipitation Reagent</i>	Invent Biotechnologies Inc., Plymouth, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Proteostat® Protein Aggregation Kit</i>	Enzo Life Sciences Inc., Lausen, Schweiz

2.1.2.5 Antikörper

Tabelle 1: Übersicht über die in den zellbiologischen Methoden verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Primär			
anti-CD63-Phycoerythrin (anti-CD63-PE) (12-0639-42)	Maus (monoklonal) Immunglobulin _{1, κ} (IgG _{1, κ}), Klon H5C6	1:20	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
anti-Flag (F1804)	Maus (monoklonal) IgG ₁ , Klon M2	1:50	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
anti-Hemagglutinin (anti-HA) (2367)	Maus (monoklonal) IgG ₁ , Klon 6E2	1:50	Cell Signaling Technology®, Danvers, Vereinigte Staaten von Amerika

anti-HA (H6908)	Kaninchen (polyklonal)	1:50	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
anti-HR23B (ab86781)	Kaninchen (polyklonal)	1:100	Abcam®, Cambridge, Großbritannien
IgG Kontrollen			dianova Gesellschaft für biochemische, immunologische und mikrobiologische Diagnostik mbH, Hamburg, Deutschland
Sekundär			
anti-Kaninchen- Dylight 649 (611-143-122)	Ziege (polyklonal) IgG	1:100	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
anti-Kaninchen- Fluoresceinisothiocyanat (anti-Kaninchen-FITC) (65-6111)	Ziege (polyklonal) IgG	1:800	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
anti-Maus-FITC (A16067)	Ziege (polyklonal) IgG	1:800	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien

2.1.3.1 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
GeneRuler™ 1 kb DNS-Leiter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

GeneRuler™ 100 bp DNS-Leiter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Kanamycin	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Lysogeny Broth</i> (LB) Bouillonbasis	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Natriumacetat	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) Outgrowth Medium</i>	New England Biolabs®, Ipswich, Vereinigte Staaten von Amerika

2.1.3.2 Bakterien

DH5α	New England Biolabs®, Ipswich, Vereinigte Staaten von Amerika
------	---

2.1.3.3 Hergestellte Lösungen

LB-Medium

Wasser
2 % (w/v) LB Bouillonbasis

Verdauungspuffer pH 8

Wasser
100 mM NaCl
10 mM TRIS
25 mM EDTA
0,5 % (w/v) SDS
<i>frisch hinzugeben:</i>
0,1 mg/ml Proteinase K

10x Ladepuffer

Wasser
50 % (v/v) Glycerin
50 mM EDTA
0,05 % (w/v) Xylencyanol
0,05 % (w/v) Bromphenolblau

TRIS-Acetat-EDTA(TAE)-Puffer

Wasser
40 mM TRIS
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA

Agarosegel

TAE-Puffer
1,5 % bzw. 2 % (w/v) Agarose

2.1.3.4 Kits

<i>DreamTaq</i> Polymerasekettenreaktion (PCR) Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
<i>Mycoplasma Detection Kit</i> Venor® GeM OneStep	Minerva Biolabs® GmbH, Berlin, Deutschland
Mykoplasmen-PCR Test	Biotoool AG, Kirchberg, Schweiz

PureLink® HiPure Plasmid Filter DNA Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Purification Kit

2.1.3.5 Plasmide

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Plasmide, ihre Fusionsproteine und ihre Antibiotikaresistenz

Plasmid	Fusionsprotein	Antibiotikaresistenz	Hersteller
pcDNA3	HA	Ampicillin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Htt20Q	HA	Ampicillin	Prof. Dr. Heidi Olzscha, Institut für Biochemie, Medical School Hamburg
Htt97Q	HA	Ampicillin	Prof. Dr. Heidi Olzscha, Institut für Biochemie, Medical School Hamburg
Htt23Q-HA	HA	Ampicillin	Addgene, Watertown, Vereinigte Staaten von Amerika
Htt74Q-HA	HA	Ampicillin	Addgene, Watertown, Vereinigte Staaten von Amerika
peGFP	grün fluoreszierendes Protein (GFP)	Kanamycin	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, Vereinigte Staaten von Amerika
Htt23Q	GFP	Kanamycin	Addgene, Watertown, Vereinigte Staaten von Amerika
Htt74Q	GFP	Kanamycin	Addgene, Watertown, Vereinigte Staaten von Amerika
Htt97Q-GFP	GFP	Kanamycin	Prof. Dr. Heidi Olzscha, Institut für Biochemie, Medical School Hamburg

2.1.3.6 Primer

PCR-Primer

Microsynth AG, Balgach, Schweiz

Sequenzierungsprimer

Eurofins Scientific SE, Luxemburg, Luxemburg

Name des Oligonukleotids

Basensequenz des Oligonukleotids 5'→3'

PCR-Primer

HR23B Typ A forward

ATG CAG GTC ACC CTG AAG ACC CTC CAG C

HR23B Typ A reverse

TTA CCA ACT CTG GGA ACT AAG CGG CTA ACC

HR23B Typ B forward

GCT ATC ATA ACT AGT AAT ATG AGT TAA TG

HR23B Typ B reverse

AGA TAA AAC AAA ACT AAT ACC ATT TGA TGG

HR23B Typ C forward

GTG TTT AGC CCA AAG CAG TGT CCA CAC C

HR23B Typ C reverse

CCA AAT CAA CAG AGT ACA GAA ATC TGA TTA TG

HR23A Typ A <i>forward</i>	GTG TTT AGT ATA AGT AAA TAC TGT GTT GAA TGG
HR23A Typ A <i>reverse</i>	GGA TTC CTC TGA TGG GCT CTT GTC CTC TCT GG
HR23A Typ B <i>forward</i>	ATG GCC GTC ACC ATC ACG CTC AAA ACG C
HR23A Typ B <i>reverse</i>	CCA GTC TTG GAG AGC TTG GCC TG
HR23A Typ C <i>forward</i>	CCA GCC ATC AGC TGG GCC TTG TCT GG
HR23A Typ C <i>reverse</i>	CTG TTT AGT TCT AAT GCA CAG ACC TCC
Sequenzierungsprimer	
HR23B Typ A	CCA CAA AGC CCA CGG CCA AGA CAG G
HR23B Typ B	CCA TTA TTT ATT CAG ATT CTG GAT TGT CAT TTT TT
HR23B Typ C	CTT CTG AAC CTG CAC CTG CTA GTG C
HR23A Typ A	CCT CCC GTT GGG ATT CTA GCC TCC
HR23A Typ B	CCT GTT CAC AGC TAA TCT CTC CTG G
HR23A Typ C	CCA AAG GCT TTT CAG GGC AGG TTT TGC

2.1.4 Proteinbiochemische Reagenzien

2.1.4.1 Chemikalien und Reagenzien

Ameisensäure	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Diethylpyrocarbonat(DEPC)-behandeltes Wasser	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HiMark™ vorgefärbter Proteinstandard	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Luminol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Novex™ WedgeWell™ Gradientengele (4 bis 12 %)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
PageRuler™ Plus vorgefärbter Proteinstandard	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

2.1.4.2 Hergestellte Lösungen

Radio-Immunpräzitations-assay(RIPA)-Puffer pH 7,4	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) pH 7,6	5x Probenpuffer
Wasser	Wasser	TBS-T
150 mM NaCl	137 mM NaCl	12,5 % (w/v) SDS
50 mM TRIS	7,7 mM TRIS	0,3 M TRIS
0,5 % (w/v) Desoxycholat	<i>hinzugeben für TBS-T:</i>	50 % (v/v) Glycerin
1 % (v/v) NP40	0,1 % (v/v) Tween 20	0,05 % Bromphenolblau

1 mM EDTA 14 % (v/v) β -Mercaptoethanol

frisch hinzugeben:

0,2 % (v/v) PIC

0,5 mM PMSF

1 mM Natriumorthovanadat

1 μ M MG-132

10 μ M SAHA

Laufpuffer pH 8,5

Wasser

25 mM TRIS

192 mM Glycerin

0,1 % (w/v) SDS

Blotpuffer pH 8,5

Wasser

20 mM TRIS

150 mM Glycerin

10 % Ethanol

Ponceau S-Lösung

Wasser

0,2 % (v/v) Ponceau S

3 % (v/v) Trichloressigsäure

3 % (v/v) 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat

Puffer 1

Wasser

10 mM TRIS

1 mM EGTA

80 mM NaCl

10 % (w/v) Saccharose

0,1 % (v/v) Triton™ X-100

frisch hinzugeben:

2 mM PMSF

Puffer 3

Wasser

10 mM TRIS

1 mM EGTA

80 mM NaCl

10 % (w/v) Saccharose

frisch hinzugeben:

2 mM PMSF

Saccharosegradient

Wasser

10 mM TRIS

1 mM EGTA

80 mM NaCl

50 % bzw. 20 % (w/v)

Saccharose

Trenngel

Wasser

10 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung

124 mM TRIS pH 8,8

0,05 % (w/v) SDS

0,4 % (v/v) APS

0,1 % (v/v) TEMED

Blockierlösung

TBS

5 % (w/v) Milchpulver

Sammelgel

Wasser

4 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung

377 mM TRIS pH 6,8

0,05 % (w/v) SDS

0,8 % (v/v) APS

0,08 % (v/v) TEMED

Strippingpuffer pH 6,7

Wasser

63 mM TRIS

2 % (w/v) SDS

frisch hinzugeben:

100 mM β -Mercaptoethanol**2.1.4.3 Kits**

Amersham™ <i>Enhanced Chemiluminescence (ECL) Kit</i>	GE Healthcare, Chicago, Vereinigte Staaten von Amerika
Micro Bicinchoninic Acid (BCA)™ <i>Protein Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Pierce™ <i>BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

2.1.4.4 Antikörper

Tabelle 3: Übersicht über die in den proteinbiochemischen Methoden verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Primär			
anti-Aktin Ab5 (612656)	Maus (monoklonal) IgG ₁ , Klon C4	1:5.000	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
anti-CD63 (10628D)	Maus (monoklonal) IgG ₁ , Klon Ts63	1:1.000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
anti-CD81 (PA5-85150)	Kaninchen (polyklonal) IgG	1:500	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
anti-Flag (F1804)	Maus (monoklonal), IgG ₁ , Klon M2	1:1.000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
anti-GFP (1181446001)	Maus (monoklonal) IgG _{1, κ} , Klone 7.1, 13.1	1:1.000	Roche Holding AG, Basel, Schweiz
anti-HA (2367)	Maus (monoklonal) IgG ₁ , Klon 6E2	1:1.000	Cell Signaling Technology®, Danvers, Vereinigte Staaten von Amerika

anti-HA (H6908)	Kaninchen (polyklonal)	1:1.000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
anti-HR23A (sc-365669)	Maus (monoklonal) IgG _{1, κ} , Klon D-6	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Vereinigte Staaten von Amerika
anti-HR23B (ab86781)	Kaninchen (polyklonal)	1:1.000	Abcam®, Cambridge, Großbritannien
anti-Htt (ab109115)	Kaninchen (monoklonal) IgG, Klon EPR5526	1:1.000	Abcam®, Cambridge, Großbritannien
Sekundär			
anti-Kaninchen (ab6721)	Ziege (polyklonal) IgG, Meerrettichperoxidase (englisch: <i>horseradish peroxidase</i> , HRP)- konjugiert	1:20.000	Abcam®, Cambridge, Großbritannien
anti-Kaninchen <i>TrueBlot</i> (18-8816-33)	Maus (monoklonal) IgG, Klon eB182, HRP- konjugiert	1:1.000	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
anti-Maus (ab6789)	Ziege (polyklonal) IgG, HRP-konjugiert	1:10.000	Abcam®, Cambridge, Großbritannien
anti-Maus <i>TrueBlot</i> (18-8817-33)	Ratte (monoklonal) IgG, Klon eB144, HRP- konjugiert	1:1.000	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial

μ Säulen für MACS™

Hersteller

Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach,
Deutschland

μMACS™ Separator

Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach,
Deutschland

BD Plastipak™ (1 ml), BD Discardit™ (10 ml)

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Zelluloseacetatmembran (0,22 μm)

Steriltech Corporation, Auburn, Vereinigte Staaten
von Amerika

Deckgläser Menzel™-Gläser 24x60 mm	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Einweg-Wägeschiffchen	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Entsorgungsbeutel SEKUROKA®	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Erlenmeyerkolben DURAN® 500 ml	Schott AG, Mainz, Deutschland
Filter EASYstrainer™ für 50 ml Röhrchen (40 µm)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Filter Filtropur S (0,22 µm)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Gelmesser Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Gelreaktionsgefäße Phase Lock Gel™ 2 ml	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
gentleMACS™ M Röhrchen	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
Glasflaschen KIMAX™ (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Glaspipetten Precicolor (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	HBG Henneberg-Sander GmbH, Gießen-Lützellinden, Deutschland
Handschuhe Vasco® Nitril	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Hebelschneider IDEAL 1046	Krug & Priester GmbH & Co. KG, Balingen, Deutschland
Inkubationsschalen für Western Blot	Labcor™, Contagem, Brasilien
Kanüle BD Microlance™ 3 (27G);	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kanüle Sterican® (20G)	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Kryo-Röhrchen Nunc™ (1 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Lagerungsboxen Nalgene®	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Magnet-Rührstäbchen	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Mehrkanalpipette Transferpipette® S-12	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Mikrotiterplatten (96-Well)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

Mikrotiterplattendeckel	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Mikrotiterplatten für Operetta® CLS™ PhenoPlate™ (96-Well)	PerkinElmer Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Multiwellplatten Cellstar™ (6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Nitrozellulosemembran Amersham™ Protran™ (0,45 µm)	Cytiva, Marlborough, Vereinigte Staaten von Amerika
Objektträger Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Parafilm™ M Bemis™ Curwood	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Pasteurpipetten aus Glas (230 mm)	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (200 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Ständer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Petrischale (9,4 cm)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1 ml)	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettenkarussell	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1 ml)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen Gelloader (200 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen SafeSeal (10 µl, 200 µl, 1 ml)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettierhilfe Automatic-Sarpette®	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfe Pipet-Aid® XP	Drummond Scientific Company, Broomall, Vereinigte Staaten von Amerika
Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran Amersham™ Hybond™ (0,45 µm)	Cytiva, Marlborough, Vereinigte Staaten von Amerika
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß-Ständer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Schlauchfolie	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Teströhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

Ultrazentrifugenröhrchen für SW40 Ti (14 ml)	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Wecker Timer ROTILABO®	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Whatman™-Papier (3 mm)	Cytiva, Marlborough, Vereinigte Staaten von Amerika
Zählkammer Countess™ Cell Counting Chamber Slides	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Zellkulturflaschen Cellstar™ (250 ml, 650 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturröhrchen (14 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschale Cellstar™ (10 cm)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber (28 cm)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen-Ständer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland

2.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem neoVAQ Maxi	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Analysenwaage AC AC210 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklaven VE-120 & VX-150	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Bakterienbank AURA-2000 MAC	Euroclone S.p.A., Mailand, Italien
Bio-Dot® Apparatur	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika
Blot-Dokumentationsgerät ChemiDoc™ <i>MP Imaging System</i>	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika
Blottingsystem C.B.S. Scientific EBX-700	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Durchflusszytometer BD Accuri™ C6	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer BD LSRFortessa™ <i>Cell Analyzer</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Eisbereiter UFP 0388 A	Manitowoc Ice Inc., Manitowoc, Vereinigte Staaten von Amerika

Elektrophoresesystem C.B.S. Scientific DCX-700	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer 7	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Folienschweißgerät ES-300	Geho Pack Service GmbH, Heidgraben, Deutschland
Gefrierschrank GP 1376 Premium (-20 °C)	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Gefrierschrank MDF-C2156VAN (-150 °C)	Sanyo Denki K.K., Moriguchi, Japan
Gefrierschrank MDF-U3386S (-80 °C)	Sanyo Denki K.K., Moriguchi, Japan
Geldokumentationssystem Gel Doc XR	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika
Dissoziator gentleMACS™	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>High-Content-Analysesystem Operetta® CLS™</i>	PerkinElmer Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Inkubationsschüttler New Brunswick™ I26	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Inkubator Heraeus® HERAcCell™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Konzentrator Plus	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank FKvsl 3613 (4 °C)	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Kühlschrank KU 407 2-G LED (4 °C)	NordCap® GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Laborwaage MXX-2001	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer FB15001	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Magnetrührer Hei-Mix L	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer lab disc white	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Membran-Vakuumpumpe N035.3AN18	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mikroplattenreader CLARIOstar®	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Telaval 31	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle KOR-6305	DAEWOO, Seoul, Südkorea
Minigel-Elektrophoresesysteme Owl™ EasyCast™ B1A	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

Minizentrifuge Sprout®	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Multi-Mixer MyLab SLRM-3	NanoEntek, Seoul, Südkorea
Multiplattenreader Multiskan EX	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Netzgerät BluePower™ 500	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Netzgerät PowerPac™ 300	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika
pH-Meter HI2210	Hanna® Instruments Inc., Woonsocket, Vereinigte Staaten von Amerika
Rollenmischer RS-TR 5	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Rotationsmischer Tube Rotator L29	Labinco BV, Breda, Niederlande
Spektralphotometer NanoDrop™ 1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Sterilbank AURA-2000 MAC	Euroclone S.p.A., Mailand, Italien
Thermocycler Mastercycler® Gradient	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Thermoschüttler Pro	CellMedia GmbH & Co. KG, Elsteraue, Deutschland
Thermoschüttler ThermoMixer® F1.5	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank Heraeus® Kelvitron T	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Ultrazentrifuge OPTIMA™ L-100XP	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Vakuuierier für Mikrotiterplatten Pall®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Vortexmischer MS-2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad GFL 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Wippschüttler Biometra Rocking Platform WT15	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Wippschüttler Duomax 2030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wippschüttler Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

Zellzähler Countess™ Automated Cell Counter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5425	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5425 R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus™ Biofuge® Fresco	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Zentrifuge Heraeus™ Biofuge® Pico	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Zentrifuge Hettich Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Hettich Universal 320	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge ZK380	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

2.1.7 Software

BD Accuri™ C6 Analysis Software, Version 1.0.264.21	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD FACSDiva™ Software, Version 9.2	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Citavi 6, Version 6.11.0.0	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Image Lab™, Version 6.0.1	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika
Chromas, Version 2.6.6	Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australien
Harmony® <i>High-Content Imaging and Analysis</i> Software, Version 4.8	PerkinElmer Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
ImageJ, Version 1.53a	National Institutes of Health, Bethesda, Vereinigte Staaten von Amerika
MARS <i>Analysis</i> Software, Version 3.20 R2	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland
Microsoft Office 365 (Excel, PowerPoint, Word), Version 16.0.15601.20148	Microsoft® Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika
NanoDrop™ 1000, Version 3.3	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Origin 2019, Version 9.60.172	Originlab Corporation, Northampton, Vereinigte Staaten von Amerika

Quantity One®, Version 4.6.2

Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte
Staaten von Amerika

ZEN (blue edition), Version 2.3 SP1

Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die verwendete Zelllinie U2OS wurde ursprünglich als 2T Zelllinie bezeichnet. Die Zellen wurden aus einem mesenchymalen Tumor (Osteosarkom), welcher sich in den Schienbeinen eines 15-jährigen Mädchen befand, isoliert. Die Zelllinie wurde 1964 etabliert und weist eine epithelial adhärente Morphologie auf (Pontén und Saksela 1967). Aus den U2OS Zellen wurden von Diana Panfilova mittels CRISPR/Cas9 die Knockoutzelllinien HR23A^{KO} und HR23B^{KO} erfolgreich generiert und charakterisiert. Die Überexpression von HR23B erfolgte mit Hilfe eines *Tet-on* Systems. Dabei wird die Genexpression in Gegenwart eines Tetrazyklins (z.B. Doxycyclin) reversibel induziert (Das et al. 2016; Gossen et al. 1995). Die mit einem *Tet-on* System stabil transfizierten Zelllinien Tre (ohne Gen als Kontrolle) und HR23B[↑] (Überexpression von HR23B) wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe Olzscha hergestellt.

Die U2OS, HR23A^{KO} und HR23B^{KO} Zellen wurden in DMEM, welches 10 % FKS und 1 % Penicillin-Streptomycin enthielt (s. 2.1.2.3), bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Selektion der *Tet-on* System enthaltenden Zellen, wurde das Medium der Tre und HR23B[↑] Zellen zusätzlich mit 0,1 mg/ml Hygromycin B und 0,1 mg/ml G-418 (s. 2.1.2.3) versetzt. Die Induktion des *Tet-on* Systems erfolgte mittels 1 µg/ml Doxycyclin.

Die adhärenenten Zellen wurden bei einer Konfluenz von circa 80 % passagiert. Dazu wurden die Zellen in einer 250 ml Zellkulturflasche zunächst mit 10 ml 1x PBS (s. 2.1.2.3) gewaschen und anschließend für 5 min mit 2,5 ml einer Trypsin-EDTA Lösung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Trypsin spaltet dabei die Adhäsionsmembranproteine (Brown et al. 2007). Nach der Ablösung der Zellen von der Flaschenoberfläche wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 2,5 ml des jeweiligen Mediums gestoppt. Die Zellen wurden 1:5 gesplittet und zur weiteren Kultivierung in 10 ml Medium aufgenommen. Zur Kontrolle auf Verunreinigungen wurde regelmäßig eine Mykoplasmen-PCR durchgeführt (s. 2.2.2.5).

2.2.1.2 Kultivierung von nicht-adhärenenten Zellen

THP-1 Zellen sind Monozyten, welche aus dem Blut eines Einjährigen mit akuter myeloischer Leukämie isoliert wurden (Tsuchiya et al. 1980). Die Kultivierung der THP-1 Zellen erfolgte in RPMI 1640 mit 10 %

FKS und 1 % Penicillin-Streptomycin (s. 2.1.2.3). Die Zellen wurden bei einer Dichte zwischen $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml und $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml 1:5 geteilt und in frischem Medium aufgenommen.

2.2.1.3 Kryokonservierung mammalischer Zellen

Zur Konservierung der einzelnen Zelllinien wurden die adhärenenten Zellen analog zu 2.2.1.1 in Suspension gebracht. Diese bzw. die Suspensionskultur der THP-1 Zellen wurden bei 360 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 2 ml Kryomedium (s. 2.1.2.3) pro 650 ml Zellkulturflasche resuspendiert. In einem sterilen Kryo-Röhrchen wurden die Zellen zunächst für 2 bis 3 h bei -20 °C eingefroren, anschließend über Nacht bei -80 °C und zur dauerhaften Lagerung bei -150 °C. Zur Revitalisierung der Zellen wurden diese aufgetaut und für 5 min bei 360 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml des jeweiligen Mediums aufgenommen und in eine 250 ml Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die adhärenenten Zellen wie unter 2.2.1.1 beschrieben in Suspension gebracht, die THP-1 Zellen konnten ohne weitere Behandlung entnommen werden. 10 μ l der jeweiligen Zellsuspension wurde mit 10 μ l einer 0,4%igen Trypanblaulösung versetzt und die Zellzahl mit Hilfe eines automatischen Zellzählers bestimmt. Trypanblau kann nicht durch eine intakte Zellmembran diffundieren, sodass lebende Zellen nicht angefärbt werden, während abgestorbene Zellen den Farbstoff aufnehmen (Strober 2015). Das benötigte Volumen für die Aussaat der Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$V_{Zellsuspension} = \frac{\text{Anzahl der gewünschten Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Zellen pro ml}}$$

2.2.1.5 Synchronisation mammalischer Zellen

Zur Untersuchung der HR23B-Expression in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde ein Protokoll zur Synchronisation von U2OS und HR23B^{KO} Zellen etabliert (Apraiz et al. 2017). Die Zellen konnten nach der Behandlung mit Hydroxyurea in der G1- bzw. S-Phase detektiert werden, für den Proliferationsstopp in der G2-Phase wurde ein Thymidin-Nocodazol-Block durchgeführt. Für beide untersuchten Zelllinien wurden eine ungefärbte Probe, die einzelnen Farbstoffe, eine IgG Kontrolle und eine asynchrone Probe mit allen Farbstoffen mitgeführt.

Sowohl für die Behandlung mit Hydroxyurea als auch für die Behandlung mit Thymidin und Nocodazol wurden zunächst $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in einer 6-Well Platte ausgesät (s. 2.2.1.4) und über Nacht in 2 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Für die Analyse der Zellen in der G1- und S-Phase wurden die Zellen mit 2 ml 1x PBS (s. 2.1.2.3) gewaschen und für 24 h bei 5 % CO₂ und 37 °C unter Nährstoffmangel in 2 ml FKS-freiem Medium kultiviert. Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h in 2 ml komplettem Medium, welches 4 mM Hydroxyurea enthält. Hydroxyurea inhibiert das Enzym

Ribonukleotidreduktase, welches die Reduktion von Ribose in Desoxyribose katalysiert. Dadurch sinkt die Produktion der Deoxynukleosidtriphosphate und die DNS-Synthese wird unterbrochen (Apraiz et al. 2017). Anschließend wurden die Zellen erneut mit 2 ml 1x PBS gewaschen und in 2 ml normales Medium entlassen, sodass sie den Zellzyklus synchron weiter durchlaufen konnten. Nach 3 h wurde die Probe für die G1-Phase entnommen, nach 9 h die Probe für die S-Phase.

Für den Proliferationsstopp in der G-2 Phase wurden die ausgesäten Zellen mit 2 mM Thymidin behandelt. Thymidin blockiert die DNS-Replikation während der S-Phase (Chen und Deng 2018). Nach 20 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen für 5 h wieder in 2 ml normalem Medium inkubiert. Danach erfolgte die Behandlung mit 50 ng/ml Nocodazol, welches die Polymerisation der Mikrotubuli inhibiert (Blajeski et al. 2002). Nach einer Inkubation von 8 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen erneut in 2 ml normales Medium überführt und nach 1 h für die Analyse in der Durchflusszytometrie (s. 2.2.1.6) geerntet.

2.2.1.6 Analyse der synchronisierten Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Analyse der synchronisierten Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Bei dieser Methode passieren die vereinzelt Partikel eine monochromatische Lichtquelle. Anhand der daraus resultierenden Streuung und Fluoreszenz können die physikalischen sowie molekularen Eigenschaften dieser Partikel analysiert werden (McKinnon 2018). Dazu wurden die synchronisierten Zellen von 2.2.1.5 mit 2 ml 1x PBS (s. 2.1.2.3) gewaschen und mit 300 µl einer Trypsin-EDTA Lösung von der 6-Well Platte abgelöst. Anschließend wurden die trypsinierten Zellen in 1 ml Medium aufgenommen, in ein 15 ml Teströhrchen überführt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml kalten 70%igen Ethanol (in 1x PBS) fixiert und für 15 min auf Eis inkubiert bevor es bei 4 °C für die Durchflusszytometrie gelagert wurde.

Zur Messung der Zellen wurden diese zunächst für 1 min bei 360 g zentrifugiert und das Pellet mit 100 µl Färbepuffer (s. 2.1.2.3) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet für 1 h mit dem Primärantikörper anti-HR23B bzw. der IgG Kontrolle 1:50 in Färbepuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 100 µl Färbepuffer wurde der Ansatz für 30 min mit dem Dylight 649-markierten Sekundärantikörper anti-Kaninchen (1:300 in Färbepuffer) bei Raumtemperatur im Dunklen behandelt. Die Zellen wurden abermals bei 1.000 rpm für 1 min zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml Färbelösung (s. 2.1.2.3) für 20 min im Dunklen bei 4 °C inkubiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen mit 250 µl 1x PBS gewaschen und jeweils 20.000 Partikel in der Durchflusszytometrie gemessen. Der Ausschluss von Zelltrümmern erfolgte dabei über das Vorwärtstreulicht (FSC; englisch für *forward scatter*), über welches die Partikelgröße bestimmt werden kann und über das Seitwärtstreulicht (SSC; englisch für *sideward scatter*), welches Auskunft über die Granularität der Zellen gibt (McKinnon 2018). Des Weiteren wurden die

Fluoreszenzsignale von Propidiumiodid (FL-2: $\lambda_{\text{ex}}=488$ nm, $\lambda_{\text{em}}=585$ nm) und Dylight 649 (FL-4: $\lambda_{\text{ex}}=633$ nm, $\lambda_{\text{em}}=675$ nm) in den Zellen gemessen. Der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen konnte über die Auftragung der gezählten Zellen gegen das FL-2-Signal bestimmt werden. Außerdem konnte die Signalintensität von HR23B über den Kanal FL-4 gemessen übernommen werden. Die statistische Auswertung erfolgte entsprechend 2.2.4 in Origin.

2.2.1.7 Transiente Transfektion mammalischer Zellen mittels GeneJuice®

Bei der transienten Transfektion wird kurzfristig fremde DNS in eukaryotische Zellen eingebracht (Chong et al. 2021). Die Transfektion der adhärennten Zellen erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenz GeneJuice®. Dieses basiert entsprechend der Herstellerangaben nicht auf Lipofektion und ist somit weniger toxisch. Weiterhin besticht es durch eine hohe Transfektionseffizienz. Die verwendeten Plasmide enthielten Exon 1 von Huntingtin mit unterschiedlicher Anzahl von Glutaminresten (Htt20Q, Htt97Q, Htt23Q-HA, Htt74Q-HA, Htt23Q, Htt74Q, Htt97Q-GFP). Als Negativkontrolle für Htt20Q, Htt97Q, Htt23Q-HA und Htt74Q-HA diente der leere Vektor pcDNA3, für die GFP-gekoppelten Plasmide Htt23Q, Htt74Q und Htt97Q-GFP wurde peGFP (leerer Vektor mit GFP) eingesetzt.

Bei der Durchführung der transienten Transfektion wurde sich weitestgehend am Herstellerprotokoll orientiert. Die Zellen wurden gemäß 2.2.1.4 so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion 70 % bis 90 % Konfluenz aufwiesen. Das nach Herstellerprotokoll angegebene Volumen Opti-MEM™ wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bevor das Transfektionsreagenz GeneJuice® darin 1:25 (v/v) tropfenweise verdünnt wurde. Der Ansatz wurde mittels Vortexmischer vermengt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNS in einem Verhältnis 1:50 (w/v) eingesetzt und der Ansatz vorsichtig gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der komplette Ansatz tropfenweise zu den ausgesäten Zellen gegeben und diese für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Zur Optimierung der Transfektion wurden weitere Bedingungen getestet. Darunter zählte die analoge Behandlung mit 1 mg/ml Polyethylenimin, eine verlängerte Inkubationszeit mit dem Transfektionsansatz auf 72 h und eine sechsstündige Behandlung mit Serum-freien Medium nach der Transfektion, bevor erneut normales Medium hinzugegeben wurde. Die Optimierung wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (s. 2.2.1.8) sowie Western Blot (s. 2.2.3.4) überprüft.

2.2.1.8 Detektion von Huntingtin und HR23B in der Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der Immunfluoreszenzmikroskopie werden fluoreszierende Antikörper verwendet, um bestimmte Strukturen oder Moleküle sichtbar zu machen (Im et al. 2019). Für die Detektion von Huntingtin und HR23B unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden $1,5 \cdot 10^4$ Zellen, wie unter 2.2.1.4 beschrieben, in einem Objektträger Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System ausgesät. Nach erfolgreicher Transfektion mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q bzw. Htt23Q-HA und Htt74Q-HA (s. 2.2.1.7) und optionaler Induktion

mittels Doxycyclin (s. 2.2.1.1) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 150 μ l 1x PBS (s. 2.1.2.3) gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch eine 45-minütige Behandlung mit 150 μ l 4%igem Paraformaldehyd (Fixierlösung s. 2.1.2.3) bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut mit 150 μ l 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 150 μ l 0,5%igen Triton™ X-100 (Permeabilisierungslösung s. 2.1.2.3) permeabilisiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur erfolgten zwei Waschschriffe mit 150 μ l 1x PBS und ungewünschte Bindestellen wurden mit einer 1%igen BSA-Lösung (s. 2.1.2.3) für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Die Zellen wurden mit dem primären Antikörper anti-HA zur Detektion von Huntingtin (1:50 in 1%igem BSA) und optional mit anti-HR23B (1:100 in 1%igem BSA) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal 10 min mit 150 μ l 1x PBS gewaschen und der sekundäre FITC-markierte Antikörper anti-Kaninchen bzw. anti-Maus (1:800 in 1x PBS) hinzugegeben. Weiterhin wurde auch der Kernfarbstoff Hoechst 1:2.000 hinzugefügt und optional der Dylight 649-markierte Sekundärantikörper anti-Kaninchen 1:300. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut dreimal für jeweils 15 min mit 1x PBS gewaschen und mit 4%igem Paraformaldehyd 15 min behandelt. Nach einem letzten Waschschriff mit 1x PBS wurde die Kammer entfernt und der Objektträger mehrmals in destilliertes Wasser getaucht und getrocknet. Zuletzt wurde das Deckglas mit *Mounting Medium* auf dem Objektträger fixiert, sodass Huntingtin und HR23B unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden konnten. Das dafür verwendete Ölimmersionsobjektiv hatte eine Vergrößerung von 63x und die verwendeten Kanäle wurden anhand der Farbstoffe ausgewählt (Hoechst: $\lambda_{\text{ex}}=350$ nm, $\lambda_{\text{em}}=461$ nm; FITC: $\lambda_{\text{ex}}=491$ nm, $\lambda_{\text{em}}=516$ nm; Dylight 649: $\lambda_{\text{ex}}=655$ nm, $\lambda_{\text{em}}=670$ nm).

Zur Analyse der Htt97Q-Strukturen wurde das Proteostat® *Protein Aggregation Kit* verwendet. Der Farbstoff interkaliert in β -Strukturen und färbt somit Aggregate (Oshinbolu et al. 2018; Navarro und Ventura 2014). Diese können unter dem Fluoreszenzmikroskop ($\lambda_{\text{ex}}=500$ nm, $\lambda_{\text{em}}=600$ nm) sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Zellen nach der Behandlung mit dem Sekundärantikörper dreimal kurz mit 1x PBS gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit Proteostat® (1:2.000 in 1x PBS) inkubiert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Fixierung mit Ethanol, welche für die Analyse der synchronisierten Zellen in der Durchflusszytometrie verwendet wurde (s. 2.2.1.6), wurden die ausgesäten Zellen anstelle von Paraformaldehyd und Triton™ X-100 durch eine 10-minütige Inkubation bei -20 °C mit 96%igem Ethanol fixiert und permeabilisiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben unter der Verwendung des Primärantikörpers anti-HR23B, des Sekundärantikörpers anti-Kaninchen-Dylight 649 und Hoechst.

Die Quantifizierung der Htt97Q-Aggregate in Tre und HR23B[↑] Zellen erfolgte unter Verwendung des *High-Content-Analysesystem Operetta[®] CLS[™]*. Dazu wurden $1 \cdot 10^4$ Zellen in einer 96-Well Corning Flat Bottom Zellkulturplatte ausgesät. Die Transfektion erfolgte analog zu 2.2.1.7 und die Fixierung, Permeabilisierung, Blockierung und Färbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Zellen konnten anschließend ohne Eindecken mit einem 40er Objektiv dargestellt werden. Im Anschluss an die Messung wurden mit Hilfe der Harmony[®] *High-Content Imaging and Analysis* Software die Fläche der einzelnen Nuklei und des Zytoplasmas detektiert, sowie die Anzahl der Aggregate über die Funktion „find spots“ bestimmt. Die Verhältnisse von Nukleus zu Zytoplasma und der Aggregate zu den Zellen wurden mittels Excel berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte über Origin (s. 2.2.4).

2.2.1.9 Isolation der extrazellulären Vesikel

Extrazelluläre Vesikel können über ihre Größe und Dichte mit Hilfe von Ultrazentrifugation isoliert werden (Brás et al. 2022; Wang et al. 2021). Dazu wurden zunächst $3 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät (s. 2.2.1.4), optional wurde die Überexpression von HR23B mit Doxycyclin induziert und anschließend wurden die Zellen analog zu 2.2.1.7 transfiziert. Das extrazelluläre Vesikel enthaltende Zellkulturmedium wurde abgenommen und bei 300 g für 10 min zentrifugiert, um tote Zellen zu entfernen. Im Anschluss wurde der Überstand zur Beseitigung von Zelltrümmern bei 2.000 g für 20 min zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen extrazellulären Vesikel wurden für 90 min bei 100.000 g pelletiert, das Pellet mit 1x PBS (s. 2.1.2.3) gewaschen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet im verbliebenen 1x PBS resuspendiert. Um mehrfaches Einfrieren und Auftauen zu vermeiden, wurden die extrazellulären Vesikel aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für eine Differenzierung zwischen Mikrovesikeln und Exosomen wurde der Überstand vor der Zentrifugation bei 100.000 g für 90 min bei 20.000 g zentrifugiert. Die im Pellet befindlichen Mikrovesikel wurden mit 1x PBS gewaschen und abermals zentrifugiert, die im Überstand befindlichen Exosomen wurden wie oben beschrieben bei 100.000 g pelletiert, gewaschen und erneut pelletiert.

Neben der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation wurden das *MACS Exosome Isolation Kit CD63* und das Minute[™] *High-Efficiency Exosome Precipitation Reagent* zur Isolation der extrazellulären Vesikel entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Bei dem *MACS Exosome Isolation Kit CD63* werden die extrazellulären Vesikel mittels anti-CD63, welches an Kleinstpartikel gekoppelt ist, magnetisch markiert und in einer Säule in einem magnetischen Feld festgehalten, während Verunreinigungen weggespült werden. Durch das Entfernen des magnetischen Feldes können die aufgereinigten extrazellulären Vesikel anschließend eluiert werden.

2.2.1.10 Bestimmung der Menge der extrazellulären Vesikel mittels Durchflusszytometrie

Die semiquantitative Bestimmung der Menge der extrazellulären Vesikel erfolgte über die Detektion von CD63 im Durchflusszytometer. Dafür wurden die Zellen analog zu 2.2.1.9 behandelt und nach

erfolgreicher Transfektion 190 μl des extrazellulären Vesikel enthaltenden Überstandes mit 10 μl anti-CD63-PE gemischt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen wurden 180 μl der Probe im Durchflusszytometer gemessen.

Für die Bestimmung der ausgeschütteten Zytokine von Immunzellen nach Zugabe der extrazellulären Vesikel (s. 2.2.1.13) sollte die gleiche Menge an extrazellulären Vesikeln eingesetzt werden. Dafür wurden 20 μl der aufgereinigten extrazellulären Vesikel mit 10 μl anti-CD63-PE für 1 h bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und vor der Messung 170 μl 1x PBS (s. 2.1.2.3) hinzugegeben. Es wurden 150 μl gemessen.

Das Fluoreszenzsignal von Phycoerythrin (PE) konnte in dem Kanal FL-2 ($\lambda_{\text{ex}}=488\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=585\text{ nm}$) detektiert werden. Zum Ausschluss von unspezifischen Signalen wurde eine IgG Kontrolle mitgeführt, welche vom gemessenen Fluoreszenzsignal abgezogen wurde. Die statistische Auswertung erfolgte entsprechend 2.2.4 in Origin.

2.2.1.11 Bestimmung des Huntingtingehalts in extrazellulären Vesikeln mittels Durchflusszytometrie

Da sich die semiquantitative Bestimmung des Huntingtingehalts im Western Blot als sehr schwierig erwies, wurde der Proteingehalt des GFP-gekoppelten Huntingtins in extrazellulären Vesikeln über die Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurden die extrazellulären Vesikel mittels Ultrazentrifugation (s. 2.2.1.9) isoliert und CD63 analog zu 2.2.1.10 mit Hilfe von einem PE-gekoppelten Antikörper markiert. Die Proteingehaltbestimmung von Huntingtin erfolgte in den CD63-positiven extrazellulären Vesikel über das gekoppelte GFP im Kanal FL-1 ($\lambda_{\text{ex}}=488\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=530\text{ nm}$). Die Signale wurden auf die jeweilige Kontrolle mit peGFP in Excel normalisiert und in Origin entsprechend 2.2.4 statistisch ausgewertet.

2.2.1.12 Analyse der Oberflächenproteine von extrazellulären Vesikeln mittel MACSPlex

Die Oberflächenproteine der extrazellulären Vesikel wurden über das *MACSPlex Exosome Kit* entsprechend dem Herstellerprotokoll bestimmt. Dabei wurden die extrazellulären Vesikel zunächst wie unter 2.2.1.9 beschrieben über das *MACS Exosome Isolation Kit* CD63 isoliert und ihre Proteinkonzentration über ein *Micro BCA™ Protein Assay Kit* bestimmt (s. 2.2.3.2). Zur Bestimmung der Oberflächenproteine wurde ein Detektionsreagenz mit verschiedenen, gegen diese Proteine gerichteten, Antikörper, hinzugegeben. Die Messung in der Durchflusszytometrie erfolgte mit folgenden Einstellungen: sample flow rate = 2 $\mu\text{l}/\text{s}$, sample volume = 140 μl , mixing volume = 100 μl , mixing speed = 250 $\mu\text{l}/\text{s}$, no. of mixes = 4, wash volume = 400 μl .

Die Signalwerte für die einzelnen Populationen wurden aus der BD FACSDiva™ Software in Excel exportiert und der Blindwert wurden von den Werten subtrahiert. Anschließend wurden die Werte auf

die Marker CD9, CD63 und CD81 sowie auf die Negativkontrolle (pcDNA3) normalisiert und die Veränderungen jedes Oberflächenproteins in Origin statistisch ausgewertet (s. 2.2.4).

2.2.1.13 Detektion der von Immunzellen ausgeschütteten Zytokine unter Zugabe von extrazellulären Vesikeln

Mit Hilfe des CBA Human Inflammatory Cytokine Kit wurde untersucht, ob sich die Zytokinausschüttung von Immunzellen durch die Zugabe der isolierten extrazellulären Vesikel verändert. Die dafür verwendete Monozyten-Zelllinie THP-1 kann zunächst zu nicht-aktivierten Makrophagen (M0) differenziert werden und anschließend zu proinflammatorischen Makrophagen (M1) polarisiert werden (Baxter et al. 2020). Dazu wurden $1 \cdot 10^5$ THP-1 Zellen in einer 24-Well Platte ausgesät (s. 2.2.1.4) und in Differenzierungsmedium (s. 2.1.2.3) kultiviert. Die differenzierten Makrophagen (M0) adhären und proliferieren nicht mehr. Die Zellen wurden anschließend für 48 h mit Hilfe des entsprechenden Mediums zum Phänotypen M1 polarisiert (s. 2.1.2.3) und mit der gleichen Anzahl an extrazellulären Vesikeln für 24 h behandelt.

Für die Analyse der ausgeschütteten Zytokine wurde der Überstand entnommen und dieser entsprechend den Herstellerangaben mit dem CBA Human Inflammatory Cytokine Kit behandelt und im Durchflusszytometer gemessen. Nach Erstellen einer Standardkurve konnte die Konzentration der Zytokine in Excel berechnet werden und in Origin statistisch ausgewertet werden (s. 2.2.4).

2.2.1.14 Hyperacetylierung adhärenter Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses der Acetylierung wurde der HDAC-Inhibitor SAHA verwendet. Er verhindert die Deacetylierung der Proteine und sorgt somit für eine Hyperacetylierung des Proteoms (Gediya et al. 2005). Dazu wurden die Zellen mit 10 μ M SAHA für 24 h behandelt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmiden

Zur Vervielfältigung der verwendeten Plasmide (s. 2.2.1.7) wurden chemisch kompetente *E. coli* Bakterien des Stammes DH5 α mittels Hitzeschock transformiert. Es wird davon ausgegangen, dass dabei sich dabei die Poren der Zellen weiten und die DNS leichter aufgenommen wird (Froger und Hall 2007). Dazu wurden jeweils 50 μ l der Bakterien mit 10 ng Plasmid versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Die Bakterien wurden nach Zugabe von 500 μ l vorgewärmtem SOC-Medium für 1 h bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Abschließend wurden 20 μ l des Ansatzes auf vorgewärmte Agarplatten mit der jeweiligen Antibiotikaresistenz ausplattiert (s. 2.1.3.5) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen Kolonien konnten dann für die Plasmidpräparation (s. 2.2.2.2) gepickt werden.

2.2.2.2 Plasmidpräparation

Bei der Plasmidpräparation wird die Plasmid-DNS ähnlich zur DNS-Extraktion aus Zellen aufgereinigt. Für eine möglichst hohe Ausbeute wurde eine Maxi-Plasmidpräparation verwendet. Dafür wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt, bei der 4 ml LB-Medium (s. 2.1.3.3) mit 4 µl Antibiotika (s. 2.1.3.5) und einer transformierten Kolonie (s. 2.2.2.1) versetzt wurde. Die Vorkultur wurde für 6 h bei 37 °C und 170 rpm geschüttelt. Im Falle einer gewünschten Glycerolstammlösung wurden 500 µl der Vorkultur mit 500 µl 50%igem Glycerol bei -80 °C eingefroren. Für die Maxi-Plasmidpräparation wurden 200 µl der Vorkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium und 200 µl Antibiotika überführt und über Nacht bei 37 °C und 170 rpm inkubiert.

Die Plasmidpräparation erfolgte nach den Herstellerangaben des PureLink® *HiPure Plasmid Filter DNA Purification Kits*. Das Plasmid wurde zunächst in 200 µl Wasser aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt (s. 2.2.2.4). Für die weitere Verwendung im Rahmen einer Transfektion (s. 2.2.1.7) wurde das Plasmid mit Wasser auf 1 µg/µl eingestellt und bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.3 Isolation genomischer DNS

Die genomische DNS der von Diana Panfilova generierten CRISPR/Cas9-basierte Doppelknockoutzelllinie HR23A/B^{KO} wurde mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion von den Proteinen und der RNS getrennt und anschließend durch Ethanol gefällt. Dazu wurde bei der Zellernte die Zellzahl bestimmt (s. 2.2.1.4). Die Zellen wurden für 5 min bei 500 g zentrifugiert und das Pellet zunächst in 4 ml eiskaltem 1x PBS (s. 2.1.2.3) resuspendiert. Der Zentrifugations- sowie der Waschschrift wurden mit 1 ml 1x PBS wiederholt. Ehe das Pellet in 1 Volumen Verdauungspuffer (1 ml Verdauungspuffer / 10⁸ Zellen, mindestens jedoch 300 µl, s. 2.1.3.3) aufgenommen wurde, wurden die Zellen erneut pelletiert. Anschließend wurden die Zellen bei 50 °C und 200 rpm für 12 bis 18 h geschüttelt, bis die Probe viskos und klar war. Für eine bessere Auftrennung wurden Gelreaktionsgefäße verwendet und das Gel zuvor für 1 min bei 16.000 g herunterzentrifugiert. Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgte durch die Zugabe von 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol. Die Probe wurde für 10 min bei 1.700 g zentrifugiert. Zur Reinigung der Nukleinsäuren wurde die obere wässrige Schicht in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 30 µl einer 3 M Natriumacetatlösung sowie 600 µl 99,8%iger Ethanol hinzugegeben. Die dadurch präzipitierten Nukleinsäuren wurden für 2 min bei 1.700 g zentrifugiert und mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 300 µl Wasser resuspendiert. Eine bessere Lösung der Nukleinsäuren konnte durch 45-minütiges Schütteln bei 65 °C erzielt werden. Die RNS wurde durch Zugabe von 1 µg/µl DNase-freier RNase A entfernt und anschließend die organische Extraktion und die Ethanolpräzipitation wiederholt. Die DNS wurde daraufhin in 50 µl Wasser

aufgenommen, ihre Konzentration bestimmt (s. 2.2.2.4) und in einer Arbeitskonzentration von 1 µg/µl eingestellt. Bis zur weiteren Analyse in der PCR (s. 2.2.2.5) wurde die DNS bei 4 °C gelagert.

2.2.2.4 Photometrische Quantifizierung der DNS

Die Konzentration und Reinheit der genomischen DNS (s. 2.2.2.3) sowie der Plasmide (s. 2.2.2.2) wurde spektralphotometrisch mit dem NanoDrop™ bestimmt. Dabei wurde die Absorption im Spektralbereich zwischen λ=230 nm und λ=280 nm gemessen. Die DNS besitzt ihr Absorptionsmaximum bei λ=260 nm und einen Extinktionskoeffizienten von ε_{260 nm}=0,02 (µg/ml)⁻¹*cm⁻¹. Somit entspricht die DNS-Konzentration bei einer Schichtdicke von d=1 cm und einer Absorption von A_{260 nm}=1 nach dem Lambert-Beerschen Gesetz c=50 µg/ml (Arndt 2018).

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

$$A_{260 \text{ nm}} = \varepsilon_{260 \text{ nm}} * c * d$$

$$c = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{\varepsilon_{260 \text{ nm}} * d} = \frac{1}{0,02 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)^{-1} * \text{cm}^{-1} * 1 \text{ cm}} = \underline{\underline{50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}}$$

2.2.2.5 Polymerase Kettenreaktion

Zur Amplifikation der genomischen DNS aus 2.2.2.3 bzw. zur regelmäßigen Überprüfung der adhärennten Zellen auf Mykoplasmenbefall wurde eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dabei verdoppelt die DNS-Polymerase die zu untersuchende DNS in jedem Zyklus (Canene-Adams 2013). Ein Zyklus ist durch unterschiedliche Temperaturschritte gekennzeichnet. Im Folgenden wurde der *DreamTaq PCR Master Mix* entsprechend dem Pipettierschema in Tabelle 4 verwendet. Die genutzten Primer sind unter 2.1.3.6 aufgelistet. Als DNS-Matrize fungierte entweder die in 2.2.2.3 isolierte genomische DNS oder 1 ml Medium der adhärennten Zellen, welches bei 300 g für 5 min zentrifugiert und anschließend in 100 µl Wasser für 5 min bei 95 °C gekocht wurde. Bei der Mykoplasmen-PCR wurden zusätzlich eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Da die CRISPR/Cas9-basierte Doppelknockoutzelllinie HR23A/B^{KO} mit einem Plasmidgemisch (Typ A, Typ B und Typ C) hergestellt wurde, wurden alle drei Genfragmente amplifiziert. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte über eine Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.2.6).

Tabelle 4: Pipettierschema für die Polymerase Kettenreaktion

Reagenz	Volumen (genomische DNS)	Volumen (Mykoplasmen-PCR)
5'-Primer (10 µM)	1 µl	1 µl
3'-Primer (10 µM)	1 µl	1 µl
<i>DreamTaq PCR Master Mix</i>	10 µl	12,5 µl
Wasser	6 µl	6 µl
DNS	1 µl	5 µl
DMSO	1 µl	

Anschließend wurde die genomische DNS mittels folgenden Programms amplifiziert:

2 min @ 95 °C
 30 s @ 95 °C
 45 s @ 55 °C bzw. 61,4 °C
 45 s @ 72 °C
 5 min @ 72 °C
 ∞ @ 12 °C

} 35x

Die Mykoplasmen-PCR wurde wie folgt durchgeführt:

2 min @ 95°C
 30 s @ 95°C
 1 min @ 55°C
 1 min @ 72°C
 2 min @ 72°C
 ∞ @ 4°C

} 35x

2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte aus 2.2.2.5 erfolgte mittels Auftrennung in einer Agarose-Gelelektrophorese bei 100 V. Dabei wird die Probe anhand ihrer Größe durch die Agarosematrix aufgetrennt (Lee et al. 2012). Für die DNS der HR23A/B^{KO} Zellen wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet, für die PCR-Produkte der Mykoplasmen-PCR ein 1,5%iges. Dazu wurde die Agarose in 100 ml TAE-Puffer (s. 2.1.3.3) unter Wärmezufuhr gelöst und 2 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Die PCR-Produkte wurden mit 10x Ladepuffer (s. 2.1.3.3) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Marker diente die GeneRuler™ 100 bp DNS-Leiter für das 2%ige Gel bzw. der GeneRuler™ 1 kb DNS-Leiter für das 1,5%ige Gel. Wenn die Mykoplasmen-PCR kein Signal aufzeigte, wurde von keiner Verunreinigung der Zellen ausgegangen. Bei einer erfolgreichen Detektion der PCR-Produkte von HR23A/B^{KO} wurden diese sequenziert (s. 2.2.2.7).

2.2.2.7 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Sequenzen wurden 12 µl der präparierten Plasmide (100 ng/µl) aus 2.2.2.2 bzw. 12 µl der PCR-Produkte (15 ng/µl) von 2.2.2.5 durch die Firma SeqLab analysiert. Die Sequenzierung erfolgte mittels der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Für die Sequenzierung der PCR-Produkte wurden die unter 2.1.3.6 aufgelisteten Primer verwendet. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mittels Chromas.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Aufreinigung der Proteine

Für die Analyse der Proteine wurde die Zellmembran chemisch und mechanisch zerstört. Dazu wurden zunächst $1,5 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät (s. 2.2.1.4) und am nächsten Tag bzw. nach erfolgter Transfektion (s. 2.2.1.7) mit einem Zellschaber geerntet. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 360 g wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 1 ml 1x PBS (s. 2.1.2.3) aufgenommen. Die Zellen wurden bei 2.000 g erneut für 5 min zentrifugiert und das Pellet lysiert. Die Ernte der iPS Zellen wurde bereits durchgeführt und die Zellen wurden pelletiert von Dr. Pawel Lisowski zur Verfügung gestellt. Die Pellets wurden in 100 µl RIPA-Puffer (s. 2.1.4.2) resuspendiert und die Suspension für 1 h bei 4 °C rotiert. Weiterhin wurden die Zellen durch das mehrmalige Aufziehen der Lösung durch eine Kanüle (27G) Scherkräften ausgesetzt. Zur Trennung des löslichen Überstandes von den Zelltrümmern wurde der Ansatz für 10 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration der löslichen Proteine wurde bestimmt (s. 2.2.3.2) und die Proteinanalyse erfolgte in der SDS-PAGE (s. 2.2.3.3) mit anschließendem Western Blot (s. 2.2.3.4) bzw. im Filterretardationsassay (s. 2.2.3.6).

Für eine effektivere Lyse von Huntingtin wurden die unlöslichen Pellets in 10 µl 98,5%iger Ameisensäure resuspendiert und 40 min bei 37 °C und 1.000 rpm geschüttelt. Die Verdunstung der Ameisensäure erfolgte mittels Konzentrators bei 30 °C über Nacht (Programm V-AQ). Das Pellet wurde anschließend in 50 µl RIPA-Puffer resuspendiert, die Proteinkonzentration bestimmt (s. 2.2.3.2) und seine Proteine mittels Western Blot analysiert (s. 2.2.3.4).

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA-Assay. Dieser Assay wurde 1985 von Smith et al. auf der Grundlage des Lowry-Tests (Lowry et al. 1951) entwickelt. Dabei werden zweiwertige Kupferionen unter alkalischen Bedingungen bei der Bindung an Peptidbindungen zu einwertige Kupferionen reduziert. Diese bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen blau-violetten Farbkomplex, welcher bei $\lambda=562$ nm kolorimetrisch detektierbar ist (Smith et al. 1985). Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Pierce™ *BCA Protein Assay Kits*. Die Proben wurden 1:10 bzw. 1:5 verdünnt. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte über die Standardkurven in Excel.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung der über das *MACS Exosome Isolation Kit* CD63 aufgereinigten extrazellulären Vesikel wurde das *Micro BCA™ Protein Assay Kit* verwendet, da sie unter der Detektionsgrenze des *Pierce™ BCA Protein Assay Kits* lagen.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*) ist eine Methode, bei der Proteine unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach aufgetrennt werden (Laemmli 1970).

Für den Nachweis der Huntingtinproteine in den iPS Zellen wurden Gradientengele (4 bis 12 %) verwendet, für die restlichen Proteinanalysen wurden 10%ige Gele wie unter 2.1.4.2 beschrieben hergestellt. Die Zugabe von APS und TEMED erfolgte dabei erst, wenn eine Polymerisierung erwünscht war. Für eine glatte Gelgrenze wurde das Trenngel nach dem Gießen mit 1 ml Isopropanol überschichtet, welches vor der Zugabe des Sammelgels wieder dekantiert wurde.

Für die Analyse wurden 20 bis 40 µg Protein aufgetragen. Dazu wurde die Proteinkonzentration der Proben entsprechend 2.2.3.2 bestimmt. Lediglich bei den Proben der extrazellulären Vesikel wurde auf eine Konzentrationsbestimmung verzichtet, da diese unter der Detektionsgrenze liegt. Die Proben wurden vor der SDS-PAGE mit 5x Probenpuffer (s. 2.1.4.2) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Bei der Detektion von CD63 wurde dabei auf β-Mercaptoethanol im Probenpuffer verzichtet und die Proben für 10 min bei 70 °C erhitzt. Die abzentrifugierten Proben wurden neben dem Marker (*PageRuler™ Plus* für 10%iges Gel bzw. *HiMark™* für Gradientengel) auf das Gel aufgetragen und in 1x Laufpuffer (s. 2.1.4.2) bei 160 V für 80 bis 100 min aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Membran übertragen (s. 2.2.3.4).

2.2.3.4 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der Proteine aus einem SDS-Gel auf eine Membran durch das Anlegen eines elektrischen Feldes übertragen werden. Die mit SDS gebundenen negativ geladenen Proteine wandern dabei zur Anode. Beim Aufbau des Western Blots muss demnach darauf geachtet werden, dass die Membran auf der zur Anode gewandten Seite liegt und keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran auftreten. Dabei können unterschiedliche Membranen (Nitrozellulosemembran, PVDF-Membran) und Systeme verwendet werden. Es wird unterschieden in Dry-, Semi-Dry- und Tank-Blot (Kurien und Scofield 2015; Goldman et al. 2015).

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (s. 2.2.3.3) wurden mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran (bzw. PVDF-Membran für den Nachweis von CD63) transferiert. Das Blotting erfolgte im Tank-Blot bei 300 mA für 90 min unter Kühlung in Blotpuffer (s. 2.1.4.2). Als Ladekontrolle wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung (s. 2.1.4.2) gefärbt, welches reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet (Ni et al. 2017). Die Färbung wurde mit dem Blot-

Dokumentationsgerät ChemiDoc™ *MP Imaging System* dokumentiert und die Membran mit Wasser entfärbt. Bei der Analyse der extrazellulären Vesikel wurde auf diesen Schritt verzichtet, da die Färbung für die geringen Konzentrationen nicht sensitiv genug war. Anschließend wurden die unspezifische Bindestellen auf der Membran mit 5 % Milchpulver in TBS (s. 2.1.4.2) für 1 h blockiert. Die verwendeten Primärantikörper wurden entsprechend der Tabelle 3 (s. 2.1.4.4) in Blockierlösung verdünnt und die Membran über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert. Die Membran wurde zweimal für 10 min mit TBS-T (s. 2.1.4.2) und einmal für 10 min mit TBS unter Schwenken gewaschen bevor die Membran für 2 h mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Tabelle 3, s. 2.1.4.4) bei Raumtemperatur geschwenkt wurde. Abschließend wurde die Membran erneut zweimal für 10 min mit TBS-T und einmal für 10 min mit TBS gewaschen. Die Detektion der Antikörper erfolgte mittels ECL-Kit. Dabei katalysiert die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) die Oxidation der beiden Komponenten Luminol und Wasserstoffperoxid. Die dadurch entstehende Lumineszenz kann mit Hilfe des Blot-Dokumentationsgerätes ChemiDoc™ *MP Imaging System* detektiert werden (Ni et al. 2017). Die Ponceau S-Färbung wurde unter Autoexposition als einzelnes Bild aufgenommen. Die mit Antikörper behandelten Western Blots wurden als Multiple Bilder unter Autoexposition aufgenommen. Es besteht die Möglichkeit bestimmte Intensitäten mit Hilfe der Vorschau zu fokussieren.

Wenn die Membran mehrfach verwendet werden sollte, wurden die Antikörper mittels Strippingpuffer (s. 2.1.4.2) entfernt und wie oben beschrieben erneut blockiert und mit Primär- und Sekundärantikörper behandelt. Dazu wurde der Puffer auf 55 °C erhitzt und das entsprechende Volumen β -Mercaptoethanol hinzugeben. Die Membran wurde 45 min unter Schwenken mit dem Puffer inkubiert und anschließend zweimal für 5 min mit TBS gewaschen, bevor sie wiederverwendet werden konnte.

2.2.3.5 Dot Blot

Für den semiquantitativen Vergleich des CD63- und des Huntingtingehalts wurde ein Dot Blot durchgeführt. Dabei werden Proteine unter Vakuum auf eine Membran transferiert und anschließend mit Antikörpern behandelt. Damit ähnelt die Methode dem Western Blot, sie erfolgt jedoch ohne vorherige Elektrophorese (Jansohn und Rothhämel 2012).

Die verwendete Nitrozellulosemembran wurde unter Schwenken für 10 min in 1x PBS (s. 2.1.2.3) rehydriert und die Apparatur von BioRad wurde entsprechend den Herstellerangaben zusammengebaut. Nach einmaligem Waschen der Wells mit 200 μ l 1x PBS wurden verschiedene Volumina des Zellkulturüberstandes der transfizierten Zellen (s. 2.2.1.7) auf die Membran aufgetragen. Anhand der Ergebnisse wurden letztlich 500 μ l des Überstandes der U2OS, HR23A^{KO} und HR23B^{KO} Zellen verwendet und 100 μ l des Überstandes der Tre und HR23B[↑] Zellen. Im Anschluss wurden die

Wells zweimal mit 200 µl 1x PBS gewaschen und die Membran getrocknet. Zur Analyse der aufgetragenen Proben wurde die Membran analog zum Western Blot blockiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Die Detektion erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Blot-Dokumentationsgerätes ChemiDoc™ *MP Imaging System* unter Zugabe von ECL-Lösung. Die Signalintensität wurde mit der Software Image Lab™ bestimmt und das CD63-Signal bzw. der Quotient aus GFP zu CD63 wurde jeweils auf die GFP-Probe normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben mit Origin.

2.2.3.6 Filterretardationsassay

Der Filterretardationsassay wurde analog zum Dot Blot (s. 2.2.3.5) durchgeführt. Zur Bestimmung des Verhältnisses von Huntingtinaggregaten zu dem gesamten Proteingehalt von Huntingtin wurden jeweils 20 µg der Proben zusätzlich zu der Nitrozellulosemembran auf eine Zelluloseacetatmembran aufgetragen. Diese ist eine Filtermembran, welche nur aggregierte Proteine auffängt (Sin et al. 2018). Beide Membranen wurden wie bereits unter 2.2.3.4 beschrieben mit Blockierlösung und Antikörpern behandelt. Die Signale wurden mit dem Blot-Dokumentationsgerätes ChemiDoc™ *MP Imaging System* bei jeweils gleicher Exposition detektiert. Anschließend konnte der Quotient aus Huntingtinaggregaten zu dem gesamten Proteingehalt von Huntingtin mittels Excel berechnet werden und mittels Origin statistisch ausgewertet werden (s. 2.2.4).

2.2.3.7 Aufreinigung der Huntingtinaggregate mittels Ultrazentrifugation

Für die Isolierung der Huntingtinaggregate (Díaz-Hernández et al. 2004) wurden $1,5 \cdot 10^6$ Zellen entsprechen 2.2.1.4 ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen transfiziert (s. 2.2.1.7) und bei 360 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 6 ml Puffer 1 (s. 2.1.4.2) homogenisiert und die resultierenden Zelltrümmer durch eine Zentrifugation für 20 min bei 27.000 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde auf 1 % (w/v) N-lauroylsarcosin und 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol eingestellt und für 2 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 100.000 g wurde das Pellet in 2 ml Puffer 3 (s. 2.1.4.2) homogenisiert und auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (s. 2.1.4.2, 4 ml 50%ige Saccharose und 4 ml 20%ige Saccharose) aufgetragen. Nach einer Zentrifugation für 2 h bei 150.000 g konnten die Huntingtinfilamente aus der Interphase entnommen werden und bei -80 °C gelagert werden. Die Analyse der Aggregate erfolgte analog zu 2.2.3.4 im Western Blot.

2.2.4 Datenanalyse

Die statistische Auswertung und das Erstellen der Graphen erfolgte mit Hilfe des Programmes Origin. Neben dem Student's t-Test für zwei unabhängige Stichproben wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test genutzt. Die p-Werte wurden in den Graphen angegeben, ein p-Wert von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Expression von Huntingtin und HR23B

3.1.1 Sequenzierung der verwendeten Plasmide

Zur Überprüfung der für die Transfektion verwendeten Plasmide Htt20Q, Htt97Q, Htt23Q-HA, Htt74Q-HA, Htt23Q, Htt74Q und Htt97Q-GFP wurden diese sequenziert (Abbildung S1). Dabei konnten die Fusionsproteine HA bzw. GFP, ein Teil des Exon 1 von Huntingtin und die entsprechende Anzahl der Glutaminreste erfolgreich nachgewiesen werden. Anhand der Sequenzierungsergebnisse konnten folgende Molekülmassen bestimmt werden:

Tabelle 5: Theoretisch berechnete Molekülmassen der exprimierten Huntingtinproteine (Exon 1)

Die Proteine Htt20Q, Htt97Q, Htt23Q-HA und Htt74Q-HA sind mit einem HA-Fusionsprotein gekoppelt, die Proteine Htt23Q, Htt74Q und Htt97Q-GFP mit einem GFP-Fusionsprotein.

Protein (HA-gekoppelt)	Molekülmasse	Protein (GFP-gekoppelt)	Molekülmasse
Htt20Q	11,27 kDa	Htt23Q	34,71 kDa
Htt97Q	21,16 kDa	Htt74Q	41,26 kDa
Htt23Q-HA	9,00 kDa	Htt97Q-GFP	46,75 kDa
Htt74Q-HA	15,55 kDa		

Die unterschiedlichen Molekülmassen bei ähnlicher Anzahl der Glutaminreste entstehen durch die unterschiedlichen Fusionsproteine HA und GFP. Da im Folgenden vor allem die HA-gekoppelten Proteine Htt20Q und Htt97Q sowie die GFP-gekoppelten Proteine Htt23Q und Htt74Q verwendet wurden, wurde zur besseren Übersichtlichkeit der Abbildungen auf die Kennzeichnung des Fusionsproteins verzichtet. Die Plasmide Htt23Q-HA, Htt74Q-HA und Htt97Q-GFP wurden lediglich zur Etablierung hinzugezogen und wurden dementsprechend extra hervorgehoben.

3.1.2 Nachweis von überexprimiertem Huntingtin und den Proteasomshuttlingfaktoren HR23A und HR23B

Die Überexpression des Exon 1 von Huntingtin in U2OS Zellen wurde unter verschiedenen Bedingungen optimiert. Es wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien (GeneJuice® und Polyethylenimin), verschiedene Inkubationszeiten nach der Transfektion (48 und 72 h) und zwei Antikörper gegen das Fusionsprotein HA (Cell Signaling Technology® #2367 und Merck #H6908) getestet. Des Weiteren erfolgte ein Ansatz unter sechsständigem Serumentzug im Anschluss an die Transfektion (Abbildung S2). Die besten Ergebnisse wurden dabei mit dem Transfektionsreagenz GeneJuice®, einer Inkubationszeit von 48 h und ohne Serumentzug erzielt. Die Detektion des HA-

gekoppelten Exon 1 von Huntingtin erfolgte mit dem Antikörper anti-HA von Cell Signaling Technology®. Abbildung 4A zeigt die Überexpression von Htt20Q und Htt97Q in U2OS Zellen unter den optimierten Bedingungen.

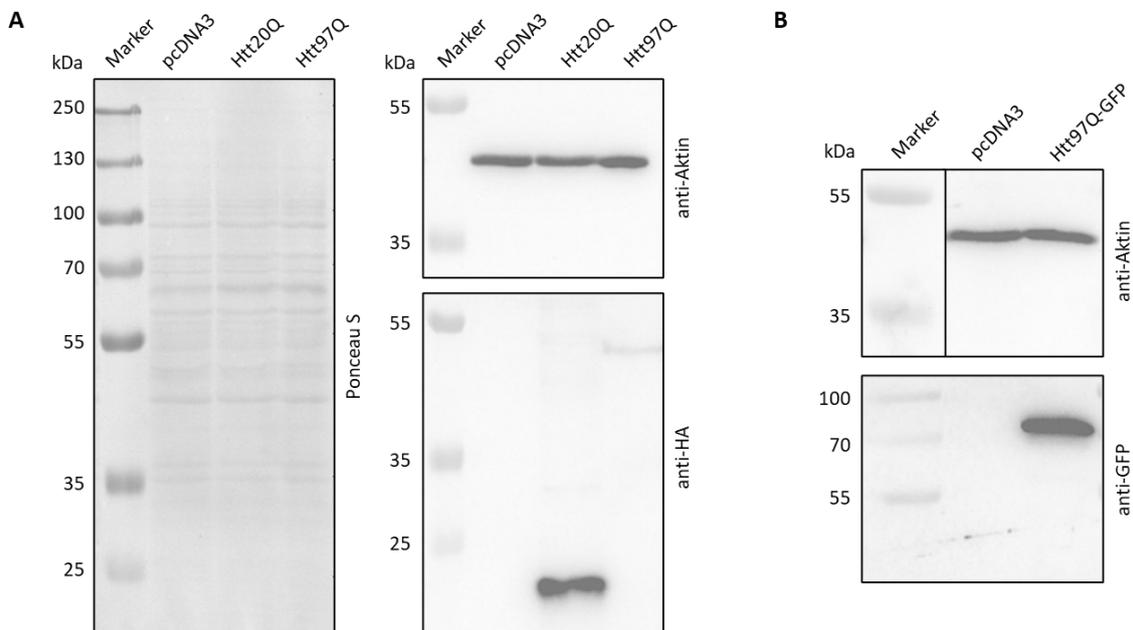


Abbildung 4: Nachweis der Expression von Exon 1 von Huntingtin in U2OS Zellen

U2OS Zellen wurden mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q (**A**) bzw. pcDNA3 und Htt97Q-GFP (**B**) transfiziert und lysiert. Die aufgereinigten Proteine wurden in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert. Exon 1 von Huntingtin wurde über das jeweilige Fusionsprotein mit Hilfe der Antikörper anti-HA (Cell Signaling Technology®) (**A**) bzw. anti-GFP (**B**) nachgewiesen. Die Banden für Htt97Q und Htt97Q-GFP lagen dabei circa 25 kDa höher als erwartet. Die Ladekontrolle erfolgte mittels Ponceau S-Färbung bzw. durch die Inkubation mit anti-Aktin. Als Marker diente der PageRuler™ Plus Proteinstandard.

Für eine gleichmäßige Beladung der SDS-Gele wurde die Proteinkonzentration der lysierten Zellen mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit bestimmt und die Proben so verdünnt, dass der gleiche Proteingehalt aufgetragen wurde (Daten nicht gezeigt). Die Ponceau S-Färbung und die Detektion der Ladekontrolle Aktin bestätigten dies. Der Nachweis des HA-gekoppelten Exon 1 von Huntingtin erfolgte mittels anti-HA (Cell Signaling Technology®). Dabei war die Htt20Q-Bande gut detektierbar, Htt97Q war jedoch im Vergleich viel schwächer exprimiert. Außerdem war die Bande mit circa 53 kDa in etwa 32 kDa höher als unter Tabelle 5 berechnet. Da dieses Ergebnis unter anderen Bedingungen in der Optimierung ebenfalls auftrat (Abbildung S2), wurde das Plasmid Htt97Q-GFP für die Transfektion verwendet und im Western Blot mit anti-GFP detektiert (Abbildung 4B). Auch hier war eine Verschiebung der Bande um circa 32 kDa beobachtbar.

Für eine vollständige Lyse des pathologisch verlängerten Huntingtins (Exon 1) wurde die unlösliche Fraktion mit Ameisensäure behandelt und erneut im Western Blot analysiert (Abbildung 5).

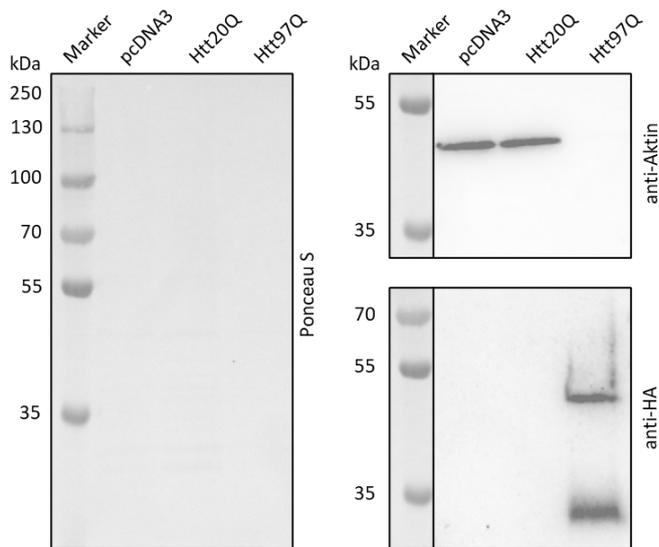


Abbildung 5: Nachweis der Expression von Exon 1 von Huntingtin in der unlöslichen Fraktion

U2OS Zellen wurden mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfiziert und lysiert. Die unlösliche Fraktion wurde mit Ameisensäure behandelt und in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert. Exon 1 von Huntingtin wurde über sein Fusionsprotein mit Hilfe des Antikörpers anti-HA (Cell Signaling Technology®) nachgewiesen. Es traten bei Htt97Q zwei Banden auf. Die untere entsprach der erwarteten Bande, die obere lag analog zu Abbildung 4 circa 32 kDa höher als erwartet. Die Ladekontrolle erfolgte mittels Ponceau S-Färbung bzw. durch die Inkubation mit anti-Aktin. Als Marker diente der PageRuler™ Plus Proteinstandard.

In der Ponceau S-Färbung waren die Proteine kaum detektierbar, bei der Kontrolle mit anti-Aktin konnte in der Htt97Q-Probe kein Aktin nachgewiesen werden. Dafür waren zwei Banden mit anti-HA sichtbar, die bereits in der löslichen Fraktion detektierte Bande bei circa 53 kDa und eine weitere Bande bei circa 33 kDa. Beim Vergleich der unteren Bande von Htt97Q in der unlöslichen Fraktion mit der Htt20Q-Bande in der löslichen Fraktion war eine Differenz von circa 10 kDa ersichtlich. Dies entspricht der theoretisch berechneten Differenz aus Tabelle 5.

Die Verschiebung der Bande des pathologisch verlängerten Huntingtins (Exon 1) im Vergleich zu dem nicht-pathologischen Huntingtin (Exon 1) wurde bei der Verwendung von Htt23Q und Htt74Q nicht festgestellt (Abbildung 6). Dies zeigte sowohl die Behandlung mit anti-GFP als auch die Detektion mittels anti-Htt. Der optimale Huntingtinantikörper (Abcam® #ab109115) wurde zuvor mit Unterstützung des Forschungsgruppenpraktikanten Alexander Braig aus folgenden Antikörpern identifiziert: Abcam® #ab109115; Merck #MAB5374; Enzo Life Science #PW0595A; Cell Signaling Technology® #2773 (Daten nicht gezeigt).

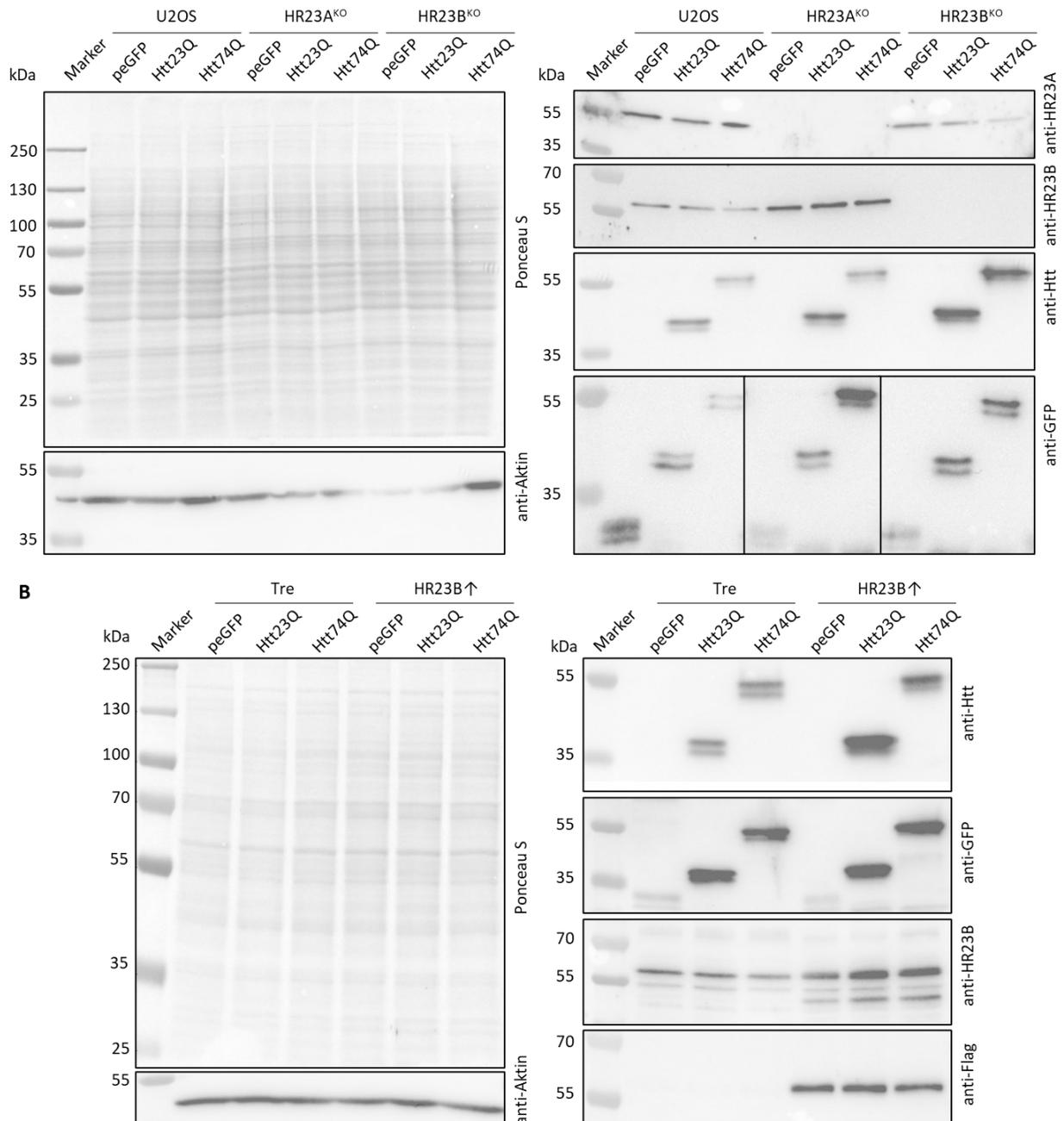


Abbildung 6: Nachweis der Expression von Exon 1 von Huntingtin sowie der Proteasomshuttlingfaktoren HR23A und HR23B in weiteren Zelllinien

Die *Tet-on* System enthaltenden Zellen Tre und HR23B[↑] wurden mit Doxycyclin behandelt (**B**). Anschließend wurden alle Zellen mit peGFP, Htt23Q und Htt74Q transfiziert und lysiert. Die aufgereinigten Proteine wurden in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert. Exon 1 von Huntingtin wurde sowohl über sein Fusionsprotein GFP mit Hilfe des Antikörpers anti-GFP als auch mit anti-Htt auf der erwarteten Höhe nachgewiesen. Der Nachweis des HR23A^{KO} bzw. HR23B^{KO} erfolgte mittels anti-HR23A bzw. anti-HR23B (**A**). Die Überexpression von HR23B konnte über die Antikörper anti-Flag und anti-HR23B (**B**) bestätigt werden. Die Ladekontrolle erfolgte mittels Ponceau S-Färbung bzw. durch die Inkubation mit anti-Aktin. Als Marker diente der PageRuler™ Plus Proteinstandard.

Neben den U2OS Zellen konnten die HR23A^{KO}, HR23B^{KO}, Tre und HR23B[↑] Zellen mit den Plasmiden erfolgreich transfiziert werden. Des Weiteren wurde der Knockout von HR23A und HR23B mittels anti-

HR23A und anti-HR23B sowie die Überexpression von HR23B in HR23B \uparrow Zellen unter Verwendung von anti-Flag und anti-HR23B verifiziert. Bei der Verwendung von anti-HR23B war auch die Detektion von HR23B in den U2OS, HR23A^{KO} und Tre Zellen möglich.

3.1.3 Nachweis von geneditiertem endogenem Huntingtin in iPS Zellen

Nachdem die Detektion des Exon 1 von Huntingtin im Western Blot etabliert wurde (s. 3.1.2), wurden die Lysate der geneditierten iPS Zellen im Gradientengel (4 bis 12 %) aufgetrennt und im Western Blot untersucht (Abbildung 7). Die Zellen des 50-jährigen Spenders enthielten 17 Glutaminreste auf dem Huntingtin-codierenden Gen (*HTT17Q/HTT17Q*) und die Arbeitsgruppe von Dr. Pawel Lisowski editierte die Gene zu *HTT0Q/HTT0Q*, *HTT17Q/HTT70Q* und *HTT70Q/HTT70Q*.

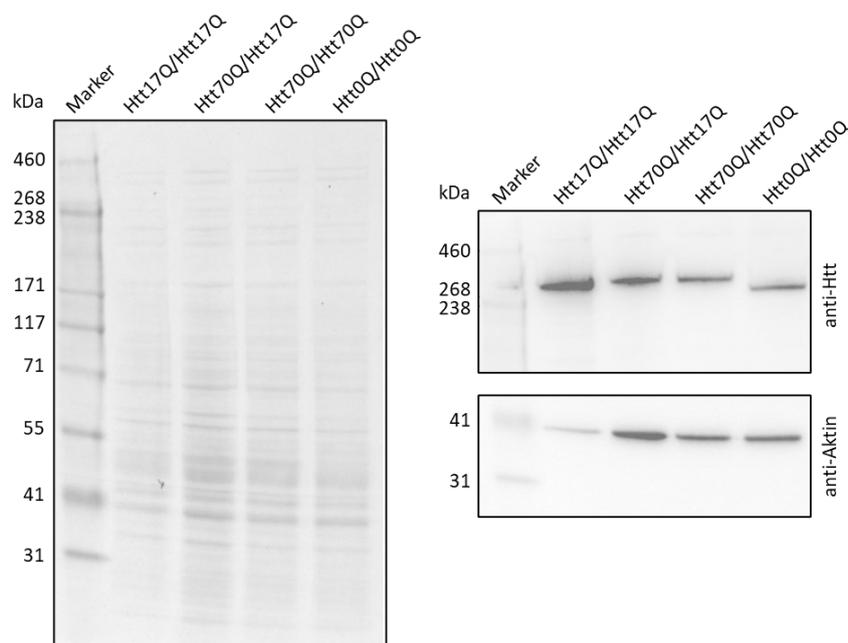


Abbildung 7: Nachweis des geneditierten Huntingtins aus iPS Zellen

Die zu untersuchenden iPS Zellen wurden lysiert, in einem Gradientengel (4 bis 12 %) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot analysiert. Der Nachweis von Huntingtin erfolgte mit Hilfe von anti-Htt. Dieser zeigte abhängig von der Anzahl der Glutaminreste unterschiedlich hohe Banden. Die Ladekontrolle erfolgte mittels Ponceau S-Färbung bzw. durch die Inkubation mit anti-Aktin. Als Marker diente der HiMark™ Proteinstandard.

Die Ponceau S-Färbung und die Kontrolle mit anti-Aktin zeigten einen geringeren Gesamtproteingehalt in der Kontrolle (*Htt17Q/Htt17Q*), der Huntingtingehalt war jedoch höher als in den geneditierten Proben. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass *Htt0Q/Htt0Q* eine geringere Proteinmasse und *Htt70Q/Htt70Q* eine höhere Proteinmasse als die Kontrolle *Htt17Q/Htt17Q* aufwies. Die Bande der heterozygoten Probe *Htt17Q/Htt70Q* verlief auf der gleichen Höhe wie die Bande von *Htt70Q/Htt70Q*.

3.1.4 Vergleich der Aggregation von Huntingtin in neuronalen Vorläuferzellen und Organoiden

Neben den neuronalen Vorläuferzellen (NPC) wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Pawel Lisowski Organoide mit *HTT17Q/HTT17Q* und *HTT70Q/HTT70Q* entwickelt. Organoide sind in der Zellkultur organähnliche Strukturen und stellen somit ein Modell für die differenzierten Gehirnstrukturen dar. Ihre Aggregation wurde unter der Verwendung eines Filterretardationsassays untersucht. Dazu wurden sowohl die Huntingtinaggregate als auch der Gesamthuntingtingehalt detektiert (Abbildung 8) und anschließend der Quotient ihrer Signale analysiert (Abbildung 9).

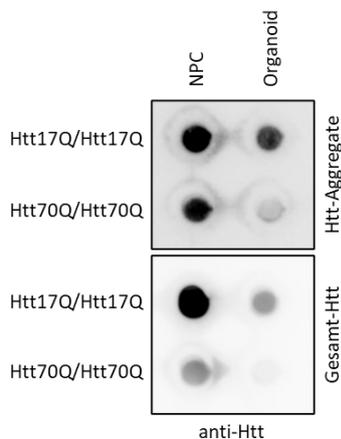


Abbildung 8: Detektion der Huntingtinaggregate und des Gesamthuntingtingehalts in neuronalen Vorläuferzellen und Organoiden mit Htt17Q/Htt17Q bzw. Htt70Q/Htt70Q

Die zu untersuchenden neuronalen Vorläuferzellen (NPC) und die Organoide mit Htt17Q/Htt17Q bzw. Htt70Q/Htt70Q wurden lysiert und im Filterretardationsassay analysiert. Für die Detektion der Huntingtinaggregate wurde eine Zelluloseacetatmembran (Filter 0,22 µm) verwendet, durch die nicht-aggregierte Proteine diffundieren können. Der Nachweis des Gesamthuntingtingehalts erfolgte mittels Nitrozellulosemembran. Durch die Inkubation mit anti-Htt konnten die Huntingtinaggregate und der Gesamthuntingtingehalt auf den Membranen sichtbar gemacht werden.

Zunächst konnte beobachtet werden, dass Htt70Q/Htt70Q sowohl in den neuronalen Vorläuferzellen (Abbildung 9A, $p=0,024$) als auch in den Organoiden (Abbildung 9B, $p=0,239$) eine höhere Aggregation als Htt17Q/Htt17Q aufwies. Weiterhin zeigten die Organoide sowohl mit Htt17Q/Htt17Q (Abbildung 9C, $p\leq 0,04$) als auch mit Htt70Q/Htt70Q (Abbildung 9D, $p\leq 0,200$) eine höhere Aggregation im Vergleich zu den jeweiligen neuronalen Vorläuferzellen.

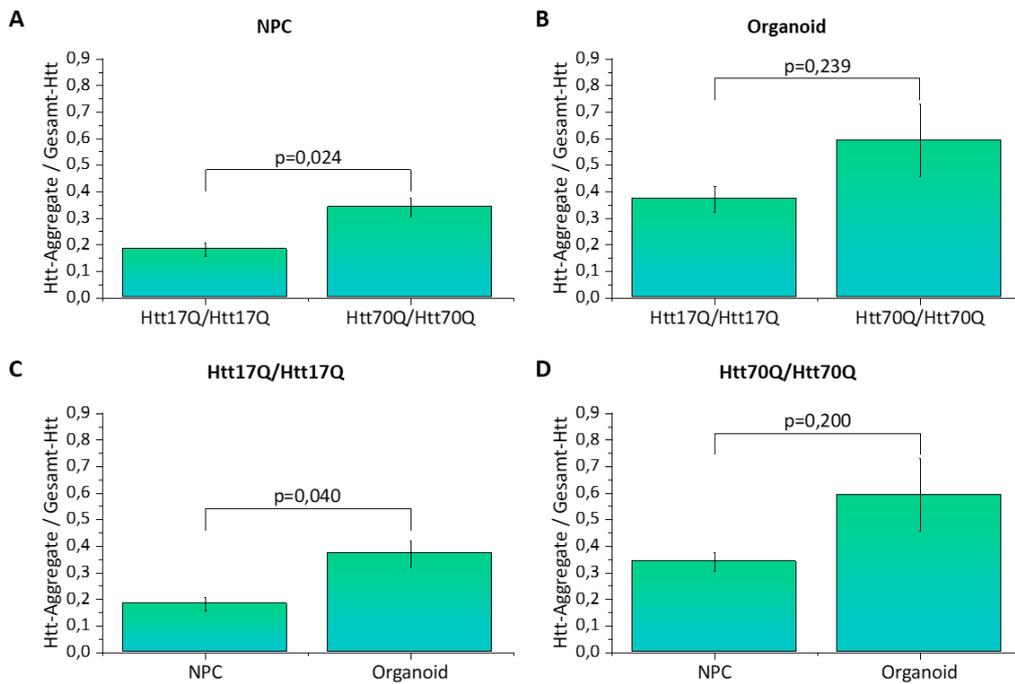


Abbildung 9: Quantifizierung des Verhältnisses von Huntingtinaggregaten zu dem Gesamthuntingtingehalt in neuronalen Vorläuferzellen und Organoiden mit Htt17Q/Htt17Q bzw. Htt70Q/Htt70Q

Die in Abbildung 8 detektierten Signale wurden analysiert und der Quotient der Huntingtinaggregate zu dem Gesamthuntingtingehalt bestimmt. Die dabei berechneten Mittelwerte und ihre Standardfehler wurden hier dargestellt (n=3). Die p-Werte wurden mit Hilfe eines unabhängigen Zwei-Stichproben-t-Test ermittelt. Zunächst wurden Htt17Q/Htt17Q und Htt70Q/Htt70Q in den neuronalen Vorläuferzellen (NPC, **A**) bzw. Organoiden (**B**) miteinander verglichen, anschließend erfolgte der Vergleich der neuronalen Vorläuferzellen und Organoiden unter der Expression von Htt17Q/Htt17Q (**C**) bzw. Htt70Q/Htt70Q (**D**). Dabei wurde eine Erhöhung der Aggregation mit Htt70Q/Htt70Q im Vergleich zu Htt17Q/Htt17Q beobachtet, sowie ein Anstieg der Aggregation in den Organoiden im Vergleich zu den neuronalen Vorläuferzellen.

3.1.5 Verteilung von Huntingtin in U2OS Zellen

Neben dem Western Blot (s. 3.1.2) wurde die Überexpression des Exon 1 von Huntingtin mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden die U2OS Zellen mit den HA-gekoppelten Plasmiden transfiziert und das überexprimierte Exon 1 von Huntingtin mittels anti-HA (Merck KGaA) detektiert. Zur Optimierung der Transfektion wurden analog zu 3.1.2 verschiedene Bedingungen getestet (Abbildung S3, S4 und S5). Dabei trug eine Inkubationszeit von 48 h mit dem Transfektionsreagenz GeneJuice® ohne Serumentzug zu einer optimalen Expression von Exon 1 von Huntingtin bei (Abbildung 10 und 11).

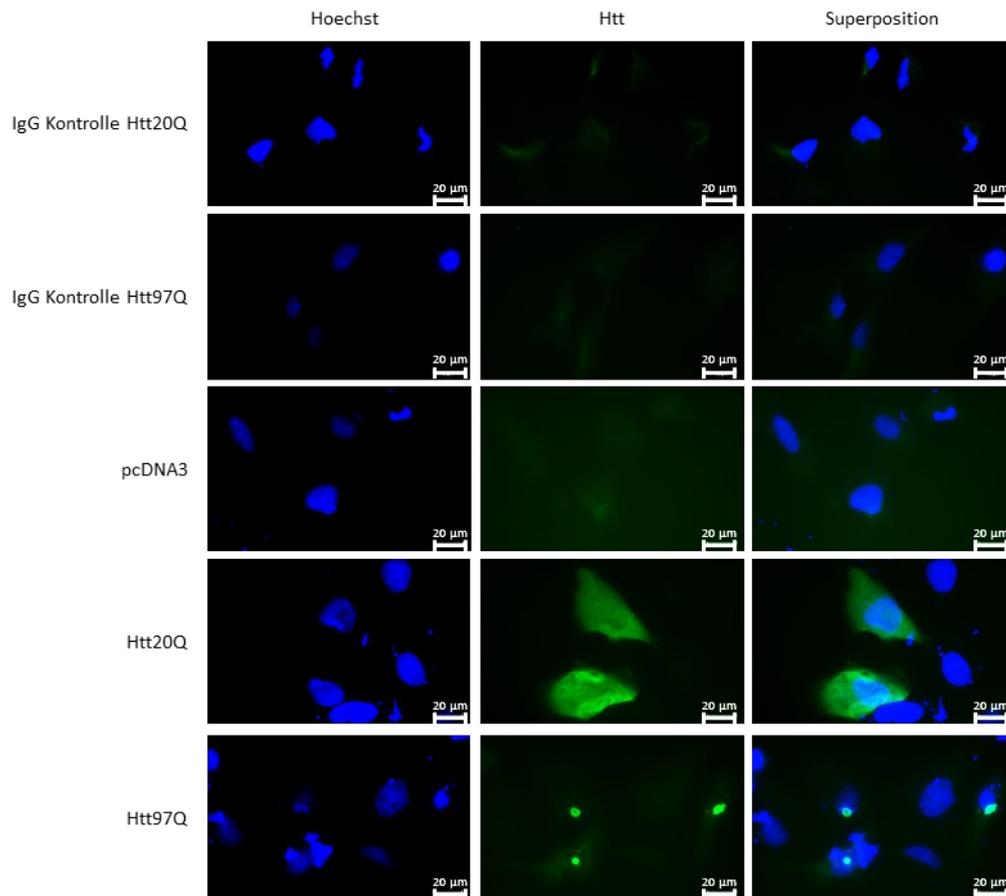


Abbildung 10: Verbreitung des exprimierten Exon 1 von Huntingtin in mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfizierten U2OS Zellen

U2OS Zellen wurden mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfiziert und mittels Immunfluoreszenz (Öl-immersionsobjektiv 63x) visualisiert. Die Nuklei wurden mit Hoechst angefärbt (blau), das in den Zellen exprimierte Exon 1 von Huntingtin wurde mit Hilfe von anti-HA (Merck KGaA) sichtbar gemacht (grün). Die Selektivität des Antikörpers wurde mittels IgG Kontrollen nachgewiesen. Htt20Q war gleichmäßig im Zytoplasma und Nukleus der Zellen exprimiert, während Htt97Q perinukleäre Ringstrukturen formte.

Die IgG Kontrollen sowie die Transfektion mit pcDNA3 bestätigten eine spezifische Färbung von Exon 1 von Huntingtin, da kein grün fluoreszierendes Signal detektierbar war. Es konnte beobachtet werden, dass Htt20Q und Htt23Q gleichmäßig in den Zellen im Zytoplasma und Nukleus exprimiert waren. Die pathologisch verlängerten Huntingtinproteine Htt74Q und Htt97Q wiesen hingegen Ringstrukturen auf, welche häufig perinukleär lokalisiert vorlagen.

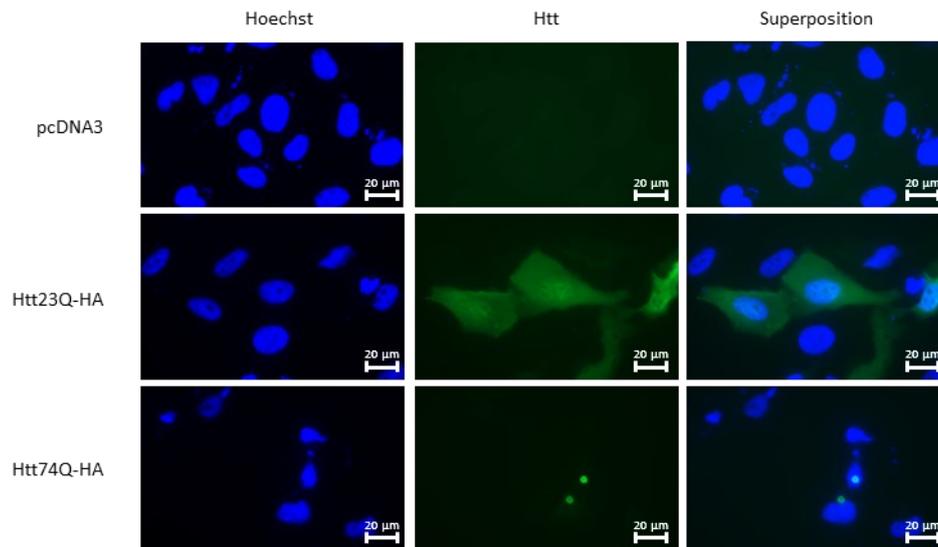


Abbildung 11: Verbreitung des exprimierten Exon 1 von Huntingtin in mit pcDNA3, Htt23Q-HA und Htt74Q-HA transfizierten U2OS Zellen

U2OS Zellen wurden mit pcDNA3, Htt23Q-HA und Htt74Q-HA transfiziert und mittels Immunfluoreszenz (Ölimmersionsobjektiv 63x) visualisiert. Die Nuklei wurden mit Hoechst angefärbt (blau), das in den Zellen exprimierte Exon 1 von Huntingtin wurde mit Hilfe von anti-HA sichtbar gemacht (grün). Htt23Q-HA war gleichmäßig im Zytoplasma und Nukleus der Zellen exprimiert, während Htt74Q-HA perinukleäre Ringstrukturen formte.

3.1.6 Nachweis der Aggregation von Huntingtin

Um zu überprüfen, ob die beobachteten perinukleären Ringstrukturen des pathologischen Exon 1 von Huntingtin Aggregate sind, wurde das Proteostat® *Protein Aggregation Kit* verwendet (Abbildung 12). Der darin enthaltene Farbstoff färbt Aggregate unabhängig von ihrer Proteinsequenz an, indem er in β -Strukturen interkaliert.

Sowohl die mit pcDNA3 transfizierten Zellen als auch die Htt20Q-exprimierenden Zellen zeigten mit Proteostat® keine Färbung. Die Expression von Htt20Q konnte analog zu 3.1.5 gleichmäßig im Zytoplasma und Nukleus der Zellen detektiert werden, während die perinukleären Ringstrukturen von Htt97Q als Aggregate mit Proteostat® nachgewiesen werden konnten.

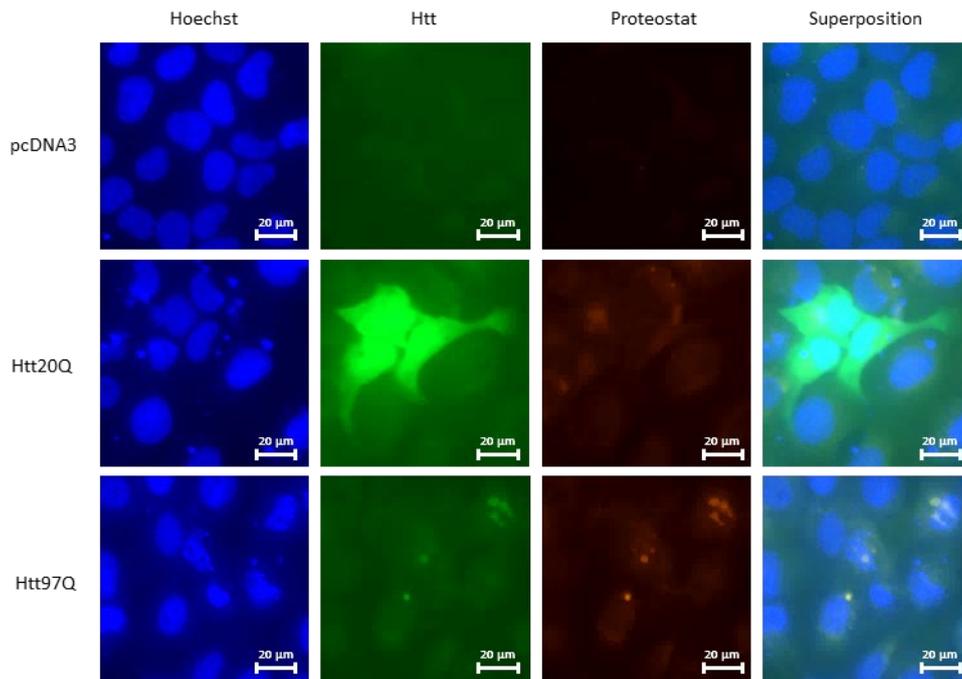


Abbildung 12: Nachweis der Htt97Q-Strukturen als Aggregate mittels Proteostat® Protein Aggregation Kit in U2OS Zellen

U2OS Zellen wurden mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfiziert und mittels Immunfluoreszenz (Ölimmersionsobjektiv 63x) visualisiert. Die Nuklei wurden mit Hoechst angefärbt (blau), das in den Zellen exprimierte Exon 1 von Huntingtin wurde mit Hilfe von anti-HA (Merck KGaA) sichtbar gemacht (grün), die Färbung der Aggregate erfolgte mittels Proteostat® Protein Aggregation Kit (orange). Htt20Q war weiterhin gleichmäßig im Zytoplasma und Nukleus der Zellen exprimiert und zeigte keine Aggregate, während die perinukleären Ringstrukturen von Htt97Q mit Proteostat® als Aggregate identifiziert werden konnten.

3.2 Einfluss von HR23B auf Huntingtinaggregate

3.2.1 Verteilung von Huntingtin in HR23B-überexprimierenden Zellen

Für die Detektion von Exon 1 von Huntingtin unter HR23B-Überexpression wurden die *Tet-on* System enthaltenden Zellen Tre und HR23B \uparrow verwendet und analog zu den U2OS Zellen (s. 3.1.5) mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfiziert. Die Überexpression von HR23B wurde mittels Doxycyclin induziert und ihr Erfolg sollte mit Hilfe von anti-Flag oder anti-HR23B nachgewiesen werden. Da die Detektion von HR23B mit dem verwendeten Primärantikörper anti-Flag in der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht erfolgreich war (Daten nicht gezeigt), wurde anti-HR23B verwendet. Sowohl anti-HR23B als auch der unter 3.1.5 verwendete Antikörper anti-HA (Merck KGaA) wurden im Kaninchen erzeugt. Um eine spezifische Färbung zu ermöglichen, wurde im Folgenden anti-HA von Cell Signaling Technologies®, welcher aus der Maus stammt, genutzt.

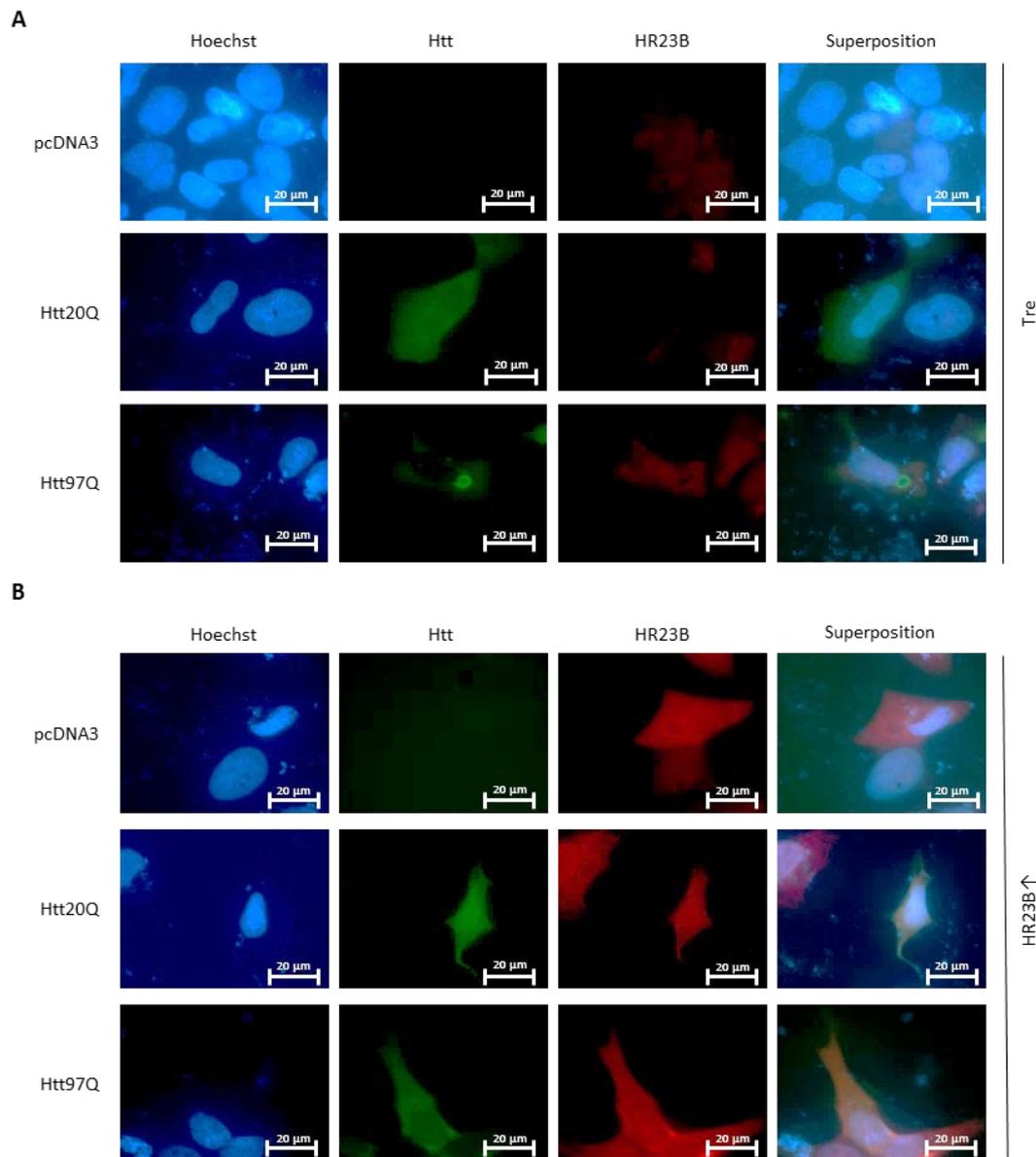


Abbildung 13: Verbreitung des exprimierten Exon 1 von Huntingtin unter HR23B Überexpression

Tre und HR23B[↑] Zellen wurden mit Doxycyclin behandelt, mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfiziert und mittels Immunfluoreszenz (Öl-immersionsobjektiv 63x) visualisiert. Die Nuklei wurden mit Hoechst angefärbt (blau), das in den Zellen exprimierte Exon 1 von Huntingtin wurde mit Hilfe von anti-HA (Cell Signaling Technologies®) sichtbar gemacht (grün), der Nachweis der HR23B Expression erfolgte mit anti-HR23B. Htt20Q war sowohl in Tre als auch in HR23B[↑] Zellen gleichmäßig im Zytoplasma und Nucleus der Zellen exprimiert. Htt97Q trat in den Tre Zellen als perinukleäre Aggregate auf (**A**), während es in HR23B-überexprimierenden Zellen analog zu Htt20Q gleichmäßig im Zytoplasma und Nucleus der Zellen verteilt war (**B**).

In den Tre Zellen wurde Htt20Q gleichmäßig im Zytoplasma und Nucleus der Zellen exprimiert, während Htt97Q als perinukleäre Aggregate auftrat (Abbildung 13). Weiterhin konnte ein schwaches Signal von HR23B in der ganzen Zelle beobachtet werden, wobei innerhalb der Huntingtinaggregate kein HR23B detektierbar war. Die HR23B[↑] Zellen zeigten ein stärkeres HR23B-Signal, welches für eine erfolgreiche Überexpression von HR23B spricht. Htt20Q war wie in den Tre Zellen gleichmäßig im

Zytoplasma und Nukleus der Zellen exprimiert, jedoch lag Htt97Q nicht aggregiert vor, sondern war analog zu Htt20Q ebenfalls in der ganzen Zelle verbreitet.

3.2.2 Einfluss von HR23B auf das Verhältnis von Huntingtinaggregaten pro Zelle

Die unter 3.2.1 gemachten Beobachtungen wurden mit Hilfe des *High-Content-Analysesystem* Operetta® CLS™ quantifiziert. Dazu wurde die Anzahl der Huntingtinaggregate (Htt97Q) und der Zellen bestimmt und anschließend das Aggregat-Zell-Verhältnis berechnet (Abbildung 14).

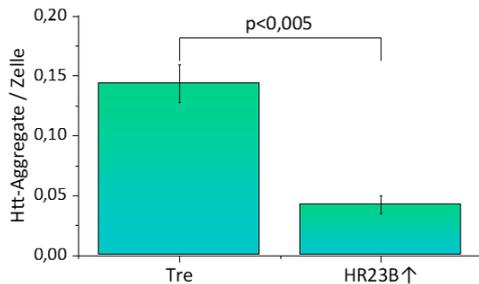


Abbildung 14: Quantifizierung der Huntingtinaggregate pro Zelle in Tre und HR23B↑ Zellen

Die Anzahl der Htt97Q-Aggregate in Tre und HR23B↑ Zellen sowie die Anzahl der Tre und HR23B↑ Zellen wurden mit dem *High-Content-Analysesystem* Operetta® bestimmt und ihr Quotient berechnet. Es wurden die Mittelwerte und ihr Standardfehler dargestellt (n=10). Dabei war eine Reduktion des Aggregat-Zell-Verhältnisses in den HR23B↑ Zellen beobachtbar. Die statistische Auswertung erfolgte über einen unabhängigen Zwei-Stichproben-t-Test.

Dabei konnte im Vergleich zu der Kontrollzelllinie Tre eine statistisch signifikante Reduktion des Aggregat-Zell-Verhältnisses in HR23B↑ beobachtet werden ($p \leq 0,005$).

3.2.3 Einfluss von HR23B auf das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis

Unter der Verwendung des *High-Content-Analysesystem* Operetta® CLS™ konnte ebenfalls das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis bestimmt werden. Dazu wurden die Flächen der Kompartimente analysiert und ihr Quotient berechnet (Abbildung 15).

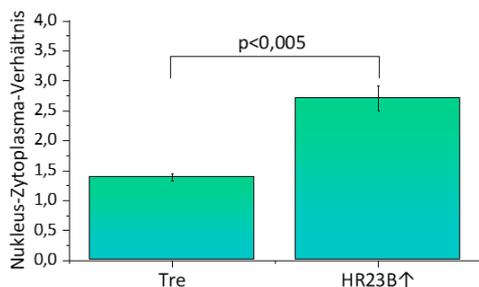


Abbildung 15: Quantifizierung des Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis von Tre und HR23B↑ Zellen

Die Flächen der Nuklei und des Zytoplasmas von Tre und HR23B↑ Zellen wurden mit dem *High-Content-Analysesystem* Operetta® bestimmt und ihr Quotient berechnet. Es wurden die Mittelwerte und ihr Standardfehler dargestellt (n>3200). Dabei war ein Anstieg des Nukleus-Zytoplasma-Verhältnisses in den HR23B↑ Zellen beobachtbar. Die statistische Auswertung erfolgte über einen unabhängigen Zwei-Stichproben-t-Test.

Die Auswertung zeigte, dass das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis in HR23B↑ im Vergleich zu den Kontrollzellen Tre statistisch signifikant erhöht ist ($p \leq 0,005$).

3.2.4 Expression von HR23B in einzelnen Zellzyklusphasen

Aufgrund des veränderten Nukleus-Zytoplasma-Verhältnisses wurde eine mögliche Korrelation zwischen dem Zellzyklus und der Expression von HR23B untersucht. Dazu wurde ein Protokoll für die

Synchronisation der Zellen etabliert. Da die Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie mit Ethanol erfolgte, wurde mittels Immunfluoreszenz der Einfluss von Ethanol auf die HR23B-Expression und Detektion überprüft (Abbildung 16).

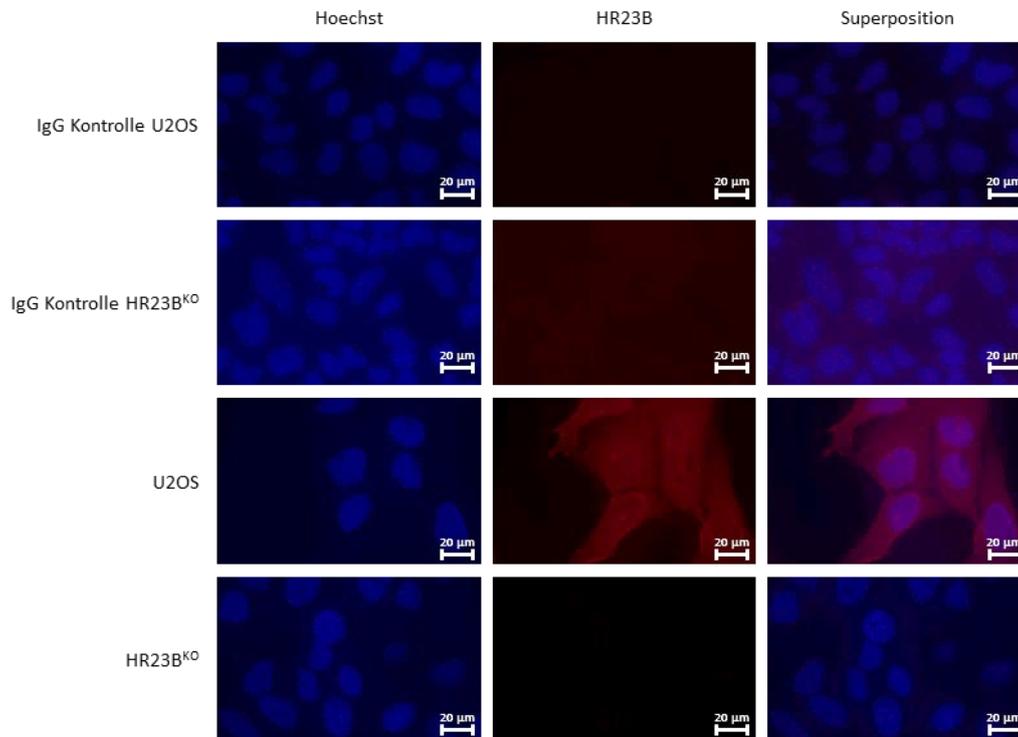


Abbildung 16: Überprüfung des Einflusses der Ethanolfixierung auf die Expression von HR23B

U2OS und HR23B^{KO} Zellen wurden mit Ethanol für 10 min bei -20 °C fixiert und permeabilisiert und mittels Immunfluoreszenz (Öl-immersionsobjektiv 63x) visualisiert. Die Nuklei wurden mit Hoechst angefärbt (blau), HR23B wurde mit Hilfe von anti-HR23B sichtbar gemacht (rot). Die Selektivität des Antikörpers wurde mittels IgG Kontrollen nachgewiesen. HR23B war nur in den U2OS Zellen exprimiert, in den HR23B^{KO} Zellen wurde kein HR23B detektiert.

Dabei konnte weder in den IgG Kontrollen noch im HR23B^{KO} HR23B detektiert werden, jedoch war eine Expression von HR23B in den U2OS Zellen sichtbar. Demnach schien die Fixierung für die Durchflusszytometrie keinen Einfluss auf die Expression oder Detektion von HR23B zu haben.

Für die Synchronisation der Zellen wurden die U2OS Zellen und die HR23B^{KO} Zellen, welche in diesem Kontext als Kontrolle dienten, mit Hydroxyurea oder Thymidin/Nocodazol behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen in DMEM mit 10 % FKS, 1 % Penicillin-Streptomycin kultiviert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen. Die Zellzyklusphasen konnten erfolgreich durch Propidiumiodid in der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die meisten Zellen befanden sich 3 h (71,39 %) nach der Hydroxyurea-Behandlung in der G1-Phase und nach 9 h (55,3 %) in der S-Phase. Der prozentuale Anteil der Zellen in der sub-G1-Phase zeigte, dass die Thymidin/Nocodazol-Behandlung für die Zellen sehr toxisch war. Für die G2-Phase wurde sich für eine einstündige Inkubation mit normalem Medium nach der Nocodazol-Behandlung (62,86 %) entschieden (Abbildung S8).

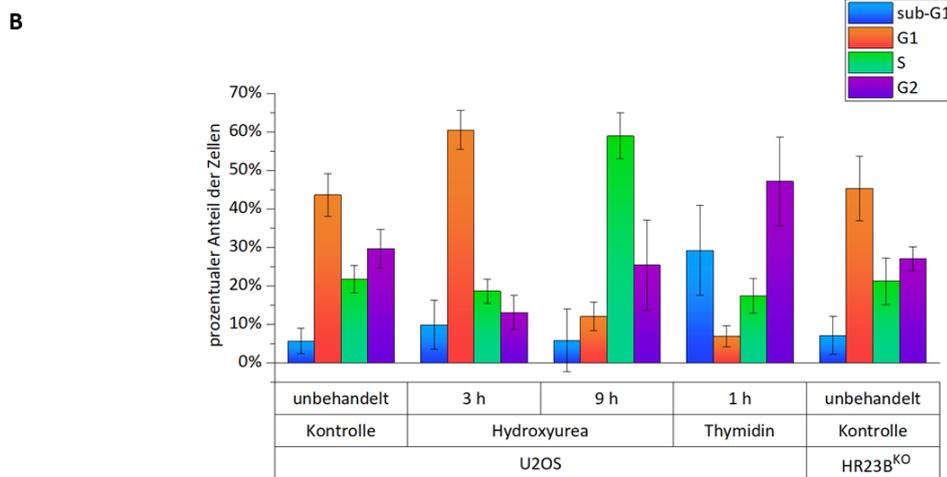
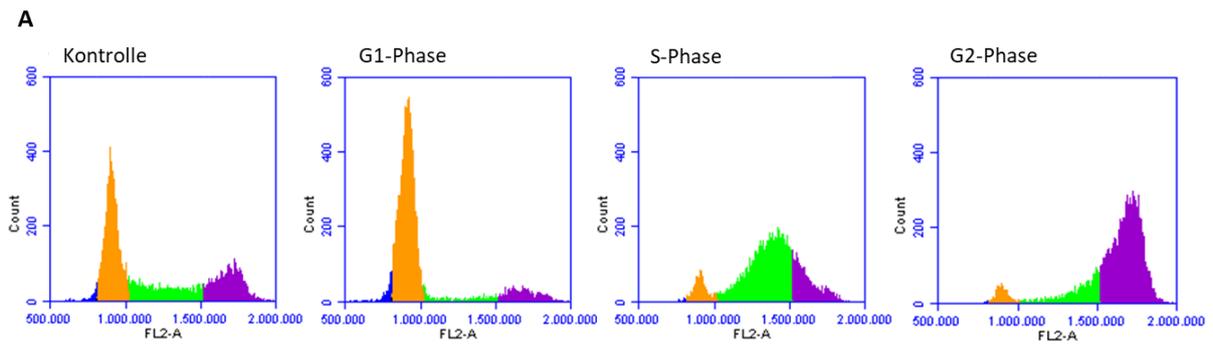


Figure C is a table showing the statistical significance (p-values) of differences between cell cycle phases across various treatments and time points. The table is structured as follows:

		U2OS				HR23B ^{KO}
		Kontrolle	Hydroxyurea		Thymidin	Kontrolle
		unbehandelt	3 h	9 h	1 h	unbehandelt
sub-G1-Phase	G1-Phase	p≤0,005	p≤0,005	p=0,690	p=0,015	p≤0,005
sub-G1-Phase	S-Phase	p≤0,005	p=0,105	p≤0,005	p=0,262	p=0,026
sub-G1-Phase	G2-Phase	p≤0,005	p=0,786	p=0,020	p=0,053	p≤0,005
G1-Phase	S-Phase	p≤0,005	p≤0,005	p≤0,005	p=0,360	p≤0,005
G1-Phase	G2-Phase	p≤0,005	p≤0,005	p=0,134	p≤0,005	p≤0,005
S-Phase	G2-Phase	p=0,109	p=0,418	p≤0,005	p≤0,005	p=0,532

Abbildung 17: Verteilung der U2OS und HR23B^{KO} Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen

Die U2OS Zellen wurden synchronisiert und ihre Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen mittels Propidiumiodid in der Durchflusszytometrie detektiert. In Abbildung (A) sind die Ergebnisse exemplarisch dargestellt. Als Kontrolle dienten unbehandelte U2OS und HR23B^{KO} Zellen. Die berechneten Mittelwerte (B) und ihre Standardabweichungen (n=4) zeigten die meisten unbehandelten Zellen in der G1-Phase, gefolgt von der G2-Phase, der S-Phase und der sub-G1-Phase. 3 h nach der Hydroxyureabehandlung befanden sich noch mehr Zellen in der G1-Phase, 9 h nach der Hydroxyureabehandlung waren die meisten Zellen in der S-Phase. Die Thymidin/Nocodazol(Thymidin)-Behandlung zeigte einen Anstieg der Zellen in der sub-G1-Phase, jedoch waren die meisten Zellen in der G2-Phase. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von ANOVA und anschließendem Tukey-Test (C). Die p-Werte wurde zur besseren Übersicht in einer extra Tabelle dargestellt und bestätigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Phasen nach den jeweiligen Behandlungen.

Die Expression von HR23B in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde mittels anti-HR23B detektiert, nachdem eine unspezifische Bindung ausgeschlossen werden konnte (Abbildungen S6 und S7). Abbildung 17 weist die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen nach, während Abbildung 18 die Expression von HR23B in den Zellzyklusphasen darstellt.

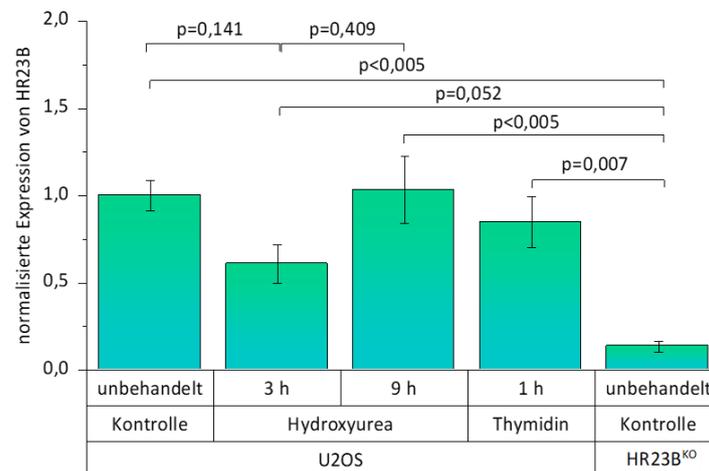


Abbildung 18: HR23B Expression in den einzelnen Zellzyklusphasen von U2OS Zellen

Die U2OS Zellen wurden synchronisiert und ihre HR23B-Expression mit Hilfe von anti-HR23B in der Durchflusszytometrie detektiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte U2OS und HR23B^{KO} Zellen. Die berechneten Mittelwerte und ihre Standardfehler (n=4) zeigten die höchste Expression von HR23B in der S-Phase und die niedrigste Expression in der G1-Phase. In HR23B^{KO} Zellen war kaum HR23B exprimiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von ANOVA und anschließendem Tukey-Test.

Die HR23B^{KO} Zellen dienten als Kontrolle und zeigten wie erwartet kein HR23B-Signal. In den U2OS Zellen war der Gehalt von HR23B 9 h nach der Hydroxyureabehandlung am höchsten. Dabei befanden sich die meisten Zellen in der S-Phase. In der G1-Phase (3 h nach der Hydroxyureabehandlung) war die Expression von HR23B am niedrigsten. Die in der G2-Phase befindlichen Zellen (1 h nach der Thymidin/Nocodazol-Behandlung) zeigten eine HR23B-Expression, welche zwischen der HR23B-Expression der G1-Phase und der S-Phase lag.

3.3 Einfluss der Proteasomshuttlingfaktoren auf extrazelluläre Vesikel in einem Huntingtinmodell

3.3.1 Relative Menge der extrazellulären Vesikel und ihr Huntingtingehalt in Abhängigkeit der Expression der Proteasomshuttlingfaktoren im Überstand

Eine Hypothese besagt, dass Chorea Huntington über extrazelluläre Vesikel verbreitet wird. Für die Untersuchung dieser Aussage wurde zunächst der Überstand semiquantitativ auf die Menge an extrazellulären Vesikeln untersucht. Dafür wurden U2OS, HR23A^{KO}, HR23B^{KO}, Tre und HR23B[↑] Zellen

mit den GFP-gekoppelten Plasmiden peGFP, Htt23Q und Htt74Q transfiziert und unterschiedliche Volumina des Überstandes mittels Dot Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis der extrazellulären Vesikel erfolgte mit Hilfe der Antikörper anti-CD63 bzw. anti-CD81 (Abbildung S9). Anhand der Ergebnisse im Vorversuch wurde im Folgenden für U2OS, HR23A^{KO} und HR23B^{KO} ein Volumen von 500 µl verwendet und bei Tre und HR23B[↑] 100 µl. Für die Detektion der extrazellulären Vesikel wurde sich für anti-CD63 entschieden (Abbildung 19). Die Signale des Dot Blots wurden ausgewertet und in Abbildung 20 dargestellt.

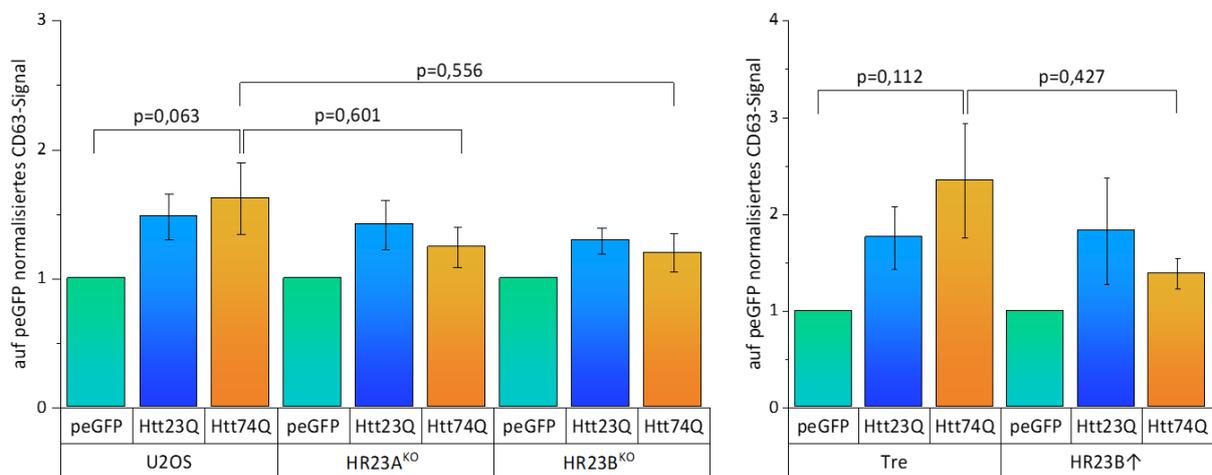
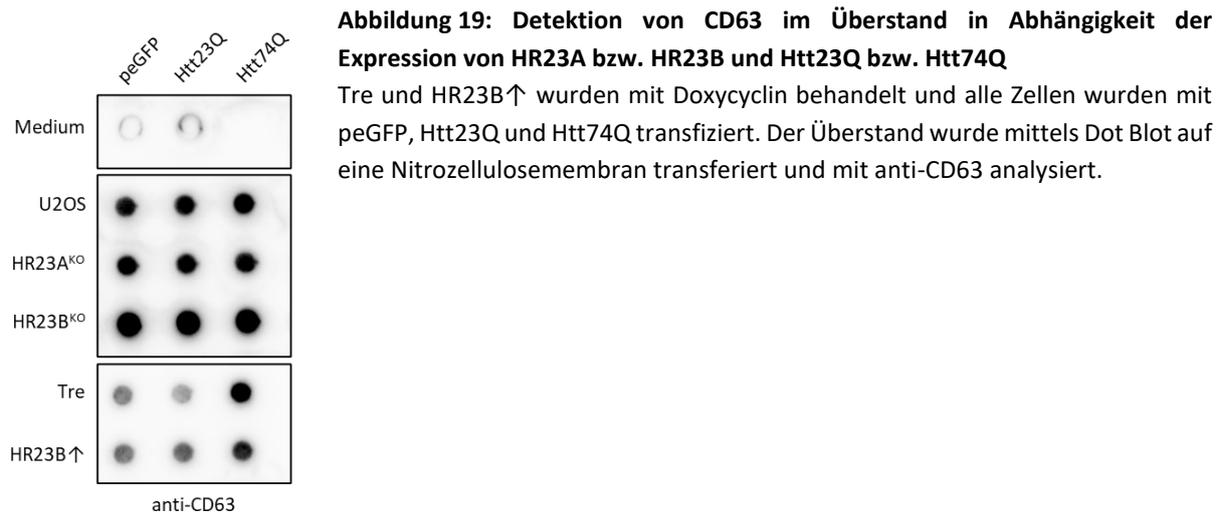


Abbildung 20: Quantifizierung des CD63-Signals im Überstand in Abhängigkeit der Expression von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q

Die CD63-Signale der Dot Blots wurden analysiert und auf peGFP normalisiert. Die dargestellten Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler (n=7) zeigten einen Anstieg des CD63-Signals in den Überständen der Htt74Q-exprimierenden U2OS und Tre Zellen im Vergleich zu ihrer Kontrolle. Sowohl der Knockout der Proteosomshuttlingfaktoren HR23A und HR23B als auch die Überexpression von HR23B führten zu einem reduzierten Anstieg des CD63-Signals. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey Test und zeigte keine statistische Signifikanz.

Diese zeigte einen tendenziellen Anstieg des CD63-Signals im Überstand der Htt74Q-exprimierenden U2OS Zellen gegenüber ihrer Kontrolle ($p=0,063$). Im Vergleich dazu war das Signal von CD63 im Überstand in Htt74Q-exprimierenden HR23A^{KO} und HR23B^{KO} Zellen eher reduziert. Die Tre Zellen zeigten ähnlich wie die U2OS Zellen einen möglichen Anstieg des CD63-Signals im Überstand bei Htt74Q-Expression ($p=0,112$). Die Überexpression von HR23B resultierte ebenfalls eher in eine Reduktion des CD63-Signals im Überstand bei Htt74Q-Expression.

Da bei HR23B^{KO} und HR23B[↑] ein komplementäres Ergebnis erwartet wurde und keines der Ergebnisse eine statistische Signifikanz aufwies, wurde eine weitere Methode zur Bestimmung der Anzahl der Vesikel verwendet. Dazu wurden die Vesikel aus dem Überstand mit anti-CD63-PE behandelt und die markierten Partikel in der Durchflusszytometrie gezählt (Abbildung 21).

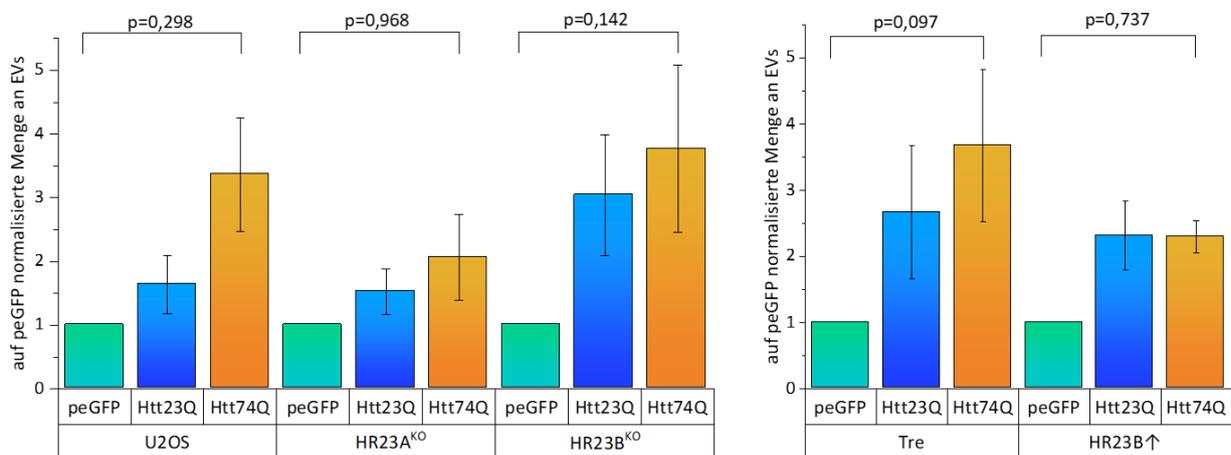


Abbildung 21: Menge der extrazellulären Vesikel im Überstand in Abhängigkeit der Expression von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q

Tre und HR23B[↑] wurden mit Doxycyclin behandelt und alle Zellen wurden mit peGFP, Htt23Q und Htt74Q transfiziert. Der Überstand wurde mit anti-CD63-PE markiert und die markierten Partikel mittels Durchflusszytometrie gezählt. Die auf peGFP normalisierten Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler ($n=4$) zeigten einen Anstieg des CD63-Signals in allen Überständen der Htt74Q-exprimierenden Zellen im Vergleich zu ihrer Kontrolle. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey Test und zeigte keine statistische Signifikanz.

Eine Zunahme der extrazellulären Vesikel im Überstand der Htt74Q-exprimierenden Zellen im Vergleich zu dem Überstand der GFP-exprimierenden Zellen konnte bei allen Zelllinien detektiert werden, wobei HR23B^{KO} eine höhere und HR23A^{KO} und HR23B[↑] eine geringere relative Menge an extrazellulären Vesikeln im Vergleich zu ihren Kontrollzelllinien aufwies. Des Weiteren konnte auch ein erhöhter Anstieg an extrazellulären Vesikeln im Überstand der Htt23Q-exprimierenden HR23B^{KO} Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigten jedoch keine statistische Signifikanz.

Da kein statistisch signifikanter Einfluss von HR23A und HR23B auf die Menge der extrazellulären Vesikel nachgewiesen werden konnte, wurde das GFP-Signal im Überstand mittels Dot Blot detektiert (Abbildung 22) und das GFP-CD63-Verhältnis wurde analysiert (Abbildung 23).

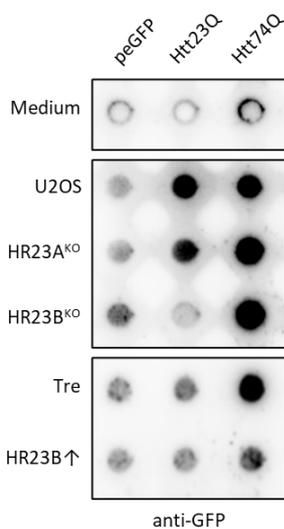


Abbildung 22: Detektion von GFP-gekoppeltem Huntingtin (Exon 1) im Überstand in Abhängigkeit der Expression von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q

Tre und HR23B[↑] wurden mit Doxycyclin behandelt und alle Zellen wurden mit peGFP, Htt23Q und Htt74Q transfiziert. Der Überstand wurde mittels Dot Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das GFP-gekoppelte Huntingtin (Exon 1) mit anti-GFP detektiert.

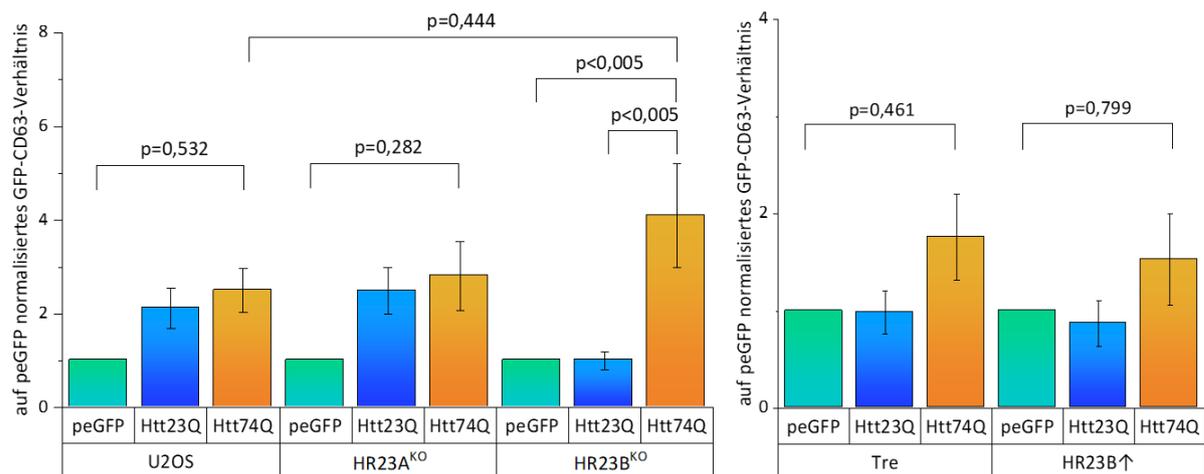


Abbildung 23: Quantifizierung des GFP-CD63-Verhältnisses im Überstand in Abhängigkeit der Expression von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q

Die GFP-Signale und CD63-Signale der Dot Blots wurden analysiert und ihr Quotient gebildet. Die auf peGFP normalisierten Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler (n=7) zeigten einen Anstieg des GFP-CD63-Verhältnisses in allen Überständen von Htt74Q-exprimierenden Zellen im Vergleich zu ihrer Kontrolle. Dieser war im Überstand der HR23B^{KO} Zellen stärker erhöht. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey Test und zeigte ausschließlich bei dem Überstand der HR23B^{KO} Zellen einen p-Wert $p \leq 0,005$.

Alle Zelllinien zeigten einen Anstieg des GFP-CD63-Verhältnisses im Überstand der Htt74Q-exprimierenden Zellen im Vergleich zu dem Überstand der GFP-exprimierenden Zellen. Im Überstand der HR23B^{KO} Zellen war dieser Anstieg am höchsten und als einziges statistisch signifikant ($p < 0,005$).

Bei HR23A^{KO} und HR23B[↑] konnten hingegen keine Unterschiede im Vergleich zu ihren Kontrollzelllinien festgestellt werden.

3.3.2 Einfluss der Proteasomshuttlingfaktoren auf den Huntingtingehalt in aufgereinigten extrazellulären Vesikeln

Zur Analyse des Huntingtingehalts in den extrazellulären Vesikeln wurden verschiedene Methoden der Aufreinigung untersucht (Abbildung S10). Dabei wurde zunächst das Western Blot Protokoll angepasst, indem die Denaturierung der Proteine bei 70 °C für 10 min erfolgte und eine PVDF-Membran verwendet wurde. Die extrazellulären Vesikel wurden mittels anti-CD63 nachgewiesen. Während mit dem Minute™ *High-Efficiency Exosome Precipitation Reagent* keine extrazellulären Vesikel detektiert werden konnten, war die Aufreinigung der extrazellulären Vesikel mit Hilfe des *MACS Exosome Isolation Kit* und mittels Ultrazentrifugation erfolgreich. CD63 zeigte dabei über mehrere Größen verlaufende Banden. Für den Nachweis des Huntingtingehalts in den extrazellulären Vesikeln wurde letztendlich die Ultrazentrifugation bevorzugt, da die mittels *MACS Exosome Isolation Kit* isolierten Vesikel an anti-CD63 gekoppelt waren.

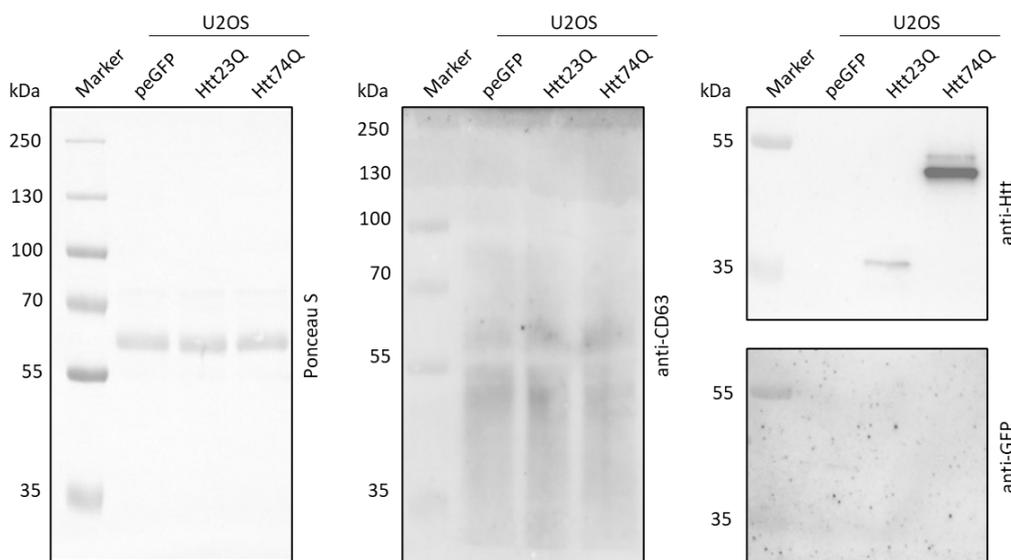


Abbildung 24: Expression von Exon 1 von Huntingtin in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln der U2OS Zellen

Die U2OS Zellen wurden mit peGFP, Htt23Q und Htt74Q transfiziert und ihre extrazellulären Vesikel aus dem Überstand mittels Ultrazentrifugation isoliert. Die erfolgreiche Aufreinigung wurde im Western Blot mit anti-CD63 bestätigt. Dabei waren über mehrere Größen verlaufende Banden zu erkennen. Für den Nachweis des GFP-gekoppelten Huntingtins (Exon 1) in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln wurde anti-Htt und anti-GFP verwendet. Dabei konnten Htt23Q und Htt74Q mit anti-Htt detektiert werden, mit anti-GFP nicht. Die Ladekontrolle erfolgte über eine Ponceau S-Färbung, war jedoch nicht sensitiv genug. Als Marker diente der PageRuler™ Plus Proteinstandard.

Im Anschluss wurde der Huntingtingehalt in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln überprüft. Dazu wurden zunächst U2OS Zellen mit den GFP-gekoppelten Plasmiden peGFP, Htt23Q und Htt74Q transfiziert, ihre extrazellulären Vesikel durch Ultrazentrifugation aufgereinigt und diese anschließend im Western Blot untersucht (Abbildung 24).

Dabei wurde festgestellt, dass sowohl die Ponceau S-Färbung als auch anti-GFP nicht sensitiv genug für dieses Experiment sind. Das in den extrazellulären Vesikeln vorliegende Huntingtin (Exon 1) konnte jedoch mit anti-Htt detektiert werden.

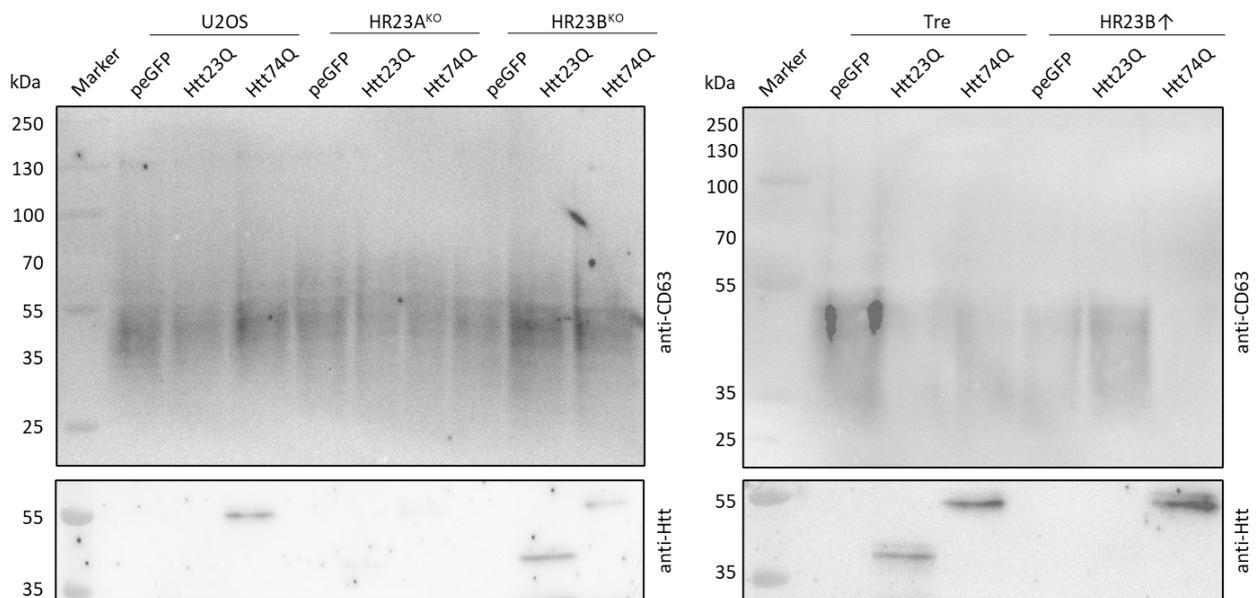


Abbildung 25: Expression von Exon 1 von Huntingtin in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln weiterer Zelllinien

Die Tre und HR23B[↑] Zellen wurden mit Doxycyclin behandelt. Anschließend wurden alle Zellen mit peGFP, Htt23Q und Htt74Q transfiziert und ihre extrazellulären Vesikel aus dem Überstand mittels Ultrazentrifugation isoliert. Die erfolgreiche Aufreinigung wurde im Western Blot mit anti-CD63 bestätigt. Dabei waren über mehrere Größen verlaufende Banden zu erkennen. Der Nachweis von Huntingtin (Exon 1) in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln erfolgte mit anti-Htt. Dabei konnte Htt74Q in den extrazellulären Vesikeln von U2OS, HR23B^{KO}, Tre und HR23B[↑] Zellen detektiert werden, Htt23Q wurde immer in den extrazellulären Vesikeln von HR23B^{KO} und Tre nachgewiesen und in zwei von vier Experimenten in den extrazellulären Vesikeln der U2OS Zellen. Als Marker diente der PageRuler™ Plus Proteinstandard.

Daraufhin wurden die extrazellulären Vesikel der anderen Zelllinien analog isoliert und analysiert (Abbildung 25). Neben den extrazellulären Vesikeln der U2OS Zellen zeigten auch die extrazellulären Vesikel von HR23B^{KO}, Tre und HR23B[↑] eine Expression des pathologischen Htt74Q. Des Weiteren konnte manchmal Htt23Q detektiert werden. Während die extrazellulären Vesikel von HR23B^{KO} und Tre immer Htt23Q enthielten, konnte dieses in den extrazellulären Vesikeln von HR23B[↑] nie detektiert werden. In den extrazellulären Vesikeln der U2OS Zellen wurden in 50 % der Fälle Htt23Q nachgewiesen. Lediglich die extrazellulären Vesikel von HR23A^{KO} zeigten weder Htt23Q noch Htt74Q.

Aufgrund der schwierigen Quantifizierung der Western Blot wurden die extrazellulären Vesikel erneut mit anti-CD63-PE markiert und der GFP-Gehalt in den CD63-positiven extrazellulären Vesikeln über die Durchflusszytometrie bestimmt.

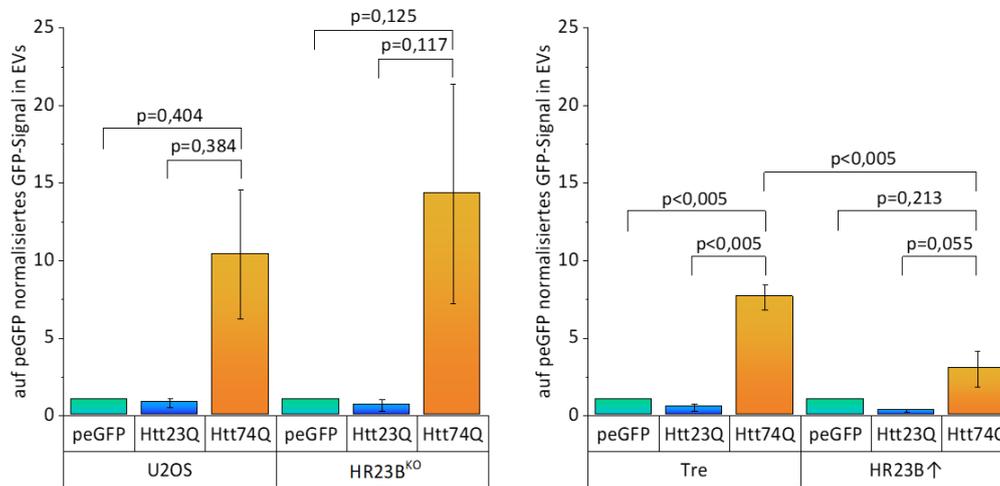


Abbildung 26: Expressionslevel von Exon 1 von Huntingtin in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln in der Durchflusszytometrie

Die Tre und HR23B[↑] Zellen wurden mit Doxycyclin behandelt. Anschließend wurden alle Zellen mit peGFP, Htt23Q und Htt74Q transfiziert und ihre extrazellulären Vesikel aus dem Überstand mittels Ultrazentrifugation isoliert. Die aufgereinigten extrazellulären Vesikel wurden mit anti-CD63-PE markiert und in der Durchflusszytometrie analysiert. Das GFP-Signal der markierten Partikel wurde gemessen und auf peGFP normalisiert. Die dargestellten Mittelwerte und ihre Standardfehler (n=3) zeigten in allen Zelllinien einen Anstieg des GFP-Signals in den extrazellulären Vesikeln der Htt74Q-exprimierenden Zellen. Dabei konnte bei HR23B^{KO} ein leichter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden, während die Überexpression von HR23B zu einer signifikanten Reduktion von Htt74Q in den extrazellulären Vesikeln führte ($p < 0,005$). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey Test.

Alle Zelllinien zeigten dabei einen Anstieg der Huntingtinexpression (GFP-Signal) in den extrazellulären Vesikeln der Htt74Q-exprimierenden Zellen. Der Knockout von HR23B resultierte dabei in einen stärkeren Anstieg als seine Kontrolle. Die Überexpression von HR23B führte zu einer signifikanten Reduktion von Htt74Q in den extrazellulären Vesikeln im Vergleich zu der Htt74Q-Expression in den von Tre ausgeschütteten extrazellulären Vesikeln ($p < 0,005$).

3.3.3 Expression der Oberflächenproteine auf den extrazellulären Vesikeln

Nachdem Exon 1 von Huntingtin in den extrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden konnte, wurden die Oberflächenproteine der extrazellulären Vesikel analysiert. Dazu wurden die Zellen mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfiziert und der Erfolg der Transfektion mittels Zelllyse und anschließendem Western Blot überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Aufreinigung der extrazellulären Vesikel erfolgte mittels magnetischer Trennung und ihre Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Micro BCA™ Protein Assay Kits bestimmt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Oberflächenproteine der

extrazellulären Vesikel unter Verwendung des *MACSPlex Exosome Kits* detektiert und ihre Auswertung in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt.

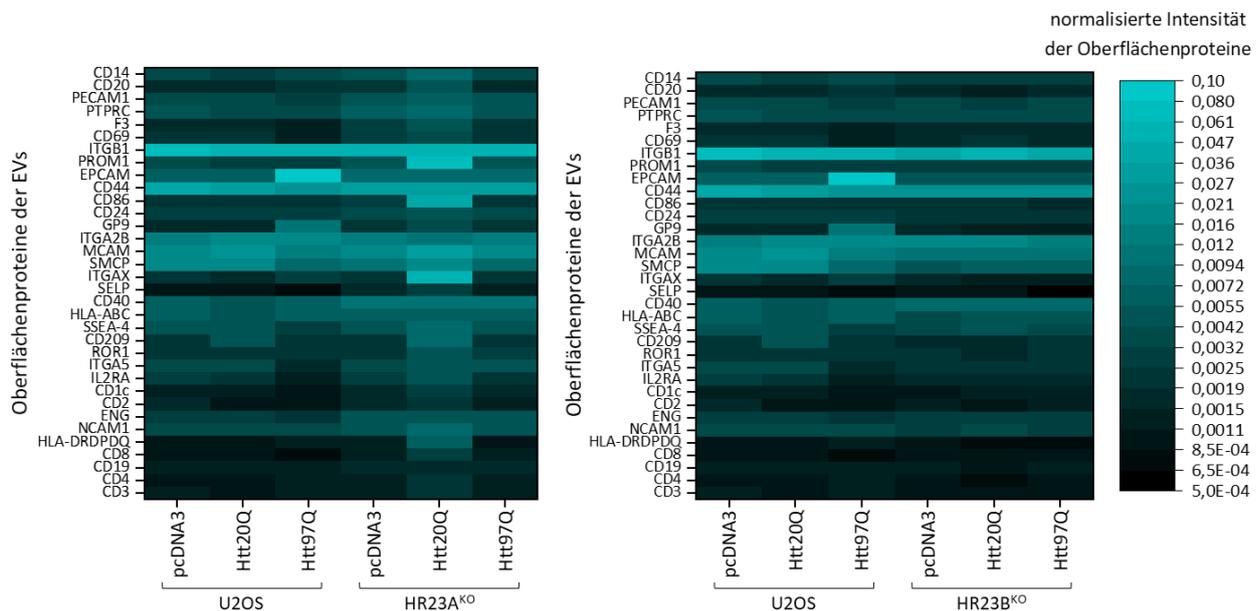


Abbildung 27: Expression der Oberflächenproteine auf den extrazellulären Vesikeln von U2OS, HR23A^{KO} und HR23B^{KO} Zellen in Abhängigkeit ihrer Expression von Huntingtin (Exon 1)

Die Zellen wurden mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfiziert und ihre extrazellulären Vesikel aus dem Überstand mittels *MACS Exosome Isolation Kit* isoliert. Die Analyse der Oberflächenproteine erfolgte mit dem *MACSPlex Exosome Kit* unter Verwendung der Durchflusszytometrie und die Mittelwerte der vier biologischen Replikate wurden dargestellt. Die statistische Auswertung für die einzelnen Oberflächenproteine erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Test, jedoch konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der Huntingtinexpression oder der HR23A- bzw. HR23B-Expression festgestellt werden. Zum direkten Vergleich wurden die Ergebnisse der von U2OS Zellen ausgeschütteten extrazellulären Vesikel in beiden Diagrammen gezeigt.

Keines der Oberflächenproteine der extrazellulären Vesikel zeigte eine statistisch signifikante Veränderung in Abhängigkeit der Huntingtinexpression der U2OS, HR23A^{KO} oder HR23B^{KO} Zellen. Bei den extrazellulären Vesikeln der HR23A^{KO} Zellen fiel jedoch ein leichter Anstieg der Oberflächenproteine bei Htt23Q-Expression auf im Vergleich zu der Kontrolle und zu der Htt97Q-Expression. Der Knockout von HR23B zeigte hingegen weitestgehend keine Veränderungen der Expression der Oberflächenproteine der extrazellulären Vesikel im Vergleich zu den extrazellulären Vesikeln der U2OS Zellen.

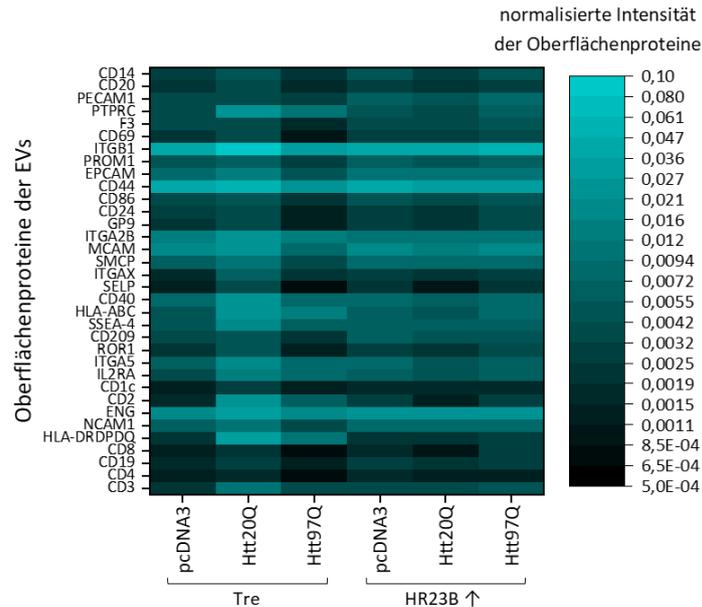


Abbildung 28: Expression der Oberflächenproteine auf den extrazellulären Vesikeln von Tre und HR23B↑ Zellen in Abhängigkeit ihrer Expression von Huntingtin (Exon 1)

Die Tre und HR23B↑ Zellen wurden mit Doxycyclin behandelt. Anschließend wurden sie mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfiziert und ihre extrazellulären Vesikel aus dem Überstand mittels *MACS Exosome Isolation Kit* isoliert. Die Analyse der Oberflächenproteine erfolgte mit dem *MACSPlex Exosome Kit* unter Verwendung der Durchflusszytometrie und die Mittelwerte der vier biologischen Replikate wurden dargestellt. Die statistische Auswertung für die einzelnen Oberflächenproteine erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Test, jedoch konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der Huntingtinexpression oder HR23B-Expression festgestellt werden.

Auch bei der Analyse der Oberflächenproteine der extrazellulären Vesikel von Tre und HR23B↑ Zellen konnte keine statistisch signifikante Veränderung beobachtet werden. Jedoch zeigten die extrazellulären Vesikel der Htt20Q-exprimierenden Tre Zellen eine vergleichsweise höhere Expression der Oberflächenproteine als ihre Kontrolle und die Htt97Q-enthaltenen extrazellulären Vesikel. Diese Tendenz war bei der HR23B-Überexpression invers. Hier exprimierten die extrazellulären Vesikel der Htt20Q-exprimierenden Zellen weniger Oberflächenproteine und die der Htt97Q-exprimierenden Zellen wiesen ein ähnliches Level an Oberflächenproteinen auf wie die Kontrolle.

3.3.4 Bestimmung der Zytokinausschüttung von Immunzellen nach der Behandlung mit den extrazellulären Vesikeln

Da die veränderten Oberflächenproteine in der Immunantwort eine Rolle spielen, wurden THP-1 Zellen zu Makrophagen differenziert und mit den extrazellulären Vesikeln behandelt. Anschließend wurde die Zytokinausschüttung mittels CBA Human Inflammatory Cytokine Kit gemessen. Im Medium konnten die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF detektiert werden (Abbildungen 29, 30 und 31). IL-8 lag

außerhalb des Messbereiches, IL-10 und IL-12p70 wurden nicht von den Immunzellen ausgeschüttet (Abbildung S11).

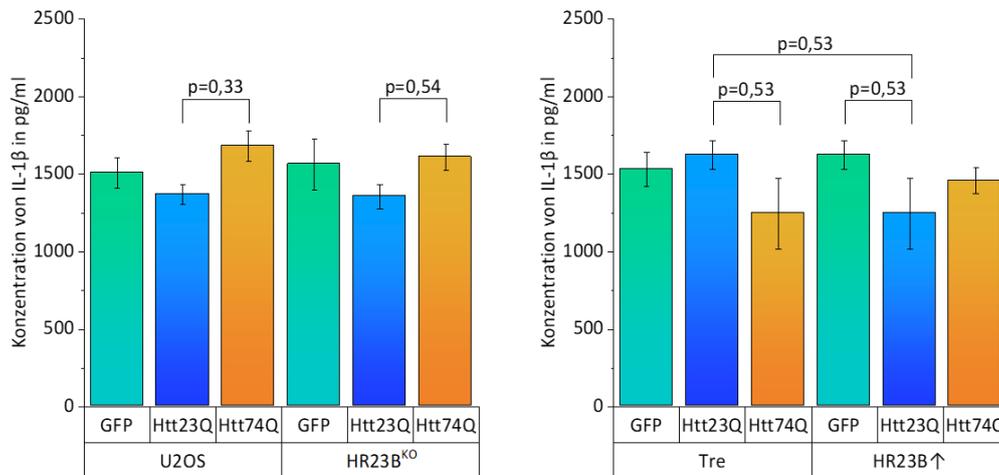


Abbildung 29: Bestimmung der Ausschüttung von IL-1β durch Immnzellen nach Behandlung mit extrazellulären Vesikeln in Abhängigkeit der Expression der Zellen von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q

Die THP-1 Zellen wurden zu M1-Makrophagen differenziert und polarisiert, bevor sie mit den aufgereinigten extrazellulären Vesikel versetzt wurden. Die Analyse der ausgeschütteten Zytokine erfolgte mit dem CBA Human Inflammatory Cytokine Kit und ihre Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler (n=3) wurden dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey Test und zeigte keine statistische Signifikanz.

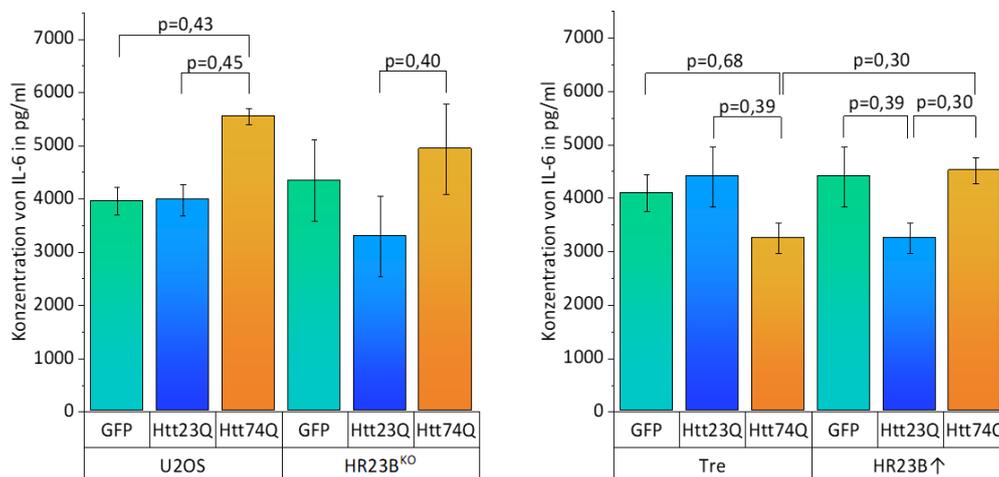


Abbildung 30: Bestimmung der Ausschüttung von IL-6 durch Immnzellen nach Behandlung mit extrazellulären Vesikeln in Abhängigkeit der Expression der Zellen von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q

Die THP-1 Zellen wurden zu M1-Makrophagen differenziert und polarisiert, bevor sie mit den aufgereinigten extrazellulären Vesikel versetzt wurden. Die Analyse der ausgeschütteten Zytokine erfolgte mit dem CBA Human Inflammatory Cytokine Kit und ihre Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler (n=3) wurden dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey Test und zeigte keine statistische Signifikanz.

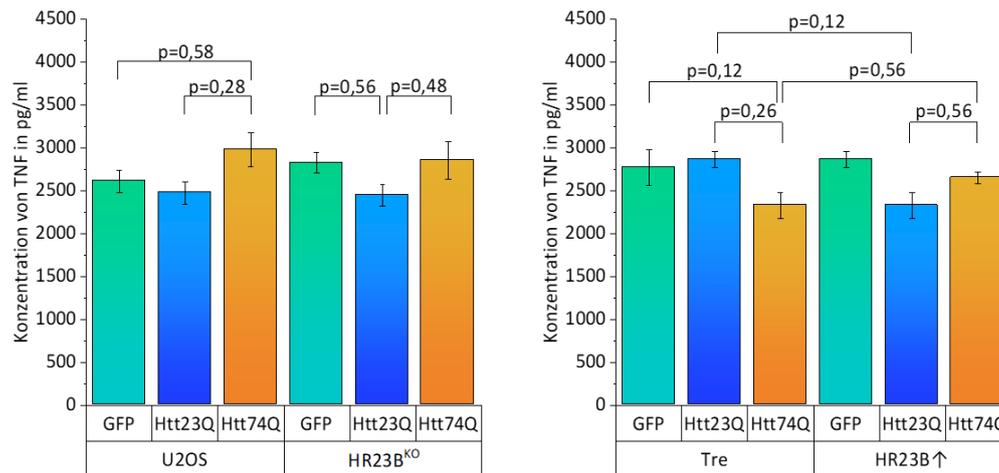


Abbildung 31: Bestimmung der Ausschüttung von TNF durch Immunzellen nach Behandlung mit extrazellulären Vesikeln in Abhängigkeit der Expression der Zellen von HR23A bzw. HR23B und Htt23Q bzw. Htt74Q

Die THP-1 Zellen wurden zu M1-Makrophagen differenziert und polarisiert, bevor sie mit den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln versetzt wurden. Die Analyse der ausgeschütteten Zytokine erfolgte mit dem CBA Human Inflammatory Cytokine Kit und ihre Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler ($n=3$) wurden dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey Test und zeigte keine statistische Signifikanz.

Die detektierten Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF zeigten keine signifikanten Unterschiede durch die Behandlung mit extrazellulären Vesikeln der verschiedenen Zelllinien und ihrer Huntingtinexpression. Es konnte jedoch ein möglicher Anstieg der drei Zytokine nach Behandlung mit den Htt74Q-enthaltenen extrazellulären Vesikeln von U2OS und HR23B^{KO} Zellen im Vergleich zu den Htt23Q-enthaltenen extrazellulären Vesikeln beobachtet werden. Ein Unterschied zwischen den U2OS Zellen und dem Knockout von HR23B war dabei nicht festzustellen. Die Behandlung mit Htt74Q-enthaltenen extrazellulären Vesikeln der Tre Zellen zeigte hingegen eine mögliche Reduktion der ausgeschütteten Zytokine im Vergleich zu den Htt23Q-enthaltenen extrazellulären Vesikeln. Diese Tendenz war bei HR23B Überexpression invers, sodass die Htt74Q-enthaltenen extrazellulären Vesikel zu einer stärkeren Zytokinausschüttung führten als die Htt23Q-enthaltenen extrazellulären Vesikel.

3.3.5 Vergleich des Huntingtingehalts in Mikrovesikeln und Exosomen

Extrazelluläre Vesikel werden in Mikrovesikel und Exosomen unterteilt. Da sie sich in der Größe unterscheiden, konnten sie mittels Ultrazentrifugation voneinander aufgetrennt werden und im Western Blot auf ihren Huntingtingehalt untersucht werden (Abbildung 32).

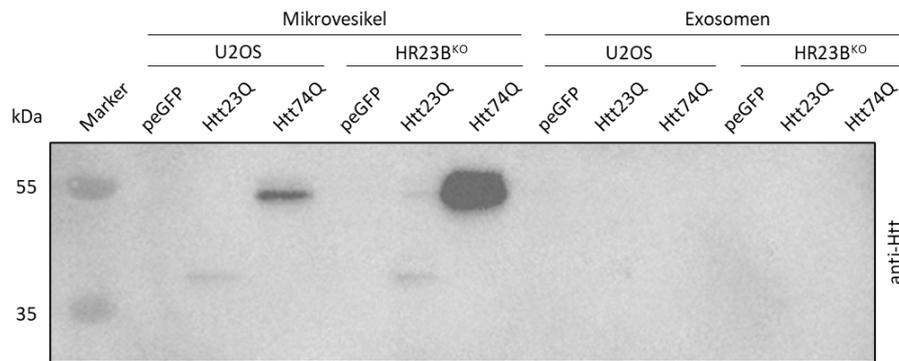


Abbildung 32: Expression von Exon 1 von Huntingtin in den aufgereinigten Mikrovesikeln und Exosomen in U2OS und HR23B^{KO} Zellen

Die U2OS und HR23B^{KO} Zellen wurden mit peGFP, Htt23Q und Htt74Q transfiziert und ihre Mikrovesikel und Exosomen aus dem Überstand mittels Ultrazentrifugation voneinander getrennt. Der Nachweis von Huntingtin (Exon 1) in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln erfolgte mit anti-Htt. Dabei konnte sowohl Htt23Q als auch Htt74Q in den Mikrovesikeln von U2OS und HR23B^{KO} Zellen detektiert werden, in den Exosomen jedoch nicht. Als Marker diente der PageRuler™ Plus Proteinstandard.

Dieser zeigte sowohl ein Htt23Q- als auch Htt74Q-Signal in den Mikrovesikeln beider untersuchten Zelllinien, jedoch kein Signal in den Exosomen der Zellen.

3.4 Analyse der Huntingtinaggregate

3.4.1 Aufreinigung von Huntingtinaggregaten

Die Aufreinigung der Aggregate erfolgte ebenfalls mittels Ultrazentrifugation. Anschließend wurden die Aggregate in einem Western Blot analysiert.

Dabei konnte leider weder auf der Nitrozellulosemembran noch auf der PVDF-Membran ein Signal beobachtet werden (Abbildung S12).

3.4.2 Einfluss der Acetylierung auf Huntingtin in HR23B-überexprimierenden Zellen

Um den Einfluss der Acetylierung auf Huntingtin (Exon 1) zu untersuchen, wurde der HDAC-Inhibitor SAHA verwendet, welcher zu einer Hyperacetylierung führte. Die mit Htt97Q transfizierten Tre und HR23B[↑] Zellen wurden erneut in der Immunfluoreszenz analysiert.

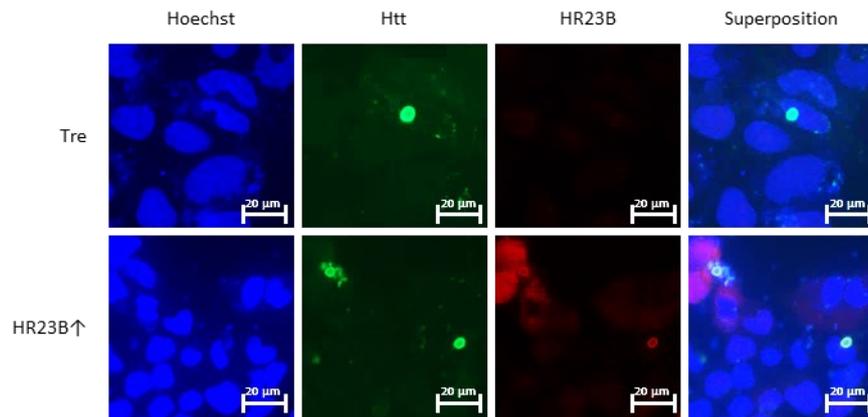


Abbildung 33: Einfluss der Acetylierung auf Huntingtin (Exon 1) in Tre und HR23B↑ Zellen

Tre und HR23B↑ Zellen wurden mit SAHA und Doxycyclin behandelt, mit Htt97Q transfiziert und mittels Immunfluoreszenz (Ölimmersionsobjektiv 63x) visualisiert. Die Nuclei wurden mit Hoechst angefärbt (blau), das in den Zellen exprimierte Exon 1 von Huntingtin wurde mit Hilfe von anti-HA sichtbar gemacht (grün), der Nachweis der HR23B Expression erfolgte mit anti-HR23B. Htt97Q trat sowohl in Tre als auch in HR23B↑ Zellen als perinukleäre Aggregate auf.

Die Abbildung 33 zeigt sowohl in Tre als auch in HR23B↑ Huntingtinaggregate. Außerdem konnte beobachtet werden, dass HR23B nicht mehr gleichmäßig in den Zellen verteilt ist, sondern mit den Huntingtinaggregaten kolokalisiert. Anschließend wurde das Aggregat-Zell-Verhältnis mit Hilfe des *High-Content-Analysesystems* Operetta® CLS™ quantifiziert und die Ergebnisse in Abbildung 34 dargestellt.

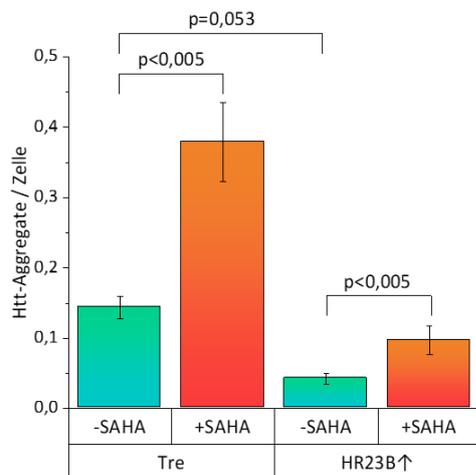


Abbildung 34: Quantifizierung der Huntingtinaggregate pro Zelle in hyperacetylierten Tre und HR23B↑ Zellen

Die Anzahl der Htt97Q-Aggregate in hyperacetylierten Tre und HR23B↑ Zellen sowie die Anzahl der Tre und HR23B↑ Zellen wurden mit dem *High-Content-Analysesystem* Operetta® bestimmt und ihr Quotient berechnet. Es wurden die Mittelwerte und ihre Standardfehler dargestellt ($n \geq 8$). Dabei war ein Anstieg des Aggregat-Zell-Verhältnisses in den hyperacetylierten Zellen beobachtbar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey Test ($p \leq 0,005$).

Diese zeigt einen statistisch signifikanten Anstieg des Aggregat-Zell-Verhältnisses in den Tre und HR23B↑ Zellen ($p < 0,005$). Es wurde ebenfalls das Nucleus-Zytoplasma-Verhältnis bestimmt (Abbildung 35), jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied durch die SAHA-Behandlung festgestellt.

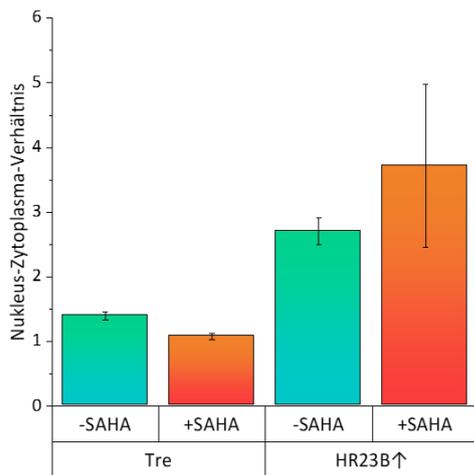


Abbildung 35: Quantifizierung des Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis von hyperacetylierten Tre und HR23B↑ Zellen

Die Flächen der Nuklei und des Zytoplasmas von Tre und HR23B↑ Zellen wurden mit dem *High-Content-Analysesystem Operetta®* bestimmt und ihr Quotient berechnet. Es wurden die Mittelwerte und ihre Standardfehler dargestellt ($n > 2800$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und anschließendem Tukey Test. Dabei war keine statistisch signifikante Veränderung des Nukleus-Zytoplasma-Verhältnisses durch die Acetylierung beobachtbar.

3.5 Analyse der Doppelknockoutzelllinie HR23A/B^{KO}

3.5.1 Proteinnachweis der Doppelknockoutzelllinie HR23A/B^{KO}

Für die weitere Analyse des Einflusses von HR23A und HR23B wurden von Diana Panfilova Doppelknockouts hergestellt. Diese wurden zunächst auf ihren HR23A und HR23B Proteingehalt untersucht.

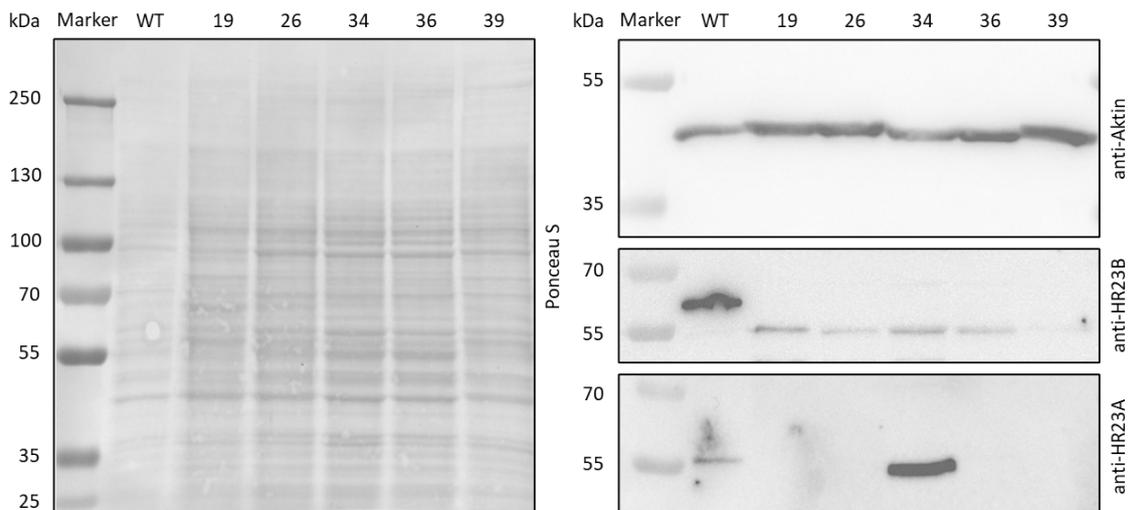


Abbildung 36: Proteinexpression von HR23A und HR23B in durch CRISPR/Cas9-generierten HR23A/B^{KO} Zellen

Die Klone der CRISPR/Cas9-basierten Doppelknockoutzelllinie HR23A/B^{KO} wurden lysiert und ihre Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte im anschließenden Western Blot mit anti-HR23A und anti-HR23B. Dabei zeigten die Klone 19, 26, 36 und 39 weder eine Expression von HR23A noch von HR23B. Die Ladekontrolle erfolgte über eine Ponceau S-Färbung und mit anti-Aktin. Als Marker diente der PageRuler™ Plus Proteinstandard.

Laut Abbildung 36 konnten im Western Blot vier positive Klone detektiert werden (19, 26, 36 und 39). Klon 34 exprimiert zwar kein HR23B, jedoch weiterhin HR23A.

3.5.2 Nachweis des Doppelknockouts auf genetischer Ebene

Im Anschluss an den Proteinnachweis der Doppelknockoutmutanten HR23A/B^{KO} wurde die genomische DNS der positiven Klone isoliert und die drei durch CRISPR/Cas9-veränderten Genfragmente (Typ A, Typ B und Typ C) durch PCR vervielfältigt.

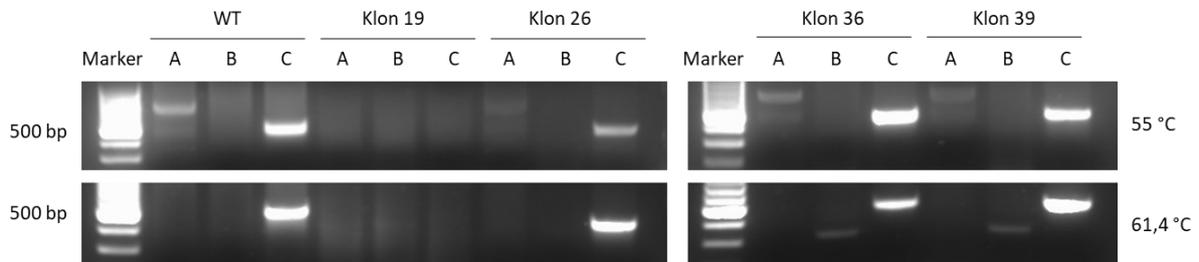


Abbildung 37: Nachweis der amplifizierten durch CRISPR/Cas9-veränderten Genfragmente von HR23A/B^{KO}

Die genomische DNS der HR23A/B^{KO} Klone wurde isoliert und die drei durch CRISPR/Cas9-veränderten Genfragmente (Typ A, Typ B und Typ C) mittels PCR amplifiziert. Der Erfolg der Amplifikation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Während Typ C im Wildtyp und den Klonen 26, 36 und 39 immer erfolgreich amplifiziert werden konnte, musste die Hybridisierungstemperatur der Primer für Typ A (55 °C) und Typ B (61,4 °C) angepasst werden. Trotz der Anpassung war nur eine schwache Bande für Typ A im Wildtyp und den Klonen 26, 36 und 39 und für Typ C in den Klonen 36 und 39 erkennbar. Als Marker diente der GeneRuler™ 100 bp DNS-Leiter.

In der Abbildung 37 ist erkennbar, dass die Primer von Typ C sowohl bei einer Hybridisierungstemperatur von 55 °C als auch bei 61,4 °C im Wildtyp und in den Klonen 26, 36 und 39 zu einer erfolgreichen Amplifikation führten. Eine schwächere Bande war für Typ A im Wildtyp und in den Klonen 26, 36 und 39 bei 55 °C erkennbar, während Typ B in den Klonen 36 und 39 bei einer Hybridisierungstemperatur von 61,4 °C nachgewiesen werden konnte. Die PCR-Produkte, welche eine Bande zeigten, wurden zur Sequenzierung geschickt. Dabei konnten nur die PCR-Produkte für Typ C erfolgreich sequenziert werden (Abbildung S13). Es war jedoch in keinem Fall eine genetische Veränderung nachweisbar (Tabelle 6).

Tabelle 6: Genetische Veränderung der CRISPR/Cas9-generierten HR23A/B^{KO}

Die Tabelle zeigt, ob die PCR-Produkte nicht sequenziert werden konnten (?) oder ob die Sequenzierung erfolgreich war, jedoch keine genetische Veränderung detektierbar war (X).

	Typ A	Typ B	Typ C
Wildtyp	?	?	X
Klon 19	?	?	?
Klon 26	?	?	X
Klon 36	?	?	X
Klon 39	?	?	X

4 Diskussion

4.1 Aggregationsverhalten von physiologischem und pathologischem Huntingtin

4.1.1 Expression und Aggregation von endogenem Huntingtin in iPS Zellen

Chorea Huntington ist eine autosomal-dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung, welche durch die Aggregation des Proteins Huntingtin charakterisiert ist (Sun et al. 2017). Huntingtin aggregiert, wenn es mindestens 36 CAG-Wiederholungen und somit mindestens 36 Glutaminreste in Exon 1 beinhaltet (MacDonald et al. 1993; Nørremølle et al. 1993; Rubinsztein et al. 1996). Nach Ausbruch der Krankheit leiden die Patienten unter Bewegungsstörungen, unkontrollierten Emotionsausbrüchen und Abbau der kognitiven Fähigkeiten, bis sie letztendlich an der Krankheit sterben (Stoker et al. 2022). Um neue und effizientere Therapiestrategien entwickeln zu können, ist es notwendig, die Pathogenese von Chorea Huntington besser zu erforschen.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alessandro Prigione und Dr. Pawel Lisowski reprogrammierte die Zellen eines 50-jährigen Spenders zu iPS Zellen. Diese enthalten die genetische Information für Huntingtin mit 17 Glutaminresten auf beiden Allelen (*HTT17Q/HTT17Q*). Mittels Geneditierung generierte die Arbeitsgruppe zwei homozygote Zelllinien (*HTT70Q/HTT70Q* und *HTT0Q/HTT0Q*) und eine heterozygote Zelllinie (*HTT70Q/HTT17Q*). Ihr Erfolg wurde auf Genebene nachgewiesen und sollte anschließend auf Proteinebene bestätigt werden (Publikation in Vorbereitung).

Abbildung 7 zeigt die unterschiedlichen Proteinmassen von Huntingtin in den einzelnen Zelllinien. Während die Bande von Htt70Q/Htt70Q und Htt70Q/Htt17Q höher liegt als die Kontrolle Htt17Q/Htt17Q, ist die Bande von Htt0Q/Htt0Q tiefer. Dies bestätigt die erfolgreiche Geneditierung der Kontrollzelllinie (*HTT17Q/HTT17Q*) zu den homozygoten Zelllinien (*HTT70Q/HTT70Q* und *HTT0Q/HTT0Q*) auf Proteinebene, jedoch wurden entsprechend weiterer Publikationen zwei Banden bei der heterozygoten Zelllinie (*HTT70Q/HTT17Q*) erwartet (Aronin et al. 1995; Gutekunst et al. 1995). Da die detektierte Bande auf Höhe der Bande von Htt70Q/Htt70Q liegt, fehlt die Bande für Htt17Q. In der Publikation von Aronin et al. wurde eine analoge Beobachtung gemacht, wenn der Unterschied zwischen den Glutaminresten zu gering war. Dies lässt vermuten, dass bei einer längeren Laufzeit der SDS-PAGE zwei Banden detektierbar wären, konnte aufgrund von fehlendem Material jedoch nicht mehr überprüft werden. Weiterhin wäre eine Ladekontrolle mit einer höheren molekularen Masse erforderlich, da Aktin nicht mehr in dem Gel detektierbar wäre. Hier würde sich möglicherweise Vinculin eignen, welches eine molekulare Masse von 116 kDa aufweist und bereits als Ladekontrolle bei dem Nachweis von Huntingtin in neuronalen Stammzellen verwendet wurde (Bailus et al. 2021).

Da die Aggregation von Huntingtin ein Charakteristikum der Krankheit Chorea Huntington ist, wurde diese zwischen Htt17Q/Htt17Q und Htt70Q/Htt70Q verglichen. Dazu wurden die jeweiligen iPS Zellen von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alessandro Prigione und Dr. Pawel Lisowski zu neuronalen Vorläuferzellen differenziert bzw. Organoiden generiert. Jeweils 20 µg der lysierten Proteine wurden in einem Filterretardationsassay auf ihre Aggregation untersucht. Die dabei verwendete Filtermembran aus Zelluloseacetat hält nur aggregierte Proteine im Filter zurück, lösliche Proteine können die Membran passieren (Wanker et al. 1999; Scherzinger et al. 1997). In Abbildung 8 (oben) liegt der höchste Anteil an Aggregaten in Htt17Q/Htt17Q enthaltenen neuronalen Vorläuferzellen vor, gefolgt von den Htt70Q/Htt70Q enthaltenen neuronalen Vorläuferzellen, den Htt17Q/Htt17Q exprimierenden Organoiden und schlussendlich den Htt70Q/Htt70Q exprimierenden Organoiden. Dies widerspricht jedoch der mehrfach bewiesenen Aussage, dass die pathologisch verlängerten Huntingtinproteine aggregieren (Hoffner et al. 2007; Mangiarini et al. 1996) und der bereits beobachteten erhöhten Aggregation von Huntingtin in den postmitotischen Zellen (Scior et al. 2018).

Da bereits in Abbildung 7 beobachtet werden konnte, dass die Kontrolle Htt17Q/Htt17Q trotz eines geringeren Gesamtproteingehalts (entsprechend der Ponceau S-Färbung und anti-Aktin) einen höheren Huntingtingehalt aufwies, wurde der Gesamthuntingtingehalt mit Hilfe eines Dot Blots nachgewiesen (Abbildung 8 unten). Dieser bestätigt eine höhere Menge an Huntingtin in den Htt17Q/Htt17Q enthaltenen neuronalen Vorläuferzellen, gefolgt von den Htt70Q/Htt70Q enthaltenen neuronalen Vorläuferzellen, den Htt17Q/Htt17Q exprimierenden Organoiden und schlussendlich den Htt70Q/Htt70Q exprimierenden Organoiden trotz gleichmäßiger Auftragung der Proteinlysate. Demnach wird vermutet, dass die Signalintensität der Huntingtinaggregate stark von der Expression von Huntingtin abhängig ist.

Aus diesem Grund wurden bei der Quantifizierung der in Abbildung 8 gewonnenen Ergebnisse, die Huntingtinaggregate ins Verhältnis zu ihrem Gesamthuntingtingehalt gesetzt (Abbildung 9). Dabei wird sowohl in den neuronalen Vorläuferzellen (Abbildung 9A), als auch in den Organoiden (Abbildung 9B) eine höhere Aggregation in den Htt70Q/Htt70Q enthaltenen Proben im Vergleich zu der Kontrolle Htt17Q/Htt17Q beobachtet. Dies entspricht den bereits publizierten Beobachtungen von Hoffner et al. und Mangiarini et al. (Hoffner et al. 2007; Mangiarini et al. 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aggregation in den Organoiden im Vergleich zu den neuronalen Vorläuferzellen sowohl in den Htt17Q/Htt17Q als auch in den Htt70Q/Htt70Q enthaltenen Proben anstieg. Es wird vermutet, dass die erhöhte Aggregation auf die Differenzierung zurückzuführen ist. Die Aggregate werden während der Zellteilung der neuronalen Vorläuferzellen aufgelöst, in den postmitotischen Zellen der Organoiden kommt es zu einer fortlaufenden Aggregation (Bufalino und van der Kooy 2014). Diese wird durch

Unterschiede in der Proteinqualitätskontrolle unterstützt (Higuchi-Sanabria et al. 2018; Zglinicki et al. 2021).

4.1.2 Expression und Aggregation von überexprimiertem Huntingtin in U2OS Zellen

Mit circa 350 kDa ist das Protein Huntingtin ein sehr großes Protein. Für Chorea Huntington charakteristisch ist jedoch die erhöhte Anzahl an Glutaminresten in Exon 1 (MacDonald et al. 1993). Es wurde gezeigt, dass Exon 1 des pathologisch verlängerten Huntingtins ausreicht, um in einer transgenen Maus einen Chorea Huntington entsprechenden Phänotypen auszulösen (Mangiarini et al. 1996; Yang et al. 2020). Weiterhin konnten Yang et al. nachweisen, dass Exon 1 des pathologischen Huntingtins altersabhängig im Corpus Striatum akkumuliert. Dieses gilt als der erste von Atrophie betroffene Bereich im Gehirn der Chorea Huntington Patienten (Tabrizi et al. 2013). Weiterhin wurden unterschiedliche N-terminale Huntingtinfragmente auf ihre Pathologie in *Drosophila* untersucht und das pathologische Exon 1 resultierte sowohl in einen Anstieg in der Proteinaggregation und Neurodegeneration als auch in einer signifikanten Reduktion der Langlebigkeit, der Eklosion und der motorischen Funktionen (Barbaro et al. 2015). Daraus hat sich die Verwendung des Exon 1 von Huntingtin in dem Forschungsfeld etabliert (Ghosh et al. 2020; Ceccon et al. 2022; Guan et al. 2022) und wurde für die folgenden Experimente verwendet.

Die dafür verwendeten Plasmide wurden zunächst sequenziert und die Gene für die Fusionsproteine HA und GFP, ein Teil des Exon 1 sowie die entsprechende Anzahl der Glutaminreste konnten erfolgreich nachgewiesen werden (Abbildung S1). Die daraus resultierenden Molekülmassen wurden in Tabelle 5 dargestellt. Für die folgende Analyse der Proteine im Western Blot wurde sich daran orientiert und ein 10%iges SDS-Gel verwendet.

Der Nachweis der erfolgreichen Transfektion der U2OS Zellen mit den HA-gekoppelten Plasmiden Htt20Q und Htt97Q unter Verwendung von anti-HA ist in Abbildung 4A dargestellt. Dabei liegt Htt20Q mit einer apparenten Größe von circa 23 kDa in etwa 10 kDa über der berechneten Proteinmasse. Diese Abweichung resultiert vor allem aus der prolinreichen Domäne. Die Aminosäure Prolin ist aufgrund ihrer Ringstruktur rigider als andere Aminosäuren. Somit haben Proteine mit einer prolinreichen Domäne einen höheren Stokesradius und erscheinen in der SDS-PAGE höher als ihre theoretische Masse (Rothe und Purkhanbaba 1982). Anhand der in Tabelle 5 berechneten Differenz wurde demnach für Htt97Q eine Bande bei circa 33 kDa erwartet, jedoch trat diese bei circa 53 kDa auf und war bei gleichmäßiger Beladung sehr viel schwächer exprimiert als Htt20Q. Die Verschiebung der Htt97Q-Bande ist während der Optimierung auch unter anderen getesteten Bedingungen (Abbildung S2) beobachtet worden. Aus diesem Grund wurde Htt97Q-GFP mittels anti-GFP untersucht,

dessen Größe laut Tabelle 5 bei 46,75 kDa liegen müsste (Abbildung 4B). Mit über 70 kDa liegt die Bande ebenfalls weit über der berechneten Proteinmasse. Dieses Phänomen wurde auch in HEK293 Zellen (Li und Li 1998) und PC-12 Zellen (Li et al. 1999) beobachtet. Da der einzige Unterschied zwischen den Plasmiden Htt20Q und Htt97Q die Anzahl der Glutaminreste ist und diese das Laufverhalten des Proteins nicht behindert, wird vermutet, dass die Htt97Q-Aggregate nicht vollständig gelöst werden können (Kazantsev et al. 1999).

Für eine bessere Lyse von Htt97Q wurde die unlösliche Fraktion mit Ameisensäure behandelt. Diese löst in SDS nicht-lösliche Aggregate (Mokrasch 1965) und bewiesenermaßen auch Huntingtinaggregate (Hazeki et al. 2000; Iuchi et al. 2003). Der anschließende Nachweis der Proteine ist in Abbildung 5 dargestellt. Htt20Q zeigte keine Bande, sodass vermutet wird, dass es nicht in der unlöslichen Fraktion vorliegt. Htt97Q zeigt zwar keine Expression von Aktin, jedoch zwei Banden für Htt97Q. Die obere Bande liegt, wie in Abbildung 4, bei circa 53 kDa, während die untere Bande bei circa 33 kDa auftritt. Damit ist die Differenz zwischen der unteren Bande von Htt97Q in der unlöslichen Fraktion und der Bande von Htt20Q in der löslichen Fraktion in etwa 10 kDa und entspricht somit der in Tabelle 5 theoretisch berechneten Differenz zwischen den beiden Proteinen. Diese Beobachtung bestätigt, dass eine erhebliche Menge des exprimierten Htt97Q in der aggregierten Form vorliegt.

Neben den Plasmiden Htt20Q, Htt97Q und Htt97Q-GFP wurden die U2OS Zellen ebenfalls mit den GFP-gekoppelten Plasmiden Htt23Q und Htt74Q transfiziert (Abbildung 6A). Die Proteine wurden sowohl mit anti-GFP als auch mit anti-Htt nachgewiesen. Dabei wird immer eine Doppelbande detektiert, die auf ein Spaltprodukt hinweist. Interessanterweise tritt die mit Htt97Q beobachtete Verschiebung nicht bei Htt74Q auf, sodass die Differenz zwischen Htt74Q und Htt23Q der in Tabelle 5 berechneten Größe entspricht. Layburn et al. wiesen nach, dass mit steigender Anzahl der Glutaminreste die Anzahl der Huntingtinaggregate zunimmt und dass die Patienten beim Ausbruch der Krankheit jünger sind (Layburn et al. 2022). Letzteres wurde bereits von Capiluppi et al und Duyao et al. gezeigt (Capiluppi et al. 2020; Duyao et al. 1993). Weiterhin ist die Lebenserwartung nach den ersten Symptomen geringer, je mehr Glutaminreste in Exon 1 auftreten (Foroud et al. 1999; Langbehn 2022). Die Beobachtung, dass Htt74Q in der löslichen Fraktion detektiert werden konnte und Htt97Q vor allem in der unlöslichen Fraktion auftrat, könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Länge der Glutaminreste auch über dem Schwellenwert von 36 Glutaminresten relevant für die Charakteristika der Aggregate ist.

Zusätzlich zu den U2OS Zellen wurden die Zelllinien HR23A^{KO}, HR23B^{KO} (Abbildung 6A), Tre und HR23B[↑] (Abbildung 6B) mit den Plasmiden Htt23Q und Htt74Q transfiziert. Der Nachweis der exprimierten Huntingtinproteine erfolgte ebenfalls mit anti-GFP und anti-Htt. Des Weiteren wurde der

Knockout von HR23A bzw. HR23B mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 6A). Die Überexpression des Flag-gekoppelten HR23B erfolgte mit Hilfe eines *Tet-on* Systems. Dieses wird durch die Zugabe von Doxycyclin induziert. Als Kontrollzelllinie dient Tre, welches das *Tet-on* System ohne Informationen für HR23B enthält. Die Zelllinien Tre und HR23B[↑] wurden mittels anti-HR23B und anti-Flag auf ihre HR23B-Expression untersucht. Dabei konnte in beiden Zelllinien endogenes HR23B nachgewiesen werden, wobei HR23B[↑] eine stärkere Expression aufwies. Die Expression des Flag-gekoppelten HR23B konnte nur in den HR23B[↑] Zellen detektiert werden (Abbildung 6B).

Die Expression der Huntingtinkonstrukte wurde weiterhin in der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 10 und 11). Zunächst bestätigen die IgG Kontrollen und die Transfektion mit pcDNA3 eine spezifische Färbung von Huntingtin. Htt20Q und Htt23Q-HA sind sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma exprimiert (Hoogeveen et al. 1993), während Htt97Q und Htt74Q-HA perinukleäre Ringstrukturen bilden. Dies zeigt, dass Htt74Q trotz seiner Löslichkeit in der Zellyse (Abbildung 6) pathologische Eigenschaften aufweist. Die perinukleäre Lokalisation wurde auch von Iuchi et al. und Waelter et al. beobachtet, welche die Strukturen als Aggregate beschrieben (Iuchi et al. 2003; Waelter et al. 2001).

Zur genaueren Bestimmung der perinukleären Strukturen wurde eine Färbung mit dem Proteostat[®] *Protein Aggregation Kit* durchgeführt (Abbildung 12). Der darin enthaltene Farbstoff interkaliert unabhängig von der Proteinsequenz in β -Strukturen (Shen et al. 2011). Poirier et al. identifizierte die Huntingtinaggregate als eben solche Strukturen (Poirier et al. 2005). Analog zu Abbildung 10 war Htt20Q im Zytoplasma und Nukleus der Zellen gleichmäßig verteilt, während Htt97Q perinukleäre Ringstrukturen aufwies. Die Htt97Q-Strukturen wurden ebenfalls mit Proteostat[®] angefärbt. In den mit pcDNA3 und Htt20Q-transfizierten Zellen konnte hingegen keine Färbung nachgewiesen werden. Damit wurde bestätigt, dass die perinukleären Ringstrukturen Aggregate sind.

Zur weiteren Analyse der Huntingtinaggregate wurden diese mittels Ultrazentrifugation nach dem Protokoll von Díaz-Hernández et al. aufgereinigt (Díaz-Hernández et al. 2004). Das isolierte Huntingtin konnte jedoch nicht im Western Blot nachgewiesen werden. In der Publikation wurden ganze Vorderhirne oder 1 bis 2 g kortikaler Dissektionen von Mäusen verwendet, während im durchgeführten Versuch nur einen Zellansatz von wenigen Mikrogramm zur Verfügung stand, sodass die Proteinmenge möglicherweise zu gering war.

Waelter et al. wiesen neben der perinukleären Lokalisation der Aggregate eine Beeinträchtigung des Ubiquitin-Proteasom-Systems nach (Waelter et al. 2001). Die perinukleäre Lokalisation wird auf die Bindung von Huntingtin an β -Tubulin zurückgeführt (Hoffner et al. 2002). Interessanterweise wurde in

einer massenspektrometrischen Analyse der HR23B^{KO} Zellen von Mai-Binh Nguyen eine hochregulierte Untereinheit von β -Tubulin (TUBB3) identifiziert.

4.2 Einfluss des Proteasomshuttlingfaktors HR23B

4.2.1 Verbreitung von Huntingtin in Abhängigkeit der HR23B-Expression

Die Charakterika von Huntingtin und das Proteinqualitätskontrollsystem insbesondere das Ubiquitin-Proteasom-System kohärieren. Neben Waelter et al. zeigten auch weitere Publikationen eine Verbindung der Beeinträchtigung des Ubiquitin-Proteasom-Systems mit der Aggregation von Huntingtin (Waelter et al. 2001; Riguet et al. 2021; Bence et al. 2001; Thibadeau et al. 2018). Der beschriebene Zusammenhang zwischen der perinukleären Lokalisation der Huntingtinaggregate und HR23B liefert einen ersten Hinweis auf einen Einfluss von HR23B auf die Aggregation von Huntingtin. Der Proteasomshuttlingfaktor HR23B und sein Homolog HR23A erkennen fehlgefaltete Proteine und leiten sie zum Proteasom weiter (Elsasser et al. 2004; Verma et al. 2004). Die Interaktion zwischen den Proteasomshuttlingfaktoren und dem Proteasom ist dabei über die Phosphorylierung der UBL-Domäne reguliert (Liang et al. 2014). Neben dem Shuttleprozess aktivieren sie das Proteasom und erhöhen damit die Kapazität der Proteindegradation (Collins und Goldberg 2020). Jensen et al. konnten zeigen, dass der mRNA-Gehalt von HR23B in Alzheimerpatienten im Cerebellum signifikant höher war als in den anderen Bereichen des Gehirns (Jensen et al. 2018). Diese Region gilt in Alzheimer als die am wenigsten bzw. am spätesten betroffene Region (Hu et al. 2017). Zhang et al. zeigten in einem Modell für ALS, dass die Proteasomshuttlingfaktoren HR23A und HR23B mit dem für ALS charakteristischen Protein poly(GA) aggregieren, während die Überexpression von HR23B die Aggregation und die Toxizität von poly(GA) reduziert (Zhang et al. 2016).

In den folgenden Versuchen erfolgte die Überexpression von HR23B mittels *Tet-on* System (Gossen et al. 1995; Das et al. 2016). Zur Überprüfung des Einflusses des *Tet-on* Systems wurde die Zelllinie Tre verwendet, welches das *Tet-on* System enthält, jedoch keine genetischen Informationen für HR23B. In Abbildung 13A ist die Expression von Htt20Q und Htt97Q in den Tre Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie visualisiert. Dabei kann mit Hilfe von anti-HR23B eine schwache Expression von endogenem HR23B nachgewiesen werden. Htt20Q ist wie in den U2OS Zellen (Abbildung 10) gleichmäßig verteilt, während Htt97Q ebenfalls perinukleäre Aggregate zeigt. Riguet et al. wiesen nach, dass die Huntingtinaggregate Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems enthalten (Riguet et al. 2021), Yang et al. zeigten, dass HR23B mit den Huntingtinaggregaten in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T kolokalisiert (Yang et al. 2018). Diese Beobachtung wurde in den Tre Zellen nicht gemacht, HR23B ist in der Zelle gleichmäßig exprimiert mit Ausnahme des Inneren der Huntingtinaggregate.

In Abbildung 13B ist zunächst die HR23B-Überexpression mittels anti-HR23B nachgewiesen worden. Des Weiteren ist beobachtbar, dass sowohl Htt20Q als auch Htt97Q in den HR23B \uparrow Zellen gleichmäßig exprimiert ist. Demnach tritt Htt97Q unter HR23B-Überexpression nicht aggregiert auf. Zur Quantifizierung dieser Ergebnisse wurden die Aggregate und die Zellen im *High-Content-Analysesystem* Operetta[®] CLS[™] gezählt und der Quotient der Aggregate zu den Zellen bestimmt (Abbildung 14). Die Reduktion des Aggregat-Zell-Verhältnisses in den HR23B \uparrow Zellen bestätigt die Beobachtungen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Judith Riemer untersuchte im Rahmen ihrer Doktorarbeit das Aggregat-Zell-Verhältnis in HR23A^{KO} und HR23B^{KO} Zellen. Dabei wurde festgestellt, dass in den HR23B^{KO} Zellen statistisch signifikant mehr Aggregate auftraten und diese größer erschienen. Dieses komplementäre Ergebnis bestätigt den Einfluss von HR23B auf die Htt97Q-Aggregate. Muchowski et al. entdeckten in *Saccharomyces cerevisiae*, dass für die Aggregation von Huntingtin ein intaktes Zytoskelett der Mikrotubuli notwendig ist (Muchowski et al. 2002). Die erhöhte Expression der Untereinheit TUBB3 von β -Tubulin sowie der Untereinheit TUBA4A von α -Tubulin in HR23B^{KO} Zellen, die in der Massenspektrometrie von Mai-Binh Nguyen nachgewiesen wurde, könnte ein möglicher Grund für den Anstieg der Huntingtinaggregate in HR23B^{KO} Zellen sein. Der Knockout von HR23A zeigte ebenfalls einen Anstieg der Anzahl und der Größe der Aggregate, dieser war jedoch nicht statistisch signifikant.

Wie bereits beschrieben, ist das Ubiquitin-Proteasom-System in Chorea Huntington beeinträchtigt. In Zellsystemen (Waelter et al. 2001) sowie in Mäusen (Martín-Aparicio et al. 2001) konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems die Aggregation von Huntingtin begünstigt. Seo et al. wiesen weiterhin eine Beeinträchtigung des Ubiquitin-Proteasom-Systems in Chorea Huntington Patienten nach (Seo et al. 2004). Der genaue Mechanismus ist bis heute jedoch nicht geklärt. Bowman et al. beschrieben sogar den gegenteiligen Effekt (Bowman et al. 2005) und Schipper-Krom et al. zeigten, dass das Proteasom zwar in den Aggregaten nachweisbar ist, jedoch funktionstüchtig blieb (Schipper-Krom et al. 2014). Daraus resultierte die Frage, ob das Proteasom Huntingtin abbauen kann. Díaz-Hernández et al. untersuchten die drei Peptidasen des Proteasoms und konnten kein Abbau von Huntingtin nachweisen (Díaz-Hernández et al. 2003). Es wurde vermutet, dass die Beeinträchtigung des Ubiquitin-Proteasom-Systems durch ein „Verstopfen“ des Proteasoms durch Huntingtin zustande kommt. Dies wurde jedoch von Hipp et al. widerlegt und Juenemann et al. konnten letztlich zeigen, dass mutiertes Huntingtin mit zwei zusätzlichen Lysinen am N-Terminus vollständig über das Proteasom abgebaut wird (Juenemann et al. 2013; Hipp et al. 2012). Hipp et al. zeigten weiterhin, dass das lösliche Huntingtin nicht ubiquitiniert vorlag, während das degradierte, pathologisch verlängerte Huntingtin aus der Publikation von Juenemann et al. eine Polyubiquitinierung an den N-terminalen Lysinen aufwies.

Auch die postmortem isolierten Huntingtinaggregate wiesen eine Polyubiquitinierung auf (DiFiglia et al. 1997; Sieradzan et al. 1999). Wie die Sequenzierung der Plasmide zeigt (Abbildung S1), hat Exon 1 von Huntingtin bereits drei Lysine. Steffan et al. substituierten ebendiese Lysine und verhinderten somit die Ubiquitinierung von Huntingtin (Steffan et al. 2004). Später wurde bestätigt, dass das aggregierte Huntingtin an diesen Lysinen ubiquitiniert vorliegt (Juenemann et al. 2015). Die UBA-Domäne von HR23A und HR23B kann polyubiquitinierte Proteine erkennen. Dadurch erfolgt eine Weiterleitung der Proteine zum Proteasom (Chen et al. 2001; Chen und Madura 2002; New et al. 2013). Demnach wird vermutet, dass das überexprimierte HR23B an das mutierte, ubiquitinierte Exon 1 von Huntingtin bindet, seine Fehlfaltung verhindert bzw. die fehlgefalteten Proteine zum Proteasom für den Abbau weiterleitet und damit die Aggregation von Huntingtin verhindert. Jana et al. konnte bereits eine ähnliche Beobachtung durch die Überexpression des Cochaperons CHIP (C-Terminus des HSP70 interagierenden Proteins) verzeichnen, welche zu einer erhöhten Ubiquitinierung sowie einem erhöhten Abbau der Proteine Huntingtin und dem für die Machado-Joseph-Krankheit charakteristischem Ataxin-3 führte (Jana et al. 2005). Weiterhin konnte eine Regulation der Huntingtinaggregate durch das Siah-1-interagierende Protein, welches eine Ubiquitin-Protein-Ligase ist, detektiert werden (Latoszek et al. 2022).

Die verwendeten U2OS Zellen eignen sich aufgrund ihrer hohen endogenen Expressionslevel der Proteasomshuttlingfaktoren HR23A (Kumar et al. 1999) und HR23B (New et al. 2013; Kaur et al. 2007; Sakai et al. 2020) besonders gut. Diese konnten sowohl im Western Blot (Abbildung 6) als auch in der Immunfluoreszenz (Abbildung 16) nachgewiesen werden. Da die beiden Proteasomshuttlingfaktoren ihre Funktionen in der Nukleotidexzisionsreparatur (Sugasawa et al. 1997; Okuda et al. 2004; Ng et al. 2003) und bei der Bindung von Ataxin-3 (Chen und Madura 2006) gegenseitig übernehmen können, wurden von Diana Panfilova Doppelknockoutzellen generiert. Auf Proteinebene konnten dabei vier positive Klone bestimmt werden (Abbildung 36). Diese wurden auf genetischer Ebene auf ihre Modifikationen untersucht, jedoch konnte bisher keine identifiziert werden (Abbildung 37, Tabelle 6).

Da die Experimente mit dem Knockout von HR23A keine signifikanten Unterschiede in der Größe und Anzahl der Huntingtinaggregate zeigten, wurde auf eine Überexpression von HR23A zunächst verzichtet. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der HR23A^{KO} zu einer höheren Expression von HR23B führte (Abbildung 6), welches einer erhöhten Aggregation wiederum entgegenwirkt. Weiterhin liegt HR23B in embryonalen Fibroblasten von Mäusen zehnfach höher exprimiert in den Zellen vor, sodass der Knockout von HR23B möglicherweise aus diesem Grund einen höheren Effekt auf Huntingtin hat (Okuda et al. 2004).

Die verwendeten U2OS Zellen entstammen jedoch einem Osteosarkom (Pontén und Saksela 1967). Für die Untersuchung von Chorea Huntington wäre eine Wiederholung der Experimente in neuronalen Zellen wünschenswert. Dazu wurden von Helena Grebenchuk im Rahmen einer Bachelorarbeit CRISPR/Cas9-basierte SH-SY5Y Zelllinien mit einem Knockout der zu untersuchenden Proteasomshuttlingfaktoren HR23A bzw. HR23B generiert. Die Zelllinie entstammt aus einem vierjährigen Mädchen mit Neuroblastom (Biedler et al. 1973). Weiterhin arbeiteten Lara Peters im Rahmen eines Forschungsgruppenpraktikums und Annett Thate an der Generation von HR23B-überexprimierende SH-SY5Y Zellen. Bisher konnten diese jedoch noch nicht etabliert werden.

4.2.2 Einfluss von HR23B auf das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis

Neben dem Aggregat-Zell-Verhältnis konnte mit dem *High-Content*-Analysesystem Operetta® CLS™ auch das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis bestimmt werden. Der Quotient der bestimmten Flächen wurde in Abbildung 15 dargestellt und zeigt einen Anstieg in den HR23B[↑] Zellen im Vergleich zu den Tre Zellen. Judith Riemer validierte diese Beobachtung in den HR23B^{KO} Zellen und konnte sie auch in den HR23A^{KO} Zellen zeigen.

Der Grund des veränderten Nukleus-Zytoplasma-Verhältnisses müsste weiter untersucht werden. Es ist bekannt, dass bei steigender Zellseneszenz die Proteinmenge im Zytoplasma zunahm, im Nukleus hingegen nicht (Wihastuti et al. 2020). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Proteinmenge in Korrelation zu dem Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis steht (Wu et al. 2021). Somit würde das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis im Alter sinken. Da Chorea Huntington altersabhängig ist, wäre es möglich, dass mit zunehmendem Alter die Aktivität des Proteasoms durch einen Abbau von HR23B reduziert ist. Demnach würden Proteine, wie auch mutiertes Huntingtin, weniger degradiert werden und somit eine Ausbreitung der Erkrankung wahrscheinlicher. Um diese Theorie zu überprüfen, wäre es notwendig die Zellen altern zu lassen und die HR23B Expression zu überprüfen. Judith Riemer konnte bereits zeigen, dass in vitalen U2OS Zellen HR23B zu 66 % im Zytoplasma exprimiert ist und zu 33 % im Nukleus.

Ein weiterer Ansatz ist die Fähigkeit von HR23B Proteine zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma zu transportieren (Okeke et al. 2020). Bei einer Überexpression von HR23B würde das möglicherweise zu einem verschobenen Gleichgewicht der Proteinverteilung zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma führen. Dieser Transport findet vor allem in den Zellzyklusphasen statt, wobei bekannt ist, dass HR23B in der S-Phase eher im Zytoplasma lokalisiert ist (Katiyar und Lennarz 2005).

Um einen besseren Einblick in die Abhängigkeit des Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis von der HR23B Expression zu erhalten, wurde die Expression von HR23B in den einzelnen Zellzyklusphasen analysiert.

Dazu wurde zunächst überprüft, ob die im Experiment notwendige Fixierung mit Ethanol einen Einfluss auf die Expression von HR23B hat (Abbildung 16). Dies war notwendig, da es bereits zu Veränderungen der Expression von HR23B mit Methanol kam (Daten nicht gezeigt). Die Kontrolle mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte jedoch, dass keine unspezifische Färbung (IgG Kontrollen) oder veränderte Expression (HR23B Expression in HR23B^{KO} Zellen) durch die Fixierung mit Ethanol auftrat. Demnach konnten die synchronisierten Proben für die Durchflusszytometrie mit Ethanol fixiert werden.

Die Synchronisation erfolgte unter der Verwendung von Hydroxyurea oder Thymidin/Nocodazol. Nach verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung befinden sich die Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Dabei sind die meisten Zellen 3 h nach der Hydroxyureabehandlung in der G1-Phase und 9 h nach der Hydroxyureabehandlung in der S-Phase. 1 h nach der Behandlung mit Thymidin/Nocodazol befinden sich die meisten Zellen in der G2-Phase. Es ist jedoch ein hoher Anteil der Zellen in der sub-G1-Phase (Abbildung 17). Dies spricht für eine hohe Toxizität der Behandlung. Die Toxizität ist Nocodazol zuzuschreiben, welches Apoptose induziert und deswegen auch unter anderem als Tumormedikament eingesetzt wird (Beswick et al. 2006; Ikegami et al. 1997; Verdoodt et al. 1999).

Die HR23B^{KO} Zellen zeigen im Vergleich zu den U2OS Zellen einen höheren Anteil der Zellen in der G1-Phase und weniger Zellen in der G2-Phase, was die Beobachtungen von Diana Panfilovas Bachelorarbeit unterstützt.

In Abbildung 18 ist die Expression von HR23B dargestellt. Zunächst konnte die Spezifität der Messung durch das reduzierte Signal von HR23B in den HR23B^{KO} Zellen bestätigt werden. Die höchste HR23B-Expression wurde in der S-Phase beobachtet, während die Zellen in der G1-Phase die niedrigste Expression von HR23B zeigten. Katiyar und Lennarz wiesen nach, dass HR23B in der G1-Phase vor allem im Nukleus lokalisiert ist (Katiyar und Lennarz 2005). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Nukleotidexzisionsreparatur eine wichtige Rolle in der G1-Phase spielt, an der HR23B nachweislich beteiligt ist (Sarkar et al. 2006). In der S-Phase ist HR23B vermehrt im Zytoplasma lokalisiert (Katiyar und Lennarz 2005). Der beobachtete Anstieg der HR23B-Expression und die bekannte Lokalisation in der S-Phase könnten darauf hinweisen, dass HR23B in dieser Phase mehr auf seine Aufgaben im Ubiquitin-Proteasom-System konzentriert ist und stärker exprimiert werden muss, da vor der Mitose viele Proteine neu synthetisiert werden.

4.3 Verbreitung von Chorea Huntington durch extrazelluläre Vesikel in Abhängigkeit von Proteasomshuttlingfaktoren

4.3.1 Einfluss der Proteasomshuttlingfaktoren auf extrazelluläre Vesikel und ihren Huntingtingehalt

Das Corpus Striatum zeigt während des Verlaufes von Chorea Huntington als erstes Aggregate (Tabrizi et al. 2013), jedoch breitet sich die Krankheit auf bisher ungeklärte Weise im ganzen Gehirn aus. Huntingtin konnte extrazellulär detektiert werden (Cicchetti et al. 2014) und es wurde nachgewiesen, dass humane Zellen Huntingtin aufnehmen können (Ren et al. 2009; Yang et al. 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Verbreitung von Huntingtin relevant für den Krankheitsverlauf ist (Costanzo et al. 2013; Pecho-Vrieseling et al. 2014). Jeon et al und Pearce et al. beschrieben diese Verbreitung als prionähnlich (Jeon et al. 2016; Pearce et al. 2015), welche wiederum in extrazellulären Vesikeln beobachtet wurde (Ecroyd et al. 2004; Fevrier et al. 2004; Robertson et al. 2006). Extrazelluläre Vesikel dienen vor allem der Kommunikation zwischen den Zellen (Budnik et al. 2016; Rajendran et al. 2014). Seit einigen Jahren wird auch die Verbreitung von neurodegenerativen Erkrankungen durch extrazelluläre Vesikel untersucht. Es wurden bereits A β (Rajendran et al. 2006; Vingtdeux et al. 2007; Gabrielli et al. 2022), Tau (Saman et al. 2012) und α -Synuclein (Emmanouilidou et al. 2010) in extrazellulären Vesikeln detektiert. Dies lässt vermuten, dass auch Huntingtin in extrazellulären Vesikeln vorkommt (Pink et al. 2021). 2022 konnten Ananbeh et al. extrazelluläre Vesikel aus dem Plasma von Schweinen und Menschen isolieren und Huntingtin in ihnen nachweisen (Ananbeh et al. 2022).

Zur Untersuchung des Einflusses von extrazellulären Vesikeln wurde zunächst der Gehalt an extrazellulären Vesikeln im Überstand der Huntingtin-exprimierenden Zellen bestimmt. Ein Marker für extrazelluläre Vesikel ist das Tetraspanin CD63, welches sich auf der Oberfläche der extrazellulären Vesikel befindet (Crescitelli et al. 2013). Das CD63-Signal wurde im Überstand der U2OS, HR23A^{KO}, HR23B^{KO}, Tre und HR23B \uparrow Zellen im Dot Blot detektiert und in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt. Als erstes wurde festgestellt, dass das bestimmte CD63-Signal in den Kontrollzelllinien U2OS und Tre bei einer Expression von Htt74Q anstieg.

Sowohl der Knockout von HR23A oder HR23B als auch die Überexpression von HR23B führten eher zu einer Reduktion des CD63-Signals, jedoch war keines dieser Ergebnisse statistisch signifikant. Außerdem wurde ein komplementäres Ergebnis zwischen der Überexpression und dem Knockout von HR23B erwartet. Aus diesem Grund wurden die extrazellulären Vesikel mittels anti-CD63-PE markiert und die markierten Partikel in der Durchflusszytometrie gezählt.

Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Zunächst fällt auf, dass die Htt74Q-Expression bei allen Zelllinien zu einem Anstieg der detektierten extrazellulären Vesikel führt. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Zellen das pathologische Huntingtin nicht abbauen können und es demnach aus der Zelle ausgeschleust wird. Lee et al. wiesen nach, dass die Ausschüttung der extrazellulären Vesikel in Alzheimer Patienten ebenfalls erhöht ist (Lee et al. 2022). Dabei zeigt HR23B^{KO} eine etwas höhere und HR23A^{KO} und HR23B[↑] eine geringere relative Menge an extrazellulären Vesikeln im Vergleich zu ihren Kontrollzellen. Weiterhin wird ein Anstieg der extrazellulären Vesikel von Htt23Q-exprimierenden HR23B^{KO}-Zellen im Vergleich zu den Htt23Q-exprimierenden U2OS Zellen beobachtet. Die Anzahl der extrazellulären Vesikel von Htt74Q-exprimierenden HR23B[↑] Zellen ist hingegen mit der Anzahl der extrazellulären Vesikel von Htt23Q-exprimierenden HR23B[↑] Zellen vergleichbar. Die Expression des Proteasomshuttlingfaktors HR23B zeigte bereits unter 4.2.1 einen positiven Einfluss auf die Degradation des pathologischen Huntingtins, welcher für die geringere Ausschüttung von extrazellulären Vesikeln verantwortlich sein könnte.

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen des Dot Blots und der Durchflusszytometrie können möglicherweise damit begründet werden, dass im Dot Blot nur das CD63-Signal untersucht wurde, während in der Durchflusszytometrie die CD63-markierten Partikel gezählt wurden. Schließlich können die Vesikel auch eine unterschiedliche Menge an CD63 besitzen und deshalb ein unterschiedlich starkes Signal nachgewiesen werden (Lai et al. 2017).

Neben der Menge der ausgeschütteten Vesikel wurde ebenfalls der Huntingtingehalt im Überstand überprüft. Dazu wurde das Signal des gekoppelten GFPs im Überstand detektiert und auf das CD63-Signal bezogen (Abbildung 22). Dabei war ein Anstieg von Huntingtin im Überstand bei allen Zelllinien nachweisbar. Diese Beobachtungen machten auch Vicente Miranda et al. (Vicente Miranda et al. 2016). Caron et al. konnten das mutierte Huntingtin im Liquor cerebrospinalis nachweisen (Caron et al. 2021). Besonders auffällig ist jedoch der signifikante Anstieg von Huntingtin im Überstand der Htt74Q-exprimierenden HR23B^{KO} Zellen. HR23A^{KO} und HR23B[↑] zeigen hingegen keine Veränderungen gegenüber ihren Kontrollzelllinien.

Die bis hier gemachten Beobachtungen deuten darauf hin, dass pathologisches Huntingtin die Menge der extrazellulären Vesikel und den ausgeschütteten Huntingtingehalt erhöhen könnte. Dieser Effekt wird möglicherweise durch die Expression von HR23B beeinflusst. Jedoch muss beachtet werden, dass bisher nur der Überstand betrachtet wurde und nicht die aufgereinigten extrazellulären Vesikel. Aus diesem Grund wurden die extrazellulären Vesikel im nächsten Schritt isoliert und auf ihren Huntingtininhalt untersucht.

Die Aufreinigung erfolgte letztendlich mittels Ultrazentrifugation. Diese Methode ist immer noch Standard bei der Isolation der extrazellulären Vesikel (Brennan et al. 2020; Gardiner et al. 2016; Momen-Heravi et al. 2013) und unter anderem deshalb beliebt, weil die extrazellulären Vesikel nicht an andere Partikel gebunden werden. Der Nachweis erfolgte wieder über den Marker CD63. Dabei ist zu beachten, dass der Antikörper an die Disulfidbrücken bindet, welche durch Detergenzien wie β -Mercaptoethanol oder DTT aufgespalten werden. Demnach wurde das Protokoll entsprechend Kowal et al. angepasst (Kowal et al. 2017)).

Das CD63-Signal tritt nicht als distinkte Bande auf, da es viele posttranslationale Modifikationen aufweist (Engering et al. 2003). Dies wurde auch in anderen Publikationen beobachtet (El Buri et al. 2018; Hayashi et al. 2018; Yu et al. 2018; Shojaati et al. 2019; Le Gall et al. 2022). Die Färbung mit Ponceau S und anti-GFP waren leider nicht sensitiv genug für die geringen Proteinmengen, jedoch konnte die Behandlung mit anti-Htt Huntingtin in den extrazellulären Vesikeln der U2OS Zellen nachweisen (Abbildung 24). Demnach wurde im Folgenden auf die Ponceau S-Färbung verzichtet.

Die Expression von Huntingtin in den extrazellulären Vesikeln wurde ebenfalls in den Zelllinien HR23A^{KO}, HR23B^{KO}, Tre und HR23B \uparrow überprüft. Abbildung 25 zeigt dabei, dass Htt74Q in den extrazellulären Vesikeln von U2OS, HR23B^{KO}, Tre und HR23B \uparrow nachweisbar ist. Htt23Q wird ebenfalls in den extrazellulären Vesikeln von HR23B^{KO} und Tre exprimiert. Die extrazellulären Vesikel von U2OS Zellen zeigen in 50 % der Fälle eine Expression von Htt23Q, in den extrazellulären Vesikeln von HR23A^{KO} ist weder Htt74Q noch Htt23Q detektierbar.

Eine Quantifizierung der Ergebnisse über den Western Blot erwies sich als schwierig, da das CD63-Signal ein hohes Hintergrundsignal aufwies. Die Ponceau S-Färbung war hingegen nicht sensitiv genug und zeigte nur eine Bande in Höhe von circa 62 kDa, bei der es sich möglicherweise um BSA (66,5 kDa) aus dem FKS handeln könnte. Demnach erfolgte die Quantifizierung über die Durchflusszytometrie (Abbildung 26). Dabei konnte in allen Zelllinien ein Anstieg der Huntingtinexpression in den extrazellulären Vesikeln der Htt74Q-exprimierenden Zellen beobachtet werden. Dieser war in den extrazellulären Vesikeln der Htt74Q-exprimierenden HR23B^{KO} Zellen noch höher als in der Kontrolle. Die Überexpression von HR23B resultierte hingegen in eine signifikante Reduktion der Huntingtinexpression in den extrazellulären Vesikeln der Htt74Q-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den extrazellulären Vesikeln der Htt74Q-exprimierenden Tre Zellen ($p < 0,005$).

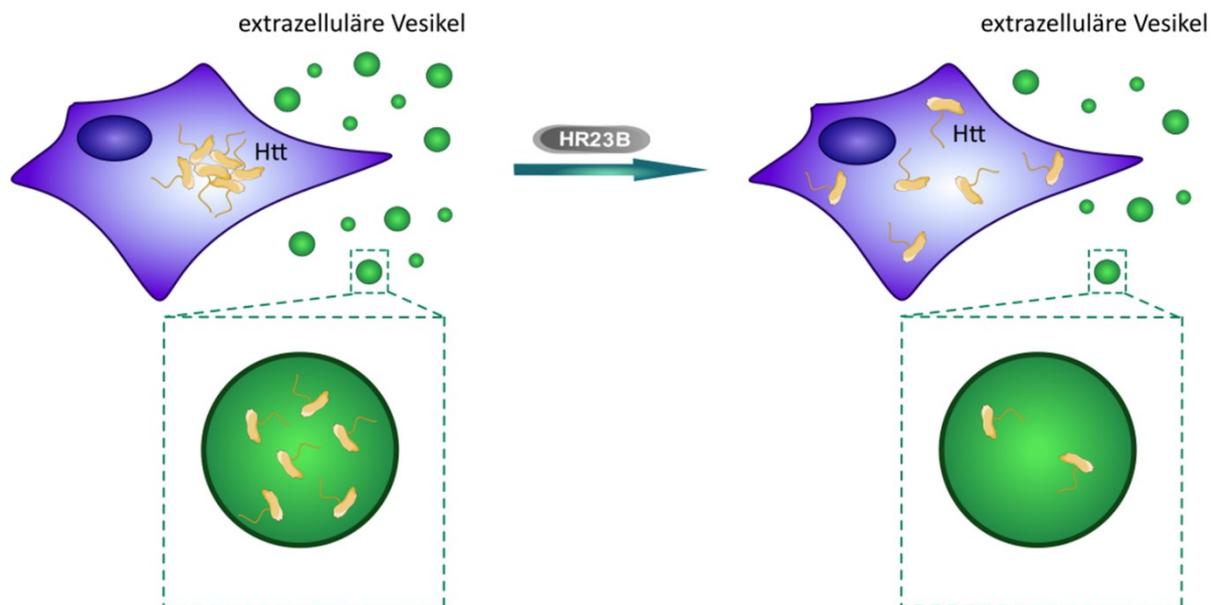


Abbildung 38: Schematische Darstellung des Einflusses von HR23B auf fehlgefaltetes Huntingtin und seine Ausschüttung in extrazellulären Vesikeln

Das fehlgefaltete Huntingtin (Htt) bildet Aggregate und resultiert in einer Ausschüttung von extrazellulären Vesikeln, welche Huntingtin enthalten. Durch eine Überexpression des Proteasomshuttlingfaktors HR23B ist das fehlgefaltete Huntingtin gleichmäßig in der Zelle verbreitet. Des Weiteren schütten die Zellen weniger extrazelluläre Vesikel aus und eine Reduktion von Huntingtin in den extrazellulären Vesikeln ist detektiert.

Anhand der Ergebnisse wird vermutet, dass der Knockout von HR23B zu einer höheren Ausschüttung von Huntingtin, möglicherweise einschließlich des nicht-pathologischen Htt23Q, führt, während die Überexpression von HR23B in einen reduzierten Huntingtingehalt in den extrazellulären Vesikeln resultiert (Abbildung 38). Dabei ist jedoch zu beachten, dass das *Tet-on* System allgemein einen Einfluss auf die Ausschüttung der extrazellulären Vesikel hat. So wurde zum Beispiel im Dot Blot weniger Volumen des Überstandes genommen, um eine zu starke Signalintensität auszuschließen und auch in den aufgereinigten extrazellulären Vesikeln konnte dies beobachtet werden. Eine vermehrte Ausschüttung von α -Synuclein in extrazellulären Vesikeln kann auch bei einer beeinträchtigten Autophagie beobachtet werden (Oh et al. 2022; Ejlerskov et al. 2013). Der Zusammenhang zwischen der vermehrten Ausschüttung von Huntingtin in extrazellulären Vesikeln durch den Knockout von HR23B ist möglicherweise auf die erhöhte Expression des Zytoskelettproteins TUBA4A, einiger Zytoskelett-assoziiierter Proteine (GSN, ARPC2, SPTBN1, SPTAN1, CAPZA2) sowie des Motorproteins MYO1B in HR23B^{KO} Zellen zurückzuführen, welche von Mai-Binh Nguyen in der Massenspektrometrie identifiziert wurden. Diese Proteine wurden von Xu et al. ebenfalls in extrazellulären Vesikeln erhöht vorgefunden (Xu et al. 2015). Interessanterweise wurden in HR23B^{KO} Zellen nur Proteine erhöht vorgefunden, die in den Mikrovesikeln auftraten, jedoch keine Proteine, die in den Exosomen von Xu et al. detektiert wurden.

Im nächsten Schritt sollte demnach untersucht werden, ob die Huntingtin-enthaltenen extrazellulären Vesikel vor allem Mikrovesikel oder Exosomen sind. Dazu wurden diese voneinander mittels Ultrazentrifugation getrennt und im Western Blot auf ihren Huntingtingehalt untersucht (Abbildung 30). Hierbei ist ersichtlich, dass Huntingtin nur in den Mikrovesikeln der untersuchten Zelllinien, jedoch nicht in den Exosomen auftaucht. Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt, sodass das Ergebnis erstmal nur einen ersten Hinweis liefert. Jedoch wurde publiziert, dass CD63 eher auf Mikrovesikeln vorhanden ist und CD81 eher auf den Exosomen (Barranco et al. 2019). Bei der Optimierung des Dot Blots für die Menge der extrazellulären Vesikel wurde der Nachweis mit beiden Antikörpern untersucht (Abbildung S9) und es wurden keine Unterschiede in der CD81-Expression zwischen den Exosomen der Huntingtin-exprimierenden Zellen und der Kontrolle festgestellt, was die Hypothese, dass Huntingtin über Mikrovesikel und nicht über Exosomen übertragen wird, unterstützt. Zur genaueren Untersuchung, ob Huntingtin nur in den Mikrovesikeln vorkommt, würde sich Calnexin statt CD63 als Marker eignen, da dieses nur auf den Mikrovesikeln, aber nicht auf den Exosomen, vorkommt (Haraszti et al. 2016; Mears et al. 2004).

Im Verlauf der Experimente fiel erneut auf, dass der Knockout von HR23A einen ähnlichen Effekt wie die Überexpression von HR23B aufwies. In Abbildung 21 ist beispielsweise eher eine Reduktion der Menge an extrazellulären Vesikeln beobachtbar, das Verhältnis von Huntingtin zu CD63 steigt im Überstand nicht wie beim Knockout von HR23B an (Abbildung 23) und in den extrazellulären Vesikeln selbst konnte kein Huntingtin nachgewiesen werden (Abbildung 25). Die möglichen Gründe wurden bereits unter 4.2.1 genauer beschrieben. Dazu zählt, dass HR23B unter physiologischen Bedingungen zehnfach stärker exprimiert ist und dies in den HR23A^{KO} Zellen nochmal verstärkt wird (Abbildung 6), da es die Funktionen von HR23A übernehmen kann (Sugasawa et al. 1997; Okuda et al. 2004; Ng et al. 2003; Chen und Madura 2006).

4.3.2 Einfluss der extrazellulären Vesikel auf das Immunsystem

Aus dem Gehirn stammende extrazelluläre Vesikel von Alzheimerpatienten zeigten neben einer erhöhten Konzentration von Tau weiterhin eine veränderte Expression der Oberflächenproteinen (Huang et al. 2022). Im Folgenden wurden die Oberflächenproteine der extrazellulären Vesikel in Abhängigkeit ihrer Huntingtinexpression und dem Gehalt an Proteasomshuttlingfaktoren auf Unterschiede analysiert und in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt. Dabei konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Oberflächenproteinen der extrazellulären Vesikel in Abhängigkeit der Huntingtinexpression oder der HR23A- bzw. HR23B-Expression detektiert werden, jedoch zeigten die extrazellulären Vesikel der HR23A^{KO} und Tre Zellen einen leichten Anstieg der Oberflächenproteine bei Htt20Q-Expression. Die Überexpression von HR23B resultierte hingegen in

einer geringen Reduktion der Oberflächenproteine in den Htt20Q-enhaltenen extrazellulären Vesikeln.

Für weitere Analysen der Auswirkungen von Huntingtin und HR23B auf die Immunantwort wurden zu M1-Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen mit extrazellulären Vesikeln behandelt und ihre Zytokinausschüttung detektiert. Mikroglia, welche im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielen, fungieren als Makrophagen (Bachiller et al. 2018). M1-Makrophagen sind proinflammatorisch, das heißt sie fördern Entzündungen. Dazu schütten sie unter anderem die Zytokine IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF und IL-12p70 aus und lösen somit eine Aktivierung des Immunsystems aus. Zur anschließenden Inaktivierung des Immunsystems werden von M2-Makrophagen antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10 ausgeschüttet (Yao et al. 2019). Die erfolgreiche Detektion von IL-8, IL-1 β , IL-6 und TNF und die Abwesenheit von IL-10 beweisen somit, dass die Differenzierung der THP-1 Zellen zu M1-Makrophagen erfolgreich verlief (Abbildung S11). Weiterhin konnte IL-12p70 nicht detektiert werden. Długosz et al. beobachteten eine vergleichsweise sehr schwache Expression von IL-12p70 in den THP-1 Zellen (Długosz et al. 2019).

IL-8 lag hingegen über der Detektionsgrenze, sodass zu diesem Zeitpunkt keine Aussage über die Veränderung von IL-8 getroffen werden kann. Tarique et al. zeigten ebenfalls, dass IL-8 am stärksten exprimiert wird (Tarique et al. 2015). Um Unterschiede zwischen den Huntingtin-enhaltenen extrazellulären Vesikeln der verschiedenen Zelllinien zu analysieren, müsste die Messung mit verdünnten Proben wiederholt werden.

Bei den detektierten Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abbildungen 29, 30 und 31). Tendenziell resultierte die Behandlung mit Htt74Q-enhaltenen extrazellulären Vesikeln von U2OS und HR23B^{KO} Zellen zu einem Anstieg der Zytokine im Vergleich zu der Behandlung mit Htt23Q-enhaltenen extrazellulären Vesikeln, wobei kein Unterschied zwischen den Zelllinien festgestellt werden konnte. Dies spricht dafür, dass pathologisches Huntingtin eher eine Immunantwort auslöst als physiologisches Huntingtin. Die Erhöhung der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF konnte auch bei der Untersuchung von Morbus Alzheimer in Patienten bzw. im Mausmodell (Halle et al. 2008; Hüll et al. 1996; Ou et al. 2021) und von Morbus Parkinson in Patienten (Leal et al. 2013; Sterling et al. 2022) beobachtet werden.

Die Htt74Q-enhaltenen extrazellulären Vesikel von HR23B \uparrow resultierten ebenfalls in eine höhere Zytokinausschüttung, als die Htt23Q-enhaltenen extrazellulären Vesikel. Interessanterweise führten die Htt74Q-enhaltenen extrazellulären Vesikel der Kontrollzelllinie Tre jedoch zu einer Reduktion der Zytokine im Vergleich zu den Htt23Q-enhaltenen extrazellulären Vesikeln, sodass ein Einfluss von HR23B auf die Immunantwort nicht endgültig ausgeschlossen werden kann.

Die Ergebnisse der Oberflächenproteine korrelieren mit denen der Zytokine. Die Unterschiede sind minimal und nicht signifikant, jedoch sind die gleichen Tendenzen beobachtbar. An dieser Stelle zeigt sich nochmal die Notwendigkeit der Verwendung von neuronalen Zellen. Diese zeigen, ob das pathologische Huntingtin wirklich keinen bzw. nur einen minimalen Einfluss auf die Immunantwort in den Patienten hat oder ob extrazelluläre Vesikel von nicht-neuronalen Zellen, wie die U2OS Zellen, eine geringere Immunantwort als die extrazellulären Vesikel von neuronalen Zellen auslösen. Demnach wäre die Behandlung mit körpereigenen, nicht-neuronalen extrazellulären Vesikeln ein spannender Therapieansatz. Eine ähnliche Anwendung wird auch für die Behandlung von Alzheimer in Betracht gezogen (Cone et al. 2021).

4.4 Bedeutung der Acetylierung für Huntingtin

4.4.1 Einfluss der Acetylierung auf das Aggregationsverhalten von Huntingtin in HR23B-überexprimierenden Zellen

Im Kontext von fehlgefalteten Proteinen und dem Abbau der Proteine werden posttranslationale Modifikationen zunehmend als wichtig erachtet (Olzscha 2019). Ein Teil des Proteinabbaus erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System (Hershko et al. 1981). Mit dem Proteasomshuttlingsfaktor HR23B, welches ubiquitinierte Proteine bindet und zum Proteasom weiterleitet, ist die Ubiquitinierung eine wichtige posttranslationale Modifikation für den Abbau der Protein über das Proteasom (Elsasser et al. 2004; Verma et al. 2004; Chen et al. 2001; Chen und Madura 2002). Das Protein Huntingtin hat drei Lysine im N-Terminus (K6, K9, K15), welche in den Huntingtinaggregaten ubiquitiniert auftreten können (Juenemann et al. 2015; Steffan et al. 2004). Eine dazu konkurrierende posttranslationale Modifikation ist die Acetylierung (Olzscha et al. 2017). Diese kann sowohl an der N^α-Aminogruppe des Proteins auftreten (Gottlieb et al. 2021), als auch an der N^ε-Aminogruppe der Lysine. Dabei wurde K9 als mögliche Acetylierungsstelle in der Massenspektrometrie identifiziert (Cong et al. 2011). Chiki et al. untersuchten den Einfluss der Acetylierung der einzelnen Lysinreste auf die Konformation von Huntingtin, konnten aber keinen statistisch signifikanten Effekt sehen. Sie konnten jedoch eine inhibierende Wirkung der Aggregation durch Phosphorylierung detektieren, welche durch die Acetylierung von K6 wieder kompensiert wird (Chiki et al. 2017). Der Einfluss der Acetylierung auf die Proteinfaltung wurde weiterhin bereits im Kontext anderer neurodegenerativer Erkrankungen beobachtet, zum Beispiel mit Tau (Cohen et al. 2011), A β (Adhikari et al. 2020) und α -Synuclein (Vinueza-Gavilanes et al. 2020).

Die Htt97Q-exprimierenden Tre Zellen zeigen unter Hyperacetylierung weiterhin die Bildung von perinukleären Aggregaten (Abbildung 33). Interessant ist ebenfalls, dass die hyperacetylierten HR23B-

überexprimierenden Zellen ebenfalls Htt97Q-Aggregate bildeten und nicht, wie in Abbildung 13 gezeigt, eine gleichmäßige Verteilung. Diese Beobachtung konnte durch die Quantifizierung bestätigt werden (Abbildung 34) und spricht dafür, dass die Acetylierung einen Einfluss auf die Fehlfaltung von Huntingtin hat, indem sie mit der Ubiquitinierung konkurriert oder die Proteinqualitätskontrolle durch die Hyperacetylierung überlastet ist und aus diesem Grund keine ausreichende proteolytische Kapazität für die Degradation des pathologischen Huntingtins zur Verfügung steht. Des Weiteren fällt auf, dass HR23B mit den Htt97Q-Aggregaten kolokalisiert ist. Diese Kolokalisation wurde bereits von Yang et al. in nicht-acetylierten HEK293T Zellen beobachtet (Yang et al. 2018). Daraus ergibt sich die Vermutung, dass HR23B weiterhin an den ubiquitinierten, nicht-acetylierten Lysinresten bindet und das mutierte Huntingtin zum Proteasom leiten will, jedoch dabei selbst aggregiert. Für eine detaillierte Analyse müsste die Acetylierung der Lysine von Huntingtin untersucht werden, da durch die Verwendung eines HDAC-Inhibitors das gesamte Proteom acetyliert ist und somit eine Aggregation durch andere Faktoren nicht ausgeschlossen werden kann.

4.4.2 Einfluss der Acetylierung auf das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis von HR23B-überexprimierenden Zellen

Da ein Charakteristikum der HR23B-überexprimierenden Zellen der Anstieg des Nukleus-Zytoplasma-Verhältnisses ist, sollte untersucht werden, ob dieses Merkmal auch von der Acetylierung beeinflusst wird (Abbildung 35). Durch die Hyperacetylierung ist auch eine Acetylierung der Histone denkbar, welche die DNS im Bereich des Chromatins auflockern und den Nukleus möglicherweise vergrößern (Jasencakova et al. 2000). Hierbei kann jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden, was bestätigt, dass das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis auch während der Proliferation konstant bleibt (Balachandra et al. 2022).

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Aggregation von pathologischem Huntingtin gezeigt werden, welche bei der Überexpression des Proteasomshuttlingfaktors HR23B nicht mehr auftrat (4.2.1). Damit ist HR23B interessant für die Therapie von Chorea Huntington. Neben der Applikation von HR23B-enthaltenen Medikamenten ist auch die Anregung eines endogenen HR23B-Anstiegs in Betracht zu ziehen. Dazu bedarf es jedoch weitere Untersuchungen des genauen Mechanismus, über den die Aggregation von Huntingtin durch HR23B verhindert wird.

Als erstes bietet sich an, eine mögliche Bindung von HR23B an Huntingtin über eine Co-Immunitätspräzipitation nachzuweisen. Auch eine Analyse von Huntingtin bei unterschiedlicher HR23B-Expression in der Kryo-Elektronenmikroskopie könnte mehr Aufschluss über die Interaktion zwischen Huntingtin und HR23B geben. Da bekannt ist, dass HR23B nicht nur an das Proteasom bindet, sondern es auch aktiviert (Collins und Goldberg 2020), wäre eine Messung der Proteasomaktivität ebenfalls von Interesse für die Aufklärung des Mechanismus. Des Weiteren könnte die HR23B-Expression in einzelnen Hirnregionen untersucht werden. Jensen et al. konnten bereits in Alzheimerpatienten zeigen, dass die von der Neurodegeneration geringsten betroffenen Regionen die höchste HR23B-Expression aufwiesen (Jensen et al. 2018).

Da HR23A und HR23B ihre Funktionen gegenseitig übernehmen können (Sugasawa et al. 1997; Okuda et al. 2004; Ng et al. 2003; Chen und Madura 2006), wären weitere Experimente mit HR23A-überexprimierenden und den generierten Doppelknockoutzellen ebenfalls interessant, wichtiger ist jedoch die Wiederholung der Versuche in neuronalen Zellen, welche ein besseres Modellsystem für die neurodegenerative Erkrankung Chorea Huntington darstellen. In diesem Kontext ist es ebenfalls möglich die Altersabhängigkeit von Chorea Huntington weiter zu untersuchen, indem seneszierende Zellen im Vergleich zu jüngeren Zellen analysiert werden.

In dem Projekt wurde außerdem eine vermehrte Ausschüttung von extrazellulären Vesikeln durch Zellen, welche pathologisches Huntingtin exprimieren, beobachtet. Diese wurde durch die Überexpression von HR23B neutralisiert (4.3.1). Neben dem bereits untersuchten Huntingtingehalt und der Analyse der Oberflächenproteine ist ein Vergleich der in den Vesikeln enthaltenen Proteine mittels Massenspektrometrie für die Ausbreitung der Erkrankung im Gehirn von Interesse. Dabei wäre weiterhin interessant zu untersuchen, ob andere Zellen die extrazellulären Vesikel aufnehmen und das pathologische Huntingtin anschließend selbst exprimieren. Die extrazellulären Vesikel stellen damit einen potentiellen Biomarker dar, der Aufschluss über einen Therapieerfolg geben könnte.

Die Behandlung von Makrophagen mit den extrazellulären Vesikeln zeigte eine etwas erhöhte Immunantwort durch das pathologische Huntingtin (4.3.2). Hier verdeutlicht sich erneut die Notwendigkeit des Vergleichs mit neuronalen Zellen. Dabei würden als Immunzellen Mikroglia infrage kommen, welche eine wichtige Rolle im Immunsystem des Gehirns übernehmen (Bachiller et al. 2018). Wenn sich der Anstieg der Immunantwort mit neuronalen Zellen bestätigt, könnte eine gezielte Inhibition des Immunsystems als Therapieansatz in Betrachtung gezogen werden. Bei einer stärkeren Immunantwort in einem neuronalen System wäre auch eine Behandlung mit körpereigenen extrazellulären Vesikeln erwägenswert. Diese Therapiemöglichkeit wird derzeit auch für Morbus Alzheimer untersucht (Cone et al. 2021).

6 Zusammenfassung

Altersbedingte neurodegenerative Erkrankungen, wie Chorea Huntington, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, sind durch die Bildung von Aggregaten aus fehlgefalteten Proteinen charakterisiert. Beispielsweise verursacht das fehlgefaltete Protein Huntingtin Chorea Huntington. Das pathologische Huntingtin enthält im Gegensatz zum physiologischen Protein mindestens 36 Glutaminreste. Fehlgefaltete Proteine können unter anderem über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden. Proteasomshuttlingfaktoren, wie HR23A und HR23B, erkennen dabei ubiquitinierte, fehlgefaltete Proteine und leiten sie zu dem Proteasom weiter.

Die Aggregation des pathologisch verlängerten Huntingtins mit unterschiedlicher Anzahl an Glutaminresten konnte im Western Blot, im Filterretardationsassay sowie in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Anschließend wurde der Einfluss von überexprimiertem HR23B auf die Huntingtinaggregate untersucht. Dabei konnte eine Reduktion der Anzahl der Huntingtinaggregate beobachtet werden, die möglicherweise auf einen vermehrten Transport der fehlgefalteten Proteine zum Proteasom durch den Proteasomshuttlingfaktor HR23B zurückzuführen ist. Dieser Effekt wurde durch eine Hyperacetylierung des Proteoms inhibiert.

Die Ausbreitung der fehlgefalteten Proteine im Gehirn korreliert mit der Progression der neurodegenerativen Erkrankungen, wobei bis heute jedoch nicht abschließend geklärt ist, wie diese erfolgt. Dabei wird der Transport der pathologischen Proteine über extrazelluläre Vesikel in Betracht gezogen. In der vorliegenden Arbeit konnte das pathologische Huntingtin in extrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden. Dieses war durch den Knockout von HR23B tendenziell erhöht, während die Überexpression von HR23B zu einer Reduktion des pathologischen Huntingtins in den extrazellulären Vesikeln führte. Weiterhin wurden durch die Expression von pathologischem Huntingtin mehr extrazelluläre Vesikel ausgeschüttet, wobei die Überexpression von HR23B in einer vergleichbaren Menge wie die physiologische Kontrolle resultierte.

Da extrazelluläre Vesikel in der Lage sind Immunantworten auszulösen, wurden die Oberflächenproteine der extrazellulären Vesikel, sowie die durch die extrazellulären Vesikel induzierte Zytokinausschüttung von Immunzellen genauer analysiert. Es zeigte sich ein leichter Anstieg der Immunantwort durch das pathologische Huntingtin.

Zusammenfassend konnte ein positiver Einfluss der HR23B Expression auf die Aggregation und die Ausschüttung von pathologischem Huntingtin nachgewiesen werden, welcher zur therapeutischen Anwendung weiter analysiert werden muss.

7 Abstract

Age-related neurodegenerative diseases like Huntington's Disease, Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease are characterized by the aggregation of misfolded proteins. For example, the pathologically elongated protein huntingtin misfolds and causes Huntington's Disease. The pathological huntingtin contains instead of the physiological huntingtin at least 36 glutamine repeats. Misfolded proteins can be degraded by the ubiquitin proteasome system. During this process, proteasome shuttling factors like HR23A and HR23B recognize ubiquitinated, misfolded proteins and guide them to the proteasome.

The aggregation of pathologically elongated huntingtin containing different numbers of glutamine residues was verified by western blot, filter retardation assay and immune fluorescence microscopy. Afterwards, the impact of overexpressed HR23B on huntingtin aggregates was analysed and showed a reduced number of aggregates. This may attribute to an increased transport of misfolded huntingtin to the proteasome and was reversed by hyperacetylation of the proteome.

The distribution of the misfolded proteins correlates with the progression of the neurodegenerative diseases but has not been fully elucidated to date. However, one hypothesis claims a transport of the pathological proteins via extracellular vesicles. In this project, the pathological huntingtin could be detected in extracellular vesicles. The knockout of HR23B resulted in an increase of the huntingtin content while the overexpression of HR23B lead to a reduction of the pathological huntingtin in extracellular vesicles.

Extracellular vesicles are able to activate an immune response. Therefore, the surface proteins of the extracellular vesicles as well as the induced cytokine release of immune cells were analysed. A slight increase of the immune response due to pathological huntingtin could be detected.

In conclusion, HR23B expression has a positive effect on the aggregation and distribution of pathological huntingtin, which has to be investigated further for therapeutic application.

Literaturverzeichnis

- Adhikari, Rashmi; Yang, Mu; Saikia, Nabanita; Dutta, Colina; Alharbi, Wafa F. A.; Shan, Zhiying et al. (2020): Acetylation of A β 42 at Lysine 16 Disrupts Amyloid Formation. In: *ACS chemical neuroscience* 11 (8), S. 1178–1191. DOI: 10.1021/acscemneuro.0c00069.
- Agostinho, Luciana de A.; Rocha, Catielly F.; Medina-Acosta, Enrique; Barboza, Hazel N.; da Silva, Antônio F. Alves; Pereira, Simão P. F. et al. (2012): Haplotype analysis of the CAG and CCG repeats in 21 Brazilian families with Huntington's disease. In: *Journal of human genetics* 57 (12), S. 796–803. DOI: 10.1038/jhg.2012.120.
- Alzheimer, A. (1906): Über einen eigenartigen schweren Er Krankungsprozeb der Hirnrinde. In: *Neurologisches Centralblatt* 23, S. 1129–1136. Online verfügbar unter <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571135650732510208>.
- Ambrose, Christine M.; Duyao, Mabel P.; Barnes, Glenn; Bates, Gillian P.; Lin, Carol S.; Srinidhi, Jayalakshmi et al. (1994): Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. In: *Somatic cell and molecular genetics* 20 (1), S. 27–38. DOI: 10.1007/BF02257483.
- Ananbeh, Hanadi; Novak, Jaromir; Juhas, Stefan; Juhasova, Jana; Klempir, Jiri; Doleckova, Kristyna et al. (2022): Huntingtin Co-Isolates with Small Extracellular Vesicles from Blood Plasma of TgHD and KI-HD Pig Models of Huntington's Disease and Human Blood Plasma. In: *International journal of molecular sciences* 23 (10). DOI: 10.3390/ijms23105598.
- Anfinsen, C. B.; Redfield, R. R.; Choate, W. L.; Page, J.; Carroll, W.R (1954): Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. In: *Journal of Biological Chemistry* 207 (1), S. 201–210.
- Apraiz, Aintzane; Mitxelena, Jone; Zubiaga, Ana (2017): Studying Cell Cycle-regulated Gene Expression by Two Complementary Cell Synchronization Protocols. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (124). DOI: 10.3791/55745.
- Arndt, T. (2018): Lambert-Beer-Gesetz. In: Axel M. Gressner und Torsten Arndt (Hg.): *Lexikon der medizinischen laboratoriumsdiagnostik*: Springer (Springer Reference Medizin), S. 1432–1433.
- Aronin, N.; Chase, K.; Young, C.; Sapp, E.; Schwarz, C.; Matta, N. et al. (1995): CAG expansion affects the expression of mutant Huntingtin in the Huntington's disease brain. In: *Neuron* 15 (5), S. 1193–1201. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90106-x.

- Bachiller, Sara; Jiménez-Ferrer, Itzia; Paulus, Agnes; Yang, Yiyi; Swanberg, Maria; Deierborg, Tomas; Boza-Serrano, Antonio (2018): Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 12, S. 488. DOI: 10.3389/fncel.2018.00488.
- Bailus, Barbara J.; Scheeler, Stephen M.; Simons, Jesse; Sanchez, Maria A.; Tshilenge, Kizito-Tshitoko; Creus-Muncunill, Jordi et al. (2021): Modulating FKBP5/FKBP51 and autophagy lowers HTT (huntingtin) levels. In: *Autophagy* 17 (12), S. 4119–4140. DOI: 10.1080/15548627.2021.1904489.
- Balachandra, Shruthi; Sarkar, Sharanya; Amodeo, Amanda A. (2022): The Nuclear-to-Cytoplasmic Ratio: Coupling DNA Content to Cell Size, Cell Cycle, and Biosynthetic Capacity. In: *Annual review of genetics* 56, S. 165–185. DOI: 10.1146/annurev-genet-080320-030537.
- Barbaro, Brett A.; Lukacsovich, Tamas; Agrawal, Namita; Burke, John; Bornemann, Doug J.; Purcell, Judith M. et al. (2015): Comparative study of naturally occurring huntingtin fragments in *Drosophila* points to exon 1 as the most pathogenic species in Huntington's disease. In: *Human molecular genetics* 24 (4), S. 913–925. DOI: 10.1093/hmg/ddu504.
- Barranco, Isabel; Padilla, Lorena; Parrilla, Inmaculada; Álvarez-Barrientos, Alberto; Pérez-Patiño, Cristina; Peña, Fernando J. et al. (2019): Extracellular vesicles isolated from porcine seminal plasma exhibit different tetraspanin expression profiles. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 11584. DOI: 10.1038/s41598-019-48095-3.
- Baxter, E. W.; Graham, A. E.; Re, N. A.; Carr, I. M.; Robinson, J. I.; Mackie, S. L.; Morgan, A. W. (2020): Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. In: *Journal of immunological methods* 478, S. 112721. DOI: 10.1016/j.jim.2019.112721.
- Bebelman, Maarten P.; Bun, Philippe; Huveneers, Stephan; van Niel, Guillaume; Pegtel, D. Michiel; Verweij, Frederik J. (2020): Real-time imaging of multivesicular body-plasma membrane fusion to quantify exosome release from single cells. In: *Nature protocols* 15 (1), S. 102–121. DOI: 10.1038/s41596-019-0245-4.
- Bence, N. F.; Sampat, R. M.; Kopito, R. R. (2001): Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. In: *Science (New York, N.Y.)* 292 (5521), S. 1552–1555. DOI: 10.1126/science.292.5521.1552.
- Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Gatto, Gregory J.; Stryer, Lubert (2018): Stryer Biochemie. 8. Auflage. Berlin: Springer Spektrum (SpringerLink Bücher).

- Beswick, Richard W.; Ambrose, Helen E.; Wagner, Simon D. (2006): Nocodazole, a microtubule depolymerising agent, induces apoptosis of chronic lymphocytic leukaemia cells associated with changes in Bcl-2 phosphorylation and expression. In: *Leukemia research* 30 (4), S. 427–436. DOI: 10.1016/j.leukres.2005.08.009.
- Biedler, J. L.; Helson, L.; Spengler, B. A. (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. In: *Cancer research* 33 (11), S. 2643–2652.
- Blajeski, April L.; Phan, Vy A.; Kottke, Timothy J.; Kaufmann, Scott H. (2002): G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. In: *The Journal of clinical investigation* 110 (1), S. 91–99. DOI: 10.1172/JCI13275.
- Blumenstock, Sonja; Dudanova, Irina (2020): Cortical and Striatal Circuits in Huntington's Disease. In: *Frontiers in neuroscience* 14, S. 82. DOI: 10.3389/fnins.2020.00082.
- Bode, Nadine J.; Darwin, K. Heran (2014): The Pup-Proteasome System of Mycobacteria. In: *Microbiology spectrum* 2 (5). DOI: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0008-2013.
- Borges, F. T.; Reis, L. A.; Schor, N. (2013): Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 46 (10), S. 824–830. DOI: 10.1590/1414-431X20132964.
- Bowman, Aaron B.; Yoo, Seung-Yun; Dantuma, Nico P.; Zoghbi, Huda Y. (2005): Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. In: *Human molecular genetics* 14 (5), S. 679–691. DOI: 10.1093/hmg/ddi064.
- Brás, Inês C.; Khani, Mohammad H.; Vasili, Eftychia; Möbius, Wiebke; Riedel, Dietmar; Parfentev, Iwan et al. (2022): Molecular Mechanisms Mediating the Transfer of Disease-Associated Proteins and Effects on Neuronal Activity. In: *Journal of Parkinson's disease* 12 (8), S. 2397–2422. DOI: 10.3233/JPD-223516.
- Bravo-Arredondo, Jose M.; Kegulian, Natalie C.; Schmidt, Thomas; Pandey, Nitin K.; Situ, Alan J.; Ulmer, Tobias S.; Langen, Ralf (2018): The folding equilibrium of huntingtin exon 1 monomer depends on its polyglutamine tract. In: *The Journal of biological chemistry* 293 (51), S. 19613–19623. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004808.
- Brennan, K.; Martin, K.; FitzGerald, S. P.; O'Sullivan, J.; Wu, Y.; Blanco, A. et al. (2020): A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 1039. DOI: 10.1038/s41598-020-57497-7.

- Brown, Melissa A.; Wallace, Charles S.; Anamelechi, Charles C.; Clermont, Edward; Reichert, William M.; Truskey, George A. (2007): The use of mild trypsinization conditions in the detachment of endothelial cells to promote subsequent endothelialization on synthetic surfaces. In: *Biomaterials* 28 (27), S. 3928–3935. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.05.009.
- Budnik, Vivian; Ruiz-Cañada, Catalina; Wendler, Franz (2016): Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. In: *Nat Rev Neurosci* 17 (3), S. 160–172. DOI: 10.1038/nrn.2015.29.
- Bufalino, Mary Rose; van der Kooy, Derek (2014): The aggregation and inheritance of damaged proteins determines cell fate during mitosis. In: *Cell Cycle* 13 (7), S. 1201–1207. DOI: 10.4161/cc.28106.
- Buzas, Edit I. (2022): The roles of extracellular vesicles in the immune system. In: *Nature reviews. Immunology*, S. 1–15. DOI: 10.1038/s41577-022-00763-8.
- Canene-Adams, Kirstie (2013): General PCR. In: *Methods in enzymology* 529, S. 291–298. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00024-0.
- Capiluppi, Elisa; Romano, Luca; Rebor, Paola; Nanetti, Lorenzo; Castaldo, Anna; Gellera, Cinzia et al. (2020): Late-onset Huntington's disease with 40–42 CAG expansion. In: *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 41 (4), S. 869–876. DOI: 10.1007/s10072-019-04177-8.
- Caron, Nicholas S.; Banos, Raul; Yanick, Christopher; Aly, Amirah E.; Byrne, Lauren M.; Smith, Ethan D. et al. (2021): Mutant Huntingtin Is Cleared from the Brain via Active Mechanisms in Huntington Disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 41 (4), S. 780–796. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1865-20.2020.
- Caron, Nicholas S.; Wright, Galen E. B.; Hayden, Michael R. (1993): GeneReviews®. Huntington Disease. Hg. v. Margaret P. Adam, David B. Everman, Ghayda M. Mirzaa, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora J. H. Bean, et al. Seattle (WA).
- Ceccon, Alberto; Tugarinov, Vitali; Torricella, Francesco; Clore, G. Marius (2022): Quantitative NMR analysis of the kinetics of pre-nucleation oligomerization and aggregation of pathogenic huntingtin exon-1 protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (29), e2207690119. DOI: 10.1073/pnas.2207690119.
- Chaudhuri, Tapan K.; Paul, Subhankar (2006): Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. In: *The FEBS journal* 273 (7), S. 1331–1349. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05181.x.

- Chen, Guo; Deng, Xingming (2018): Cell Synchronization by Double Thymidine Block. In: *Bio-protocol* 8 (17). DOI: 10.21769/BioProtoc.2994.
- Chen, L.; Shinde, U.; Ortolan, T. G.; Madura, K. (2001): Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. In: *EMBO reports* 2 (10), S. 933–938. DOI: 10.1093/embo-reports/kve203.
- Chen, Li; Kashina, Anna (2021): Post-translational Modifications of the Protein Termini. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 719590. DOI: 10.3389/fcell.2021.719590.
- Chen, Li; Madura, Kiran (2002): Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. In: *Molecular and cellular biology* 22 (13), S. 4902–4913. DOI: 10.1128/MCB.22.13.4902-4913.2002.
- Chen, Li; Madura, Kiran (2006): Evidence for distinct functions for human DNA repair factors hHR23A and hHR23B. In: *FEBS letters* 580 (14), S. 3401–3408. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.05.012.
- Chen, Yujie; Zhou, Dandan; Yao, Yinan; Sun, Yutong; Yao, Fan; Ma, Li (2022): Monoubiquitination in Homeostasis and Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 23 (11). DOI: 10.3390/ijms23115925.
- Chiki, Anass; DeGuire, Sean M.; Ruggeri, Francesco S.; Sanfelice, Domenico; Ansaloni, Annalisa; Wang, Zhe-Ming et al. (2017): Mutant Exon1 Huntingtin Aggregation is Regulated by T3 Phosphorylation-Induced Structural Changes and Crosstalk between T3 Phosphorylation and Acetylation at K6. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 56 (19), S. 5202–5207. DOI: 10.1002/anie.201611750.
- Chiti, Fabrizio; Dobson, Christopher M. (2006): Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. In: *Annual review of biochemistry* 75, S. 333–366. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
- Chong, Zhi Xiong; Yeap, Swee Keong; Ho, Wan Yong (2021): Transfection types, methods and strategies: a technical review. In: *PeerJ* 9, e11165. DOI: 10.7717/peerj.11165.
- Choudhary, Chunaram; Kumar, Chanchal; Gnad, Florian; Nielsen, Michael L.; Rehman, Michael; Walther, Tobias C. et al. (2009): Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. In: *Science (New York, N.Y.)* 325 (5942), S. 834–840. DOI: 10.1126/science.1175371.
- Chowdhury, Maisha; Enenkel, Cordula (2015): Intracellular Dynamics of the Ubiquitin-Proteasome-System. In: *F1000Research* 4, S. 367. DOI: 10.12688/f1000research.6835.2.

- Cicchetti, Francesca; Lacroix, Steve; Cisbani, Giulia; Vallières, Nicolas; Saint-Pierre, Martine; St-Amour, Isabelle et al. (2014): Mutant huntingtin is present in neuronal grafts in Huntington disease patients. In: *Annals of neurology* 76 (1), S. 31–42. DOI: 10.1002/ana.24174.
- Cohen, Todd J.; Guo, Jing L.; Hurtado, David E.; Kwong, Linda K.; Mills, Ian P.; Trojanowski, John Q.; Lee, Virginia M. Y. (2011): The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. In: *Nature communications* 2, S. 252. DOI: 10.1038/ncomms1255.
- Collins, Galen A.; Goldberg, Alfred L. (2020): Proteins containing ubiquitin-like (Ubl) domains not only bind to 26S proteasomes but also induce their activation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (9), S. 4664–4674. DOI: 10.1073/pnas.1915534117.
- Cone, Allaura S.; Yuan, Xuegang; Sun, Li; Duke, Leanne C.; Vreones, Michael P.; Carrier, Allison N. et al. (2021): Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate Alzheimer's disease-like phenotypes in a preclinical mouse model. In: *Theranostics* 11 (17), S. 8129–8142. DOI: 10.7150/thno.62069.
- Cong, Xin; Held, Jason M.; DeGiacomo, Francesco; Bonner, Akilah; Chen, Jan Marie; Schilling, Birgit et al. (2011): Mass spectrometric identification of novel lysine acetylation sites in huntingtin. In: *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 10 (10), M111.009829. DOI: 10.1074/mcp.M111.009829.
- Costanzo, Maddalena; Abounit, Saïda; Marzo, Ludovica; Danckaert, Anne; Chamoun, Zeina; Roux, Pascal; Zurzolo, Chiara (2013): Transfer of polyglutamine aggregates in neuronal cells occurs in tunneling nanotubes. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 16), S. 3678–3685. DOI: 10.1242/jcs.126086.
- Crescitelli, Rossella; Lässer, Cecilia; Szabó, Tamas G.; Kittel, Agnes; Eldh, Maria; Dianzani, Irma et al. (2013): Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. In: *Journal of extracellular vesicles* 2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20677.
- Creutzfeldt, Hans Gerhard (1920): Über eine eigenartige herdförmige erkrankung des zentralnervensystems (Vorläufige mitteilung). In: *Z. f. d. g. Neur. u. Psych.* 57 (1), S. 1–18. DOI: 10.1007/BF02866081.
- Das, Atze T.; Tenenbaum, Liliane; Berkhout, Ben (2016): Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. In: *Current gene therapy* 16 (3), S. 156–167. DOI: 10.2174/1566523216666160524144041.
- Daugaard, Mads; Rohde, Mikkel; Jäättelä, Marja (2007): The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. In: *FEBS letters* 581 (19), S. 3702–3710. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.039.

- Dee, Derek R.; Woodside, Michael T. (2016): Comparing the energy landscapes for native folding and aggregation of PrP. In: *Prion* 10 (3), S. 207–220. DOI: 10.1080/19336896.2016.1173297.
- Deroover, J.; Baro, F.; Bourguignon, R. P.; Smets, P. (1984): Tiapride versus placebo: a double-blind comparative study in the management of Huntington's chorea. In: *Current medical research and opinion* 9 (5), S. 329–338. DOI: 10.1185/03007998409109601.
- Deutsche Huntington-Hilfe e.V. | Leben mit der Huntington-Krankheit (2023). Online verfügbar unter <https://www.dhh-ev.de/>, zuletzt aktualisiert am 05.02.2023, zuletzt geprüft am 05.02.2023.
- Di Wu; Yan, Junhong; Shen, Xia; Sun, Yu; Thulin, Måns; Cai, Yanling et al. (2019): Profiling surface proteins on individual exosomes using a proximity barcoding assay. In: *Nature communications* 10 (1), S. 3854. DOI: 10.1038/s41467-019-11486-1.
- Díaz-Hernández, Miguel; Hernández, Félix; Martín-Aparicio, Ester; Gómez-Ramos, Pilar; Morán, María A.; Castaño, José G. et al. (2003): Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (37), S. 11653–11661. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-37-11653.2003.
- Díaz-Hernández, Miguel; Moreno-Herrero, Fernando; Gómez-Ramos, Pilar; Morán, María A.; Ferrer, Isidro; Baró, Arturo M. et al. (2004): Biochemical, ultrastructural, and reversibility studies on huntingtin filaments isolated from mouse and human brain. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (42), S. 9361–9371. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2365-04.2004.
- Dietrich, Paula; Johnson, Irudayam Maria; Alli, Shanta; Dragatsis, Ioannis (2017): Elimination of huntingtin in the adult mouse leads to progressive behavioral deficits, bilateral thalamic calcification, and altered brain iron homeostasis. In: *PLoS genetics* 13 (7), e1006846. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006846.
- DiFiglia, M.; Sapp, E.; Chase, K. O.; Davies, S. W.; Bates, G. P.; Vonsattel, J. P.; Aronin, N. (1997): Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5334), S. 1990–1993. DOI: 10.1126/science.277.5334.1990.
- Długosz, Ewa; Basała, Katarzyna; Zawistowska-Deniziak, Anna (2019): Cytokine production and signalling in human THP-1 macrophages is dependent on *Toxocara canis* glycans. In: *Parasitology research* 118 (10), S. 2925–2933. DOI: 10.1007/s00436-019-06405-8.
- Dobson, C. M.; Ellis, R. J. (1998): Protein folding and misfolding inside and outside the cell. In: *The EMBO journal* 17 (18), S. 5251–5254. DOI: 10.1093/emboj/17.18.5251.

- Dogan, Ahmet (2017): Amyloidosis: Insights from Proteomics. In: *Annual review of pathology* 12, S. 277–304. DOI: 10.1146/annurev-pathol-052016-100200.
- Duyao, M.; Ambrose, C.; Myers, R.; Novelletto, A.; Persichetti, F.; Frontali, M. et al. (1993): Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. In: *Nature genetics* 4 (4), S. 387–392. DOI: 10.1038/ng0893-387.
- Ecroyd, Heath; Sarradin, Pierre; Dacheux, Jean-Louis; Gatti, Jean-Luc (2004): Compartmentalization of prion isoforms within the reproductive tract of the ram. In: *Biology of reproduction* 71 (3), S. 993–1001. DOI: 10.1095/biolreprod.104.029801.
- Ejlerskov, Patrick; Rasmussen, Izabela; Nielsen, Troels Tolstrup; Bergström, Ann-Louise; Tohyama, Yumi; Jensen, Poul Henning; Vilhardt, Frederik (2013): Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25 α) promotes unconventional secretion of α -synuclein through exophagy by impairing autophagosome-lysosome fusion. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (24), S. 17313–17335. DOI: 10.1074/jbc.M112.401174.
- El Buri, Ashref; Adams, David R.; Smith, Douglas; Tate, Rothwelle J.; Mullin, Margaret; Pyne, Susan; Pyne, Nigel J. (2018): The sphingosine 1-phosphate receptor 2 is shed in exosomes from breast cancer cells and is N-terminally processed to a short constitutively active form that promotes extracellular signal regulated kinase activation and DNA synthesis in fibroblasts. In: *Oncotarget* 9 (50), S. 29453–29467. DOI: 10.18632/oncotarget.25658.
- Elsasser, Suzanne; Chandler-Militello, Devin; Müller, Britta; Hanna, John; Finley, Daniel (2004): Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (26), S. 26817–26822. DOI: 10.1074/jbc.M404020200.
- Emmanouilidou, Evangelia; Melachroinou, Katerina; Roumeliotis, Theodoros; Garbis, Spiros D.; Ntzouni, Maria; Margaritis, Lukas H. et al. (2010): Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (20), S. 6838–6851. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010.
- Engering, Anneke; Kuhn, Lotte; Fluitsma, Donna; Hoefsmit, Elisabeth; Pieters, Jean (2003): Differential post-translational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells. In: *European journal of biochemistry* 270 (11), S. 2412–2420. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03609.x.
- Essa, Musthafa Mohamed; Moghadas, Marzieh; Ba-Omar, Taher; Walid Qoronfleh, M.; Guillemin, Gilles J.; Manivasagam, Thamilarasan et al. (2019): Protective Effects of Antioxidants in Huntington's

- Disease: an Extensive Review. In: *Neurotoxicity research* 35 (3), S. 739–774. DOI: 10.1007/s12640-018-9989-9.
- Estevez-Fraga, Carlos; Tabrizi, Sarah J.; Wild, Edward J. (2022): Huntington's Disease Clinical Trials Corner: November 2022. In: *Journal of Huntington's disease* 11 (4), S. 351–367. DOI: 10.3233/JHD-229006.
- Fassler, Jan S.; Skuodas, Sydney; Weeks, Daniel L.; Phillips, Bryan T. (2021): Protein Aggregation and Disaggregation in Cells and Development. In: *Journal of molecular biology* 433 (21), S. 167215. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167215.
- Fevrier, Benoit; Vilette, Didier; Archer, Fabienne; Loew, Damarys; Faigle, Wolfgang; Vidal, Michel et al. (2004): Cells release prions in association with exosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26), S. 9683–9688. DOI: 10.1073/pnas.0308413101.
- Fischer, Emil (1902): Autoreferat. In: *Chem. Ztg.* 26:93.
- Foroud, T.; Gray, J.; Ivashina, J.; Conneally, P. M. (1999): Differences in duration of Huntington's disease based on age at onset. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 66 (1), S. 52–56. DOI: 10.1136/jnnp.66.1.52.
- Froger, Alexandrine; Hall, James E. (2007): Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (6), S. 253. DOI: 10.3791/253.
- Fu, Xian; Liu, Rui; Sanchez, Iona; Silva-Sanchez, Cecilia; Hepowit, Nathaniel L.; Cao, Shiyun et al. (2016): Ubiquitin-Like Proteasome System Represents a Eukaryotic-Like Pathway for Targeted Proteolysis in Archaea. In: *mBio* 7 (3). DOI: 10.1128/mBio.00379-16.
- Gabrielli, Martina; Prada, Ilaria; Joshi, Pooja; Falcicchia, Chiara; D'Arrigo, Giulia; Rutigliano, Grazia et al. (2022): Microglial large extracellular vesicles propagate early synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. In: *Brain* 145 (8), S. 2849–2868. DOI: 10.1093/brain/awac083.
- Garcia-Martin, Ruben; Brandao, Bruna Brasil; Thomou, Thomas; Altindis, Emrah; Kahn, C. Ronald (2022): Tissue differences in the exosomal/small extracellular vesicle proteome and their potential as indicators of altered tissue metabolism. In: *Cell reports* 38 (3), S. 110277. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.110277.
- Gardiner, Chris; Di Vizio, Dolores; Sahoo, Susmita; Théry, Clotilde; Witwer, Kenneth W.; Wauben, Marca; Hill, Andrew F. (2016): Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. In: *Journal of extracellular vesicles* 5, S. 32945. DOI: 10.3402/jev.v5.32945.

- Gediya, Lalji K.; Chopra, Pankaj; Purushottamachar, Puranik; Maheshwari, Neha; Njar, Vincent C. O. (2005): A new simple and high-yield synthesis of suberoylanilide hydroxamic acid and its inhibitory effect alone or in combination with retinoids on proliferation of human prostate cancer cells. In: *Journal of medicinal chemistry* 48 (15), S. 5047–5051. DOI: 10.1021/jm058214k.
- Ghosh, Rhia; Wood-Kaczmar, Alison; Dobson, Lucianne; Smith, Edward J.; Sirinathsinghji, Eva C.; Kriston-Vizi, Janos et al. (2020): Expression of mutant exon 1 huntingtin fragments in human neural stem cells and neurons causes inclusion formation and mitochondrial dysfunction. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (6), S. 8139–8154. DOI: 10.1096/fj.201902277RR.
- Gidalevitz, Tali; Ben-Zvi, Anat; Ho, Kim H.; Brignull, Heather R.; Morimoto, Richard I. (2006): Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. In: *Science (New York, N.Y.)* 311 (5766), S. 1471–1474. DOI: 10.1126/science.1124514.
- Goldman, Aaron; Ursitti, Jeanine A.; Mozdzanowski, Jacek; Speicher, David W. (2015): Electroblothing from Polyacrylamide Gels. In: *Current protocols in protein science* 82, 10.7.1–10.7.16. DOI: 10.1002/0471140864.ps1007s82.
- Goldstein, G.; Scheid, M.; Hammerling, U.; Schlesinger, D. H.; Niall, H. D.; Boyse, E. A. (1975): Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (1), S. 11–15. DOI: 10.1073/pnas.72.1.11.
- Gossen, M.; Freundlieb, S.; Bender, G.; Müller, G.; Hillen, W.; Bujard, H. (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 268 (5218), S. 1766–1769. DOI: 10.1126/science.7792603.
- Gottlieb, Leah; Guo, Lin; Shorter, James; Marmorstein, Ronen (2021): N-alpha-acetylation of Huntingtin protein increases its propensity to aggregate. In: *The Journal of biological chemistry* 297 (6), S. 101363. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101363.
- Guan, Jiaming; Song, Zhijian; Wei, Guanghong; Qiao, Qin (2022): Distinct binding interactions trigger opposite conformational modulations on pathogenic and wildtype Huntingtin exon 1 proteins. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 24 (40), S. 24959–24974. DOI: 10.1039/d2cp03173f.
- Gusella, J. F.; Wexler, N. S.; Conneally, P. M.; Naylor, S. L.; Anderson, M. A.; Tanzi, R. E. et al. (1983): A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. In: *Nature* 306 (5940), S. 234–238. DOI: 10.1038/306234a0.

- Gutekunst, C. A.; Levey, A. I.; Heilman, C. J.; Whaley, W. L.; Yi, H.; Nash, N. R. et al. (1995): Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (19), S. 8710–8714. DOI: 10.1073/pnas.92.19.8710.
- Halle, Annett; Hornung, Veit; Petzold, Gabor C.; Stewart, Cameron R.; Monks, Brian G.; Reinheckel, Thomas et al. (2008): The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. In: *Nature immunology* 9 (8), S. 857–865. DOI: 10.1038/ni.1636.
- Haraszti, Reka A.; Didiot, Marie-Cecile; Sapp, Ellen; Leszyk, John; Shaffer, Scott A.; Rockwell, Hannah E. et al. (2016): High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. In: *Journal of extracellular vesicles* 5, S. 32570. DOI: 10.3402/jev.v5.32570.
- Hardiman, Orla; Al-Chalabi, Ammar; Chio, Adriano; Corr, Emma M.; Logroscino, Giancarlo; Robberecht, Wim et al. (2017): Amyotrophic lateral sclerosis. In: *Nature reviews. Disease primers* 3, S. 17071. DOI: 10.1038/nrdp.2017.71.
- Hayashi, Miwa; Kuroda, Kengo; Ihara, Kohei; Iwaya, Takahiro; Isogai, Emiko (2018): Suppressive effect of an analog of the antimicrobial peptide of LL-37 on colon cancer cells via exosome-encapsulated miRNAs. In: *International journal of molecular medicine* 42 (6), S. 3009–3016. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3875.
- Hazeki, N.; Tukamoto, T.; Goto, J.; Kanazawa, I. (2000): Formic acid dissolves aggregates of an N-terminal huntingtin fragment containing an expanded polyglutamine tract: applying to quantification of protein components of the aggregates. In: *Biochemical and biophysical research communications* 277 (2), S. 386–393. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3682.
- Hershko, A.; Ciechanover, A.; Rose, I. A. (1981): Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. In: *Journal of Biological Chemistry* 256 (4), S. 1525–1528. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)69833-9.
- Higuchi-Sanabria, Ryo; Frankino, Phillip Andrew; Paul, Joseph West; Tronnes, Sarah Uhlein; Dillin, Andrew (2018): A Futile Battle? Protein Quality Control and the Stress of Aging. In: *Developmental cell* 44 (2), S. 139–163. DOI: 10.1016/j.devcel.2017.12.020.
- Hipp, Mark S.; Patel, Chetan N.; Bersuker, Kirill; Riley, Brigit E.; Kaiser, Stephen E.; Shaler, Thomas A. et al. (2012): Indirect inhibition of 26S proteasome activity in a cellular model of Huntington's disease. In: *The Journal of cell biology* 196 (5), S. 573–587. DOI: 10.1083/jcb.201110093.

- Hirayama, Daisuke; Iida, Tomoya; Nakase, Hiroshi (2017): The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. In: *International journal of molecular sciences* 19 (1). DOI: 10.3390/ijms19010092.
- Hoffner, Guylaine; Kahlem, Pascal; Djian, Philippe (2002): Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. In: *Journal of cell science* 115 (Pt 5), S. 941–948. DOI: 10.1242/jcs.115.5.941.
- Hoffner, Guylaine; Souès, Sylvie; Djian, Philippe (2007): Aggregation of expanded huntingtin in the brains of patients with Huntington disease. In: *Prion* 1 (1), S. 26–31. DOI: 10.4161/pri.1.1.4056.
- Hofmeister, Franz (1902): Über den bau des eiweissmoleküls. In: *Naturwiss. Rundschau* 17, S. 529–545.
- Hoogeveen, André T.; Willemsen, Rob; Meyer, Nicolle; Rooij, Karien E.de; Roos, Raymund A.; van Ommen, Gert-Jan; Galjaard, Hans (1993): Characterization and localization of the Huntington disease gene product. In: *Human molecular genetics* 2 (12), S. 2069–2073. DOI: 10.1093/hmg/2.12.2069.
- Hou, Yujun; Dan, Xiuli; Babbar, Mansi; Wei, Yong; Hasselbalch, Steen G.; Croteau, Deborah L.; Bohr, Vilhelm A. (2019): Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. In: *Nature reviews. Neurology* 15 (10), S. 565–581. DOI: 10.1038/s41582-019-0244-7.
- Hu, Qian; Lyon, Christopher J.; Fletcher, Jesse K.; Tang, Wenfu; Wan, Meihua; Hu, Tony Y. (2021): Extracellular vesicle activities regulating macrophage- and tissue-mediated injury and repair responses. In: *Acta pharmaceutica Sinica. B* 11 (6), S. 1493–1512. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.12.014.
- Hu, Wen; Wu, Feng; Zhang, Yanchong; Gong, Cheng-Xin; Iqbal, Khalid; Liu, Fei (2017): Expression of Tau Pathology-Related Proteins in Different Brain Regions: A Molecular Basis of Tau Pathogenesis. In: *Frontiers in aging neuroscience* 9, S. 311. DOI: 10.3389/fnagi.2017.00311.
- Huang, Yiyao; Driedonks, Tom A. P.; Cheng, Lesley; Rajapaksha, Harinda; Routenberg, David A.; Nagaraj, Rajini et al. (2022): Brain Tissue-Derived Extracellular Vesicles in Alzheimer's Disease Display Altered Key Protein Levels Including Cell Type-Specific Markers. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 90 (3), S. 1057–1072. DOI: 10.3233/JAD-220322.
- Hüll, M.; Fiebich, B. L.; Lieb, K.; Strauss, S.; Berger, S. S.; Volk, B.; Bauer, J. (1996): Interleukin-6-associated inflammatory processes in Alzheimer's disease: new therapeutic options. In: *Neurobiology of aging* 17 (5), S. 795–800. DOI: 10.1016/0197-4580(96)00107-8.
- Huntington, George (1872): On chorea. Online verfügbar unter <http://hdsa.org/wp-content/uploads/2017/08/on-chorea.pdf>.

- Ikegami, R.; Zhang, J.; Rivera-Bennetts, A. K.; Yager, T. D. (1997): Activation of the metaphase checkpoint and an apoptosis programme in the early zebrafish embryo, by treatment with the spindle-destabilising agent nocodazole. In: *Zygote (Cambridge, England)* 5 (4), S. 329–350. DOI: 10.1017/s0967199400003919.
- Im, Kyuseok; Mareninov, Sergey; Diaz, M. Fernando Palma; Yong, William H. (2019): An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1897, S. 299–311. DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5_26.
- Iuchi, S.; Hoffner, G.; Verbeke, P.; Djian, P.; Green, H. (2003): Oligomeric and polymeric aggregates formed by proteins containing expanded polyglutamine. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (5), S. 2409–2414. DOI: 10.1073/pnas.0437660100.
- Jakob, A. (1921): *Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems.*
- Jana, Nihar Ranjan; Dikshit, Priyanka; Goswami, Anand; Kotliarova, Svetlana; Murata, Shigeo; Tanaka, Keiji; Nukina, Nobuyuki (2005): Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (12), S. 11635–11640. DOI: 10.1074/jbc.M412042200.
- Jansohn, Monika; Rothhämel, Sophie (Hg.) (2012): *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1569275>.
- Jasencakova, Z.; Meister, A.; Walter, J.; Turner, B. M.; Schubert, I. (2000): Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. In: *The Plant Cell* 12 (11), S. 2087–2100. DOI: 10.1105/tpc.12.11.2087.
- Jensen, Helge Leander B.; Lillenes, Meryl S.; Rabano, Alberto; Günther, Clara-Cecilie; Riaz, Tahira; Kalayou, Shewit T. et al. (2018): Expression of nucleotide excision repair in Alzheimer's disease is higher in brain tissue than in blood. In: *Neuroscience letters* 672, S. 53–58. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.02.043.
- Jeon, Iksoo; Cicchetti, Francesca; Cisbani, Giulia; Lee, Sujj; Li, Endan; Bae, Jiwoo et al. (2016): Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein. In: *Acta neuropathologica* 132 (4), S. 577–592. DOI: 10.1007/s00401-016-1582-9.
- Jimenez-Sanchez, Maria; Licitra, Floriana; Underwood, Benjamin R.; Rubinsztein, David C. (2017): Huntington's Disease: Mechanisms of Pathogenesis and Therapeutic Strategies. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 7 (7). DOI: 10.1101/cshperspect.a024240.

- Johnson, Eleanoir B.; Gregory, Sarah (2019): Huntington's disease: Brain imaging in Huntington's disease. In: *Progress in molecular biology and translational science* 165, S. 321–369. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2019.04.004.
- Juenemann, Katrin; Schipper-Krom, Sabine; Wiemhoefer, Anne; Kloss, Alexander; Sanz Sanz, Alicia; Reits, Eric A. J. (2013): Expanded polyglutamine-containing N-terminal huntingtin fragments are entirely degraded by mammalian proteasomes. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (38), S. 27068–27084. DOI: 10.1074/jbc.M113.486076.
- Juenemann, Katrin; Wiemhoefer, Anne; Reits, Eric A. (2015): Detection of ubiquitinated huntingtin species in intracellular aggregates. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 8, S. 1. DOI: 10.3389/fnmol.2015.00001.
- Kacher, Radhia; Lejeune, François-Xavier; Noël, Sandrine; Cazeneuve, Cécile; Brice, Alexis; Humbert, Sandrine; Durr, Alexandra (2021): Propensity for somatic expansion increases over the course of life in Huntington disease. In: *eLife* 10. DOI: 10.7554/eLife.64674.
- Katiyar, Samiksha; Lennarz, William J. (2005): Studies on the intracellular localization of hHR23B. In: *Biochemical and biophysical research communications* 337 (4), S. 1296–1300. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.09.192.
- Kaur, M.; Pop, M.; Shi, D.; Brignone, C.; Grossman, S. R. (2007): hHR23B is required for genotoxic-specific activation of p53 and apoptosis. In: *Oncogene* 26 (8), S. 1231–1237. DOI: 10.1038/sj.onc.1209865.
- Kazantsev, A.; Preisinger, E.; Dranovsky, A.; Goldgaber, D.; Housman, D. (1999): Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20), S. 11404–11409. DOI: 10.1073/pnas.96.20.11404.
- Kowal, Emma J. K.; Ter-Ovanesyan, Dmitry; Regev, Aviv; Church, George M. (2017): Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1660, S. 143–152. DOI: 10.1007/978-1-4939-7253-1_12.
- Kulka, Linda Anna Michelle; Fangmann, Pia-Victoria; Panfilova, Diana; Olzscha, Heidi (2020): Impact of HDAC Inhibitors on Protein Quality Control Systems: Consequences for Precision Medicine in Malignant Disease. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 425. DOI: 10.3389/fcell.2020.00425.
- Kumar, Puneet; Kalonia, Harikesh; Kumar, Anil (2012): Possible GABAergic mechanism in the neuroprotective effect of gabapentin and lamotrigine against 3-nitropropionic acid induced

- neurotoxicity. In: *European journal of pharmacology* 674 (2-3), S. 265–274. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.11.030.
- Kumar, S.; Talis, A. L.; Howley, P. M. (1999): Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (26), S. 18785–18792. DOI: 10.1074/jbc.274.26.18785.
- Kurien, Biji T.; Scofield, R. Hal (2015): Western blotting: an introduction. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1312, S. 17–30. DOI: 10.1007/978-1-4939-2694-7_5.
- Kurtishi, Alberim; Rosen, Benjamin; Patil, Ketan S.; Alves, Guido W.; Møller, Simon G. (2019): Cellular Proteostasis in Neurodegeneration. In: *Molecular neurobiology* 56 (5), S. 3676–3689. DOI: 10.1007/s12035-018-1334-z.
- Laberge, Alexandra; Arif, Syrine; Moulin, Véronique J. (2018): Microvesicles: Intercellular messengers in cutaneous wound healing. In: *Journal of cellular physiology* 233 (8), S. 5550–5563. DOI: 10.1002/jcp.26426.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lai, Xiaojing; Gu, Qing; Zhou, Xia; Feng, Wei; Lin, Xiao; He, Yan et al. (2017): Decreased expression of CD63 tetraspanin protein predicts elevated malignant potential in human esophageal cancer. In: *Oncology letters* 13 (6), S. 4245–4251. DOI: 10.3892/ol.2017.6023.
- Langbehn, Douglas R. (2022): Longer CAG repeat length is associated with shorter survival after disease onset in Huntington disease. In: *American Journal of Human Genetics* 109 (1), S. 172–179. DOI: 10.1016/j.ajhg.2021.12.002.
- LaPelusa, Andrew; Kaushik, Ravi (2022): StatPearls. Physiology, Proteins. Treasure Island (FL).
- Laskey, R. A.; Honda, B. M.; Mills, A. D.; Finch, J. T. (1978): Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. In: *Nature* 275 (5679), S. 416–420. DOI: 10.1038/275416a0.
- Latoszek, Ewelina; Wiweger, Małgorzata; Ludwiczak, Jan; Dunin-Horkawicz, Stanisław; Kuznicki, Jacek; Czeredys, Magdalena (2022): Siah-1-interacting protein regulates mutated huntingtin protein aggregation in Huntington's disease models. In: *Cell & bioscience* 12 (1), S. 34. DOI: 10.1186/s13578-022-00755-0.

- Layburn, Florence E.; Tan, Adelle Y. S.; Mehrabi, Nasim F.; Curtis, Maurice A.; Tippett, Lynette J.; Riguet, Nathan et al. (2022): N-terminal mutant Huntingtin deposition correlates with CAG repeat length and disease onset, but not neuronal loss in Huntington's disease.
- Le Gall, Laura; Duddy, William J.; Martinat, Cecile; Mariot, Virginie; Connolly, Owen; Milla, Vanessa et al. (2022): Muscle cells of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients secrete neurotoxic vesicles. In: *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 13 (2), S. 1385–1402. DOI: 10.1002/jcsm.12945.
- Leak, Rehana K.; Frosch, Matthew P.; Beach, Thomas G.; Halliday, Glenda M. (2019): Alpha-synuclein: prion or prion-like? In: *Acta neuropathologica* 138 (4), S. 509–514. DOI: 10.1007/s00401-019-02057-1.
- Leal, María C.; Casabona, Juan C.; Puntel, Mariana; Pitossi, Fernando J. (2013): Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? In: *Frontiers in cellular neuroscience* 7, S. 53. DOI: 10.3389/fncel.2013.00053.
- Lee, Jung-Hyun; Ostalecki, Christian; Oberstein, Timo; Schierer, Stefan; Zinser, Elisabeth; Eberhardt, Martin et al. (2022): Alzheimer's disease protease-containing plasma extracellular vesicles transfer to the hippocampus via the choroid plexus. In: *EBioMedicine* 77, S. 103903. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103903.
- Lee, Pei Yun; Costumbrado, John; Hsu, Chih-Yuan; Kim, Yong Hoon (2012): Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (62). DOI: 10.3791/3923.
- Levinthal, C. (1969): How to fold graciously. In: *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems* (67), S. 22–24.
- Lewy, F. H. (1912): Paralysis agitans. In: *Handbuch der Neurologie* 3, S. 920–958. Online verfügbar unter <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571417125498318592>.
- Li, S. H.; Cheng, A. L.; Li, H.; Li, X. J. (1999): Cellular defects and altered gene expression in PC12 cells stably expressing mutant huntingtin. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (13), S. 5159–5172. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-13-05159.1999.
- Li, S. H.; Li, X. J. (1998): Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. In: *Human molecular genetics* 7 (5), S. 777–782. DOI: 10.1093/hmg/7.5.777.
- Liang, Rwei-Yue; Chen, Li; Ko, Bo-Ting; Shen, Yu-Han; Li, Yen-Te; Chen, Bo-Rong et al. (2014): Rad23 interaction with the proteasome is regulated by phosphorylation of its ubiquitin-like (Ubl) domain. In: *Journal of molecular biology* 426 (24), S. 4049–4060. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.10.004.

- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *Journal of Biological Chemistry* 193 (1), S. 265–275.
- MacDonald, Marcy E.; Ambrose, Christine M.; Duyao, Mabel P.; Myers, Richard H.; Lin, Carol; Srinidhi, Lakshmi et al. (1993): A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. In: *Cell* 72 (6), S. 971–983. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90585-E.
- Maltseva, Ekaterina A.; Rechkunova, Nadejda I.; Gillet, Ludovic C.; Petrusseva, Irina O.; Schärer, Orlando D.; Lavrik, Olga I. (2007): Crosslinking of the NER damage recognition proteins XPC-HR23B, XPA and RPA to photoreactive probes that mimic DNA damages. In: *Biochimica et biophysica acta* 1770 (5), S. 781–789. DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.01.007.
- Mangiarini, Laura; Sathasivam, Kirupa; Seller, Mary; Cozens, Barbara; Harper, Alex; Hetherington, Colin et al. (1996): Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice. In: *Cell* 87 (3), S. 493–506. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81369-0.
- Martín-Aparicio, E.; Yamamoto, A.; Hernández, F.; Hen, R.; Avila, J.; Lucas, J. J. (2001): Proteasomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (22), S. 8772–8781. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-22-08772.2001.
- McKinnon, Katherine M. (2018): Flow Cytometry: An Overview. In: *Current protocols in immunology* 120, 5.1.1-5.1.11. DOI: 10.1002/cpim.40.
- Mears, Rainy; Craven, Rachel A.; Hanrahan, Sarah; Totty, Nick; Upton, Carol; Young, Sarah L. et al. (2004): Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. In: *Proteomics* 4 (12), S. 4019–4031. DOI: 10.1002/pmic.200400876.
- Mittal, Sumeer K.; Eddy, Clare (2013): The role of dopamine and glutamate modulation in Huntington disease. In: *Behavioural neurology* 26 (4), S. 255–263. DOI: 10.3233/BEN-2012-120268.
- Mokrasch, L. C. (1965): Spontaneous incorporation of biogenic amines into purified proteolipid. In: *Biochimica et biophysica acta* 107 (3), S. 608–610. DOI: 10.1016/0304-4165(65)90207-2.
- Momen-Heravi, Fatemeh; Balaj, Leonora; Alian, Sara; Mantel, Pierre-Yves; Halleck, Allison E.; Trachtenberg, Alexander J. et al. (2013): Current methods for the isolation of extracellular vesicles. In: *Biological chemistry* 394 (10), S. 1253–1262. DOI: 10.1515/hsz-2013-0141.

- Morishima-Kawashima, Maho; Ihara, Yasuo (2002): Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. In: *Journal of neuroscience research* 70 (3), S. 392–401. DOI: 10.1002/jnr.10355.
- Muchowski, Paul J.; Ning, Ke; D'Souza-Schorey, Crislyn; Fields, Stanley (2002): Requirement of an intact microtubule cytoskeleton for aggregation and inclusion body formation by a mutant huntingtin fragment. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2), S. 727–732. DOI: 10.1073/pnas.022628699.
- Mulder, G. J. (1839): Ueber die Zusammensetzung einiger thierischen Substanzen. In: *J. Prakt. Chem.* 16 (1), S. 129–152. DOI: 10.1002/prac.18390160137.
- Münz, Christian (2012): Antigen Processing for MHC Class II Presentation via Autophagy. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 9. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00009.
- Murray, Peter J. (2017): Macrophage Polarization. In: *Annual review of physiology* 79, S. 541–566. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
- Nakajima, Yuko; Suzuki, Shunji (2013): Environmental stresses induce misfolded protein aggregation in plant cells in a microtubule-dependent manner. In: *International journal of molecular sciences* 14 (4), S. 7771–7783. DOI: 10.3390/ijms14047771.
- Navarro, Susanna; Ventura, Salvador (2014): Fluorescent dye ProteoStat to detect and discriminate intracellular amyloid-like aggregates in Escherichia coli. In: *Biotechnology journal* 9 (10), S. 1259–1266. DOI: 10.1002/biot.201400291.
- New, M.; Olzscha, H.; Liu, G.; Khan, O.; Stimson, L.; McGouran, J. et al. (2013): A regulatory circuit that involves HR23B and HDAC6 governs the biological response to HDAC inhibitors. In: *Cell death and differentiation* 20 (10), S. 1306–1316. DOI: 10.1038/cdd.2013.47.
- Ng, Jessica M. Y.; Vermeulen, Wim; van der Horst, Gijsbertus T. J.; Bergink, Steven; Sugawara, Kaoru; Vrieling, Harry; Hoeijmakers, Jan H. J. (2003): A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. In: *Genes & development* 17 (13), S. 1630–1645. DOI: 10.1101/gad.260003.
- Ni, Duojiao; Xu, Peng; Gallagher, Sean (2017): Immunoblotting and Immunodetection. In: *Current protocols in cell biology* 74, 6.2.1-6.2.37. DOI: 10.1002/cpcb.18.
- Nørremølle, A.; Riess, O.; Epplen, J. T.; Fenger, K.; Hasholt, L.; Sørensen, S. A. (1993): Trinucleotide repeat elongation in the Huntingtin gene in Huntington disease patients from 71 Danish families. In: *Human molecular genetics* 2 (9), S. 1475–1476. DOI: 10.1093/hmg/2.9.1475.

- Nussinov, Ruth; Ma, Buyong (2012): Protein dynamics and conformational selection in bidirectional signal transduction. In: *BMC biology* 10, S. 2. DOI: 10.1186/1741-7007-10-2.
- Oh, Chang-Ki; Dolatabadi, Nima; Cieplak, Piotr; Diaz-Meco, Maria T.; Moscat, Jorge; Nolan, John P. et al. (2022): S-Nitrosylation of p62 Inhibits Autophagic Flux to Promote α -Synuclein Secretion and Spread in Parkinson's Disease and Lewy Body Dementia. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 42 (14), S. 3011–3024. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1508-21.2022.
- Okeke, Evelyn; Chen, Li; Madura, Kiran (2020): The Cellular Location of Rad23, a Polyubiquitin Chain-Binding Protein, Plays a Key Role in Its Interaction with Substrates of the Proteasome. In: *Journal of molecular biology* 432 (7), S. 2388–2404. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.03.001.
- Okuda, Yuki; Nishi, Ryotaro; Ng, Jessica M. Y.; Vermeulen, Wim; van der Horst, Gijsbertus T. J.; Mori, Toshio et al. (2004): Relative levels of the two mammalian Rad23 homologs determine composition and stability of the xeroderma pigmentosum group C protein complex. In: *DNA repair* 3 (10), S. 1285–1295. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.06.010.
- Olzscha, Heidi (2019): Posttranslational modifications and proteinopathies: how guardians of the proteome are defeated. In: *Biological chemistry* 400 (7), S. 895–915. DOI: 10.1515/hsz-2018-0458.
- Olzscha, Heidi; Fedorov, Oleg; Kessler, Benedikt M.; Knapp, Stefan; La Thangue, Nicholas B. (2017): CBP/p300 Bromodomains Regulate Amyloid-like Protein Aggregation upon Aberrant Lysine Acetylation. In: *Cell chemical biology* 24 (1), S. 9–23. DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.11.009.
- Olzscha, Heidi; Sheikh, Semira; La Thangue, Nicholas B. (2015): Deacetylation of chromatin and gene expression regulation: a new target for epigenetic therapy. In: *Critical reviews in oncogenesis* 20 (1-2), S. 1–17. DOI: 10.1615/critrevoncog.2014012463.
- Oshinbolu, Sheun; Shah, Rachana; Finka, Gary; Molloy, Mike; Uden, Mark; Bracewell, Daniel G. (2018): Evaluation of fluorescent dyes to measure protein aggregation within mammalian cell culture supernatants. In: *Journal of chemical technology and biotechnology (Oxford, Oxfordshire : 1986)* 93 (3), S. 909–917. DOI: 10.1002/jctb.5519.
- Ou, Weijun; Yang, Joshua; Simanauskaite, Juste; Choi, Matthew; Castellanos, Demi M.; Chang, Rudy et al. (2021): Biologic TNF- α inhibitors reduce microgliosis, neuronal loss, and tau phosphorylation in a transgenic mouse model of tauopathy. In: *Journal of neuroinflammation* 18 (1), S. 312. DOI: 10.1186/s12974-021-02332-7.
- Paulson, Henry (2012): Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. In: *Handbook of clinical neurology* 103, S. 437–449. DOI: 10.1016/B978-0-444-51892-7.00027-9.

- Paulson, Henry (2018): Repeat expansion diseases. In: *Handbook of clinical neurology* 147, S. 105–123. DOI: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00009-9.
- Pearce, Margaret M. P.; Spartz, Ellen J.; Hong, Weizhe; Luo, Liquan; Kopito, Ron R. (2015): Prion-like transmission of neuronal huntingtin aggregates to phagocytic glia in the *Drosophila* brain. In: *Nature communications* 6, S. 6768. DOI: 10.1038/ncomms7768.
- Pecho-Vrieseling, Eline; Rieker, Claus; Fuchs, Sascha; Bleckmann, Dorothee; Esposito, Maria Soledad; Botta, Paolo et al. (2014): Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons. In: *Nature neuroscience* 17 (8), S. 1064–1072. DOI: 10.1038/nn.3761.
- Pigazzini, Maria Lucia; Lawrenz, Mandy; Margineanu, Anca; Kaminski Schierle, Gabriele S.; Kirstein, Janine (2021): An Expanded Polyproline Domain Maintains Mutant Huntingtin Soluble in vivo and During Aging. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 14, S. 721749. DOI: 10.3389/fnmol.2021.721749.
- Piña-Aguilar, Raul E.; Simpson, Sheila A.; Alshatti, Abdulrahman; Clarke, Angus; Craufurd, David; Dorkins, Huw et al. (2019): 27 years of prenatal diagnosis for Huntington disease in the United Kingdom. In: *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 21 (7), S. 1639–1643. DOI: 10.1038/s41436-018-0367-z.
- Pink, Desmond; Donnelier, Julien; Lewis, John D.; Braun, Janice E. A. (2021): Cysteine String Protein Controls Two Routes of Export for Misfolded Huntingtin. In: *Frontiers in neuroscience* 15, S. 762439. DOI: 10.3389/fnins.2021.762439.
- Pohl, Christian; Dikic, Ivan (2019): Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. In: *Science (New York, N.Y.)* 366 (6467), S. 818–822. DOI: 10.1126/science.aax3769.
- Poirier, Michelle A.; Jiang, Haibing; Ross, Christopher A. (2005): A structure-based analysis of huntingtin mutant polyglutamine aggregation and toxicity: evidence for a compact beta-sheet structure. In: *Human molecular genetics* 14 (6), S. 765–774. DOI: 10.1093/hmg/ddi071.
- Pontén, J.; Saksela, E. (1967): Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. In: *International journal of cancer* 2 (5), S. 434–447. DOI: 10.1002/ijc.2910020505.
- Pringsheim, Tamara; Wiltshire, Katie; Day, Lundy; Dykeman, Jonathan; Steeves, Thomas; Jette, Nathalie (2012): The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27 (9), S. 1083–1091. DOI: 10.1002/mds.25075.

- Provost, Jean-Sebastien; Hanganu, Alexandru; Monchi, Oury (2015): Neuroimaging studies of the striatum in cognition Part I: healthy individuals. In: *Frontiers in systems neuroscience* 9, S. 140. DOI: 10.3389/fnsys.2015.00140.
- Prusiner, S. B. (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. In: *Science (New York, N.Y.)* 216 (4542), S. 136–144. DOI: 10.1126/science.6801762.
- Rajendran, Lawrence; Bali, Jitin; Barr, Maureen M.; Court, Felipe A.; Krämer-Albers, Eva-Maria; Picou, Frederic et al. (2014): Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (46), S. 15482–15489. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3258-14.2014.
- Rajendran, Lawrence; Honsho, Masanori; Zahn, Tobias R.; Keller, Patrick; Geiger, Kathrin D.; Verkade, Paul; Simons, Kai (2006): Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (30), S. 11172–11177. DOI: 10.1073/pnas.0603838103.
- Ramos-Zaldívar, Héctor M.; Polakovicova, Iva; Salas-Huenuleo, Edison; Corvalán, Alejandro H.; Kogan, Marcelo J.; Yefi, Claudia P.; Andia, Marcelo E. (2022): Extracellular vesicles through the blood-brain barrier: a review. In: *Fluids and barriers of the CNS* 19 (1), S. 60. DOI: 10.1186/s12987-022-00359-3.
- Reich, Stephen G.; Savitt, Joseph M. (2019): Parkinson's Disease. In: *The Medical clinics of North America* 103 (2), S. 337–350. DOI: 10.1016/j.mcna.2018.10.014.
- Ren, Pei-Hsien; Lauckner, Jane E.; Kachirskaia, Ioulia; Heuser, John E.; Melki, Ronald; Kopito, Ron R. (2009): Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. In: *Nature cell biology* 11 (2), S. 219–225. DOI: 10.1038/ncb1830.
- Riguet, Nathan; Mahul-Mellier, Anne-Laure; Maharjan, Niranjana; Burtscher, Johannes; Croisier, Marie; Knott, Graham et al. (2021): Nuclear and cytoplasmic huntingtin inclusions exhibit distinct biochemical composition, interactome and ultrastructural properties. In: *Nature communications* 12 (1), S. 6579. DOI: 10.1038/s41467-021-26684-z.
- Robertson, Catherine; Booth, Stephanie A.; Beniac, Daniel R.; Coulthart, Michael B.; Booth, Timothy F.; McNicol, Archibald (2006): Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. In: *Blood* 107 (10), S. 3907–3911. DOI: 10.1182/blood-2005-02-0802.
- Rosenzweig, Rina; Nillegoda, Nadinath B.; Mayer, Matthias P.; Bukau, Bernd (2019): The Hsp70 chaperone network. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 20 (11), S. 665–680. DOI: 10.1038/s41580-019-0133-3.

- Ross, Christopher A.; Pickart, Cecile M. (2004): The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. In: *Trends in cell biology* 14 (12), S. 703–711. DOI: 10.1016/j.tcb.2004.10.006.
- Rothe, Gunter M.; Purkhanbaba, Huschang (1982): Determination of molecular weights and Stokes' radii of non-denatured proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis. 1. An equation relating total polymer concentration, the molecular weight of proteins in the range of 104-106, and duration of electrophoresis. In: *Electrophoresis* 3 (1), S. 33–42. DOI: 10.1002/elps.1150030107.
- Rubinsztein, D. C.; Leggo, J.; Coles, R.; Almqvist, E.; Biancalana, V.; Cassiman, J. J. et al. (1996): Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. In: *American Journal of Human Genetics* 59 (1), S. 16–22.
- Ryu, Kyoung-Seok; Lee, Kyung-Jin; Bae, Sung-Hun; Kim, Byoung-Kook; Kim, Kyoung-Ah; Choi, Byong-Seok (2003): Binding surface mapping of intra- and interdomain interactions among hHR23B, ubiquitin, and polyubiquitin binding site 2 of S5a. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (38), S. 36621–36627. DOI: 10.1074/jbc.M304628200.
- Sakai, Wataru; Yuasa-Sunagawa, Mayumi; Kusakabe, Masayuki; Kishimoto, Aiko; Matsui, Takeshi; Kaneko, Yuki et al. (2020): Functional impacts of the ubiquitin-proteasome system on DNA damage recognition in global genome nucleotide excision repair. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 19704. DOI: 10.1038/s41598-020-76898-2.
- Saman, Sudad; Kim, WonHee; Raya, Mario; Visnick, Yvonne; Miro, Suhad; Saman, Sarmad et al. (2012): Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (6), S. 3842–3849. DOI: 10.1074/jbc.M111.277061.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Sarkar, Sovan; Davies, Adelina A.; Ulrich, Helle D.; McHugh, Peter J. (2006): DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta. In: *The EMBO journal* 25 (6), S. 1285–1294. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600993.
- Scherzinger, E.; Lurz, R.; Turmaine, M.; Mangiarini, L.; Hollenbach, B.; Hasenbank, R. et al. (1997): Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. In: *Cell* 90 (3), S. 549–558. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80514-0.

- Schipper-Krom, Sabine; Juenemann, Katrin; Jansen, Anne H.; Wiemhoefer, Anne; van den Nieuwendijk, Rianne; Smith, Donna L. et al. (2014): Dynamic recruitment of active proteasomes into polyglutamine initiated inclusion bodies. In: *FEBS letters* 588 (1), S. 151–159. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.11.023.
- Schubert, U.; Antón, L. C.; Gibbs, J.; Norbury, C. C.; Yewdell, J. W.; Bennink, J. R. (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. In: *Nature* 404 (6779), S. 770–774. DOI: 10.1038/35008096.
- Scior, Annika; Buntru, Alexander; Arnsburg, Kristin; Ast, Anne; Iburg, Manuel; Juenemann, Katrin et al. (2018): Complete suppression of Htt fibrilization and disaggregation of Htt fibrils by a trimeric chaperone complex. In: *The EMBO journal* 37 (2), S. 282–299. DOI: 10.15252/embj.201797212.
- Seo, Hyemyung; Sonntag, Kai-Christian; Isacson, Ole (2004): Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. In: *Annals of neurology* 56 (3), S. 319–328. DOI: 10.1002/ana.20207.
- Shacham, Talya; Sharma, Neeraj; Lederkremer, Gerardo Z. (2019): Protein Misfolding and ER Stress in Huntington's Disease. In: *Frontiers in molecular biosciences* 6, S. 20. DOI: 10.3389/fmolb.2019.00020.
- Shen, Dee; Coleman, Jack; Chan, Eric; Nicholson, Thomas P.; Dai, Lijun; Sheppard, Paul W.; Patton, Wayne F. (2011): Novel cell- and tissue-based assays for detecting misfolded and aggregated protein accumulation within aggresomes and inclusion bodies. In: *Cell biochemistry and biophysics* 60 (3), S. 173–185. DOI: 10.1007/s12013-010-9138-4.
- Shojaati, Golnar; Khandaker, Irona; Funderburgh, Martha L.; Mann, Mary M.; Basu, Rohan; Stolz, Donna B. et al. (2019): Mesenchymal Stem Cells Reduce Corneal Fibrosis and Inflammation via Extracellular Vesicle-Mediated Delivery of miRNA. In: *Stem Cells Translational Medicine* 8 (11), S. 1192–1201. DOI: 10.1002/sctm.18-0297.
- Sieradzan, K. A.; Mechan, A. O.; Jones, L.; Wanker, E. E.; Nukina, N.; Mann, D. M. (1999): Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. In: *Experimental neurology* 156 (1), S. 92–99. DOI: 10.1006/exnr.1998.7005.
- Sin, Olga; Mata-Cabana, Alejandro; Seinstra, Renée I.; Nollen, Ellen A. A. (2018): Filter Retardation Assay for Detecting and Quantifying Polyglutamine Aggregates Using *Caenorhabditis elegans* Lysates. In: *Bio-protocol* 8 (19). DOI: 10.21769/BioProtoc.3042.
- Slow, Elizabeth J.; Graham, Rona K.; Hayden, Michael R. (2006): To be or not to be toxic: aggregations in Huntington and Alzheimer disease. In: *Trends in genetics : TIG* 22 (8), S. 408–411. DOI: 10.1016/j.tig.2006.05.008.

- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical biochemistry* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Steffan, Joan S.; Agrawal, Namita; Pallos, Judit; Rockabrand, Erica; Trotman, Lloyd C.; Slepko, Natalia et al. (2004): SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. In: *Science (New York, N.Y.)* 304 (5667), S. 100–104. DOI: 10.1126/science.1092194.
- Sterling, Jacob K.; Kam, Tae-In; Guttha, Samyuktha; Park, Hyejin; Baumann, Bailey; Mehrabani-Tabari, Amir A. et al. (2022): Interleukin-6 triggers toxic neuronal iron sequestration in response to pathological α -synuclein. In: *Cell reports* 38 (7), S. 110358. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110358.
- Stoker, Thomas B.; Mason, Sarah L.; Greenland, Julia C.; Holden, Simon T.; Santini, Helen; Barker, Roger A. (2022): Huntington's disease: diagnosis and management. In: *Practical neurology* 22 (1), S. 32–41. DOI: 10.1136/practneurol-2021-003074.
- Strober, Warren (2015): Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In: *Current protocols in immunology* 111, A3.B.1-A3.B.3. DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs111.
- Su, Vivian; Lau, Alan F. (2009): Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66 (17), S. 2819–2833. DOI: 10.1007/s00018-009-0048-9.
- Sugasawa, K.; Ng, J. M.; Masutani, C.; Maekawa, T.; Uchida, A.; van der Spek, P. J. et al. (1997): Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. In: *Molecular and cellular biology* 17 (12), S. 6924–6931. DOI: 10.1128/MCB.17.12.6924.
- Sun, Yi-Min; Zhang, Yan-Bin; Wu, Zhi-Ying (2017): Huntington's Disease: Relationship Between Phenotype and Genotype. In: *Molecular neurobiology* 54 (1), S. 342–348. DOI: 10.1007/s12035-015-9662-8.
- Swatek, Kirby N.; Komander, David (2016): Ubiquitin modifications. In: *Cell research* 26 (4), S. 399–422. DOI: 10.1038/cr.2016.39.
- Tabrizi, Sarah J.; Ghosh, Rhia; Leavitt, Blair R. (2019): Huntingtin Lowering Strategies for Disease Modification in Huntington's Disease. In: *Neuron* 101 (5), S. 801–819. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.01.039.
- Tabrizi, Sarah J.; Scahill, Rachael I.; Owen, Gail; Durr, Alexandra; Leavitt, Blair R.; Roos, Raymond A. et al. (2013): Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage

- Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. In: *The Lancet. Neurology* 12 (7), S. 637–649. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70088-7.
- Tanaka, Keiji (2009): The proteasome: overview of structure and functions. In: *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 85 (1), S. 12–36. DOI: 10.2183/pjab.85.12.
- Tarique, Abdullah A.; Logan, Jayden; Thomas, Emma; Holt, Patrick G.; Sly, Peter D.; Fantino, Emmanuelle (2015): Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 53 (5), S. 676–688. DOI: 10.1165/rcmb.2015-0012OC.
- Thibaudeau, Tiffany A.; Anderson, Raymond T.; Smith, David M. (2018): A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. In: *Nature communications* 9 (1), S. 1097. DOI: 10.1038/s41467-018-03509-0.
- Tsuchiya, Hikaru; Endo, Akinori; Saeki, Yasushi (2020): Multi-Step Ubiquitin Decoding Mechanism for Proteasomal Degradation. In: *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 13 (6). DOI: 10.3390/ph13060128.
- Tsuchiya, S.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T.; Tada, K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). In: *International journal of cancer* 26 (2), S. 171–176. DOI: 10.1002/ijc.2910260208.
- Tsukada, M.; Ohsumi, Y. (1993): Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEBS letters* 333 (1-2), S. 169–174. DOI: 10.1016/0014-5793(93)80398-e.
- van Damme, Petra; Arnesen, Thomas; Gevaert, Kris (2011): Protein alpha-N-acetylation studied by N-terminomics. In: *The FEBS journal* 278 (20), S. 3822–3834. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08230.x.
- van den Berg, B.; Ellis, R. J.; Dobson, C. M. (1999): Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. In: *The EMBO journal* 18 (24), S. 6927–6933. DOI: 10.1093/emboj/18.24.6927.
- Verdoodt, B.; Decordier, I.; Geleyns, K.; Cunha, M.; Cundari, E.; Kirsch-Volders, M. (1999): Induction of polyploidy and apoptosis after exposure to high concentrations of the spindle poison nocodazole. In: *Mutagenesis* 14 (5), S. 513–520. DOI: 10.1093/mutage/14.5.513.
- Verma, Rati; Oania, Robert; Graumann, Johannes; Deshaies, Raymond J. (2004): Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. In: *Cell* 118 (1), S. 99–110. DOI: 10.1016/j.cell.2004.06.014.

- Vicente Miranda, Hugo; Gomes, Marcos António; Branco-Santos, Joana; Breda, Carlo; Lázaro, Diana F.; Lopes, Luísa Vaqueiro et al. (2016): Glycation potentiates neurodegeneration in models of Huntington's disease. In: *Scientific reports* 6, S. 36798. DOI: 10.1038/srep36798.
- Vigneron, Nathalie; van den Eynde, Benoît J. (2014): Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex. In: *Biomolecules* 4 (4), S. 994–1025. DOI: 10.3390/biom4040994.
- Vingtdeux, Valérie; Hamdane, Malika; Loyens, Anne; Gelé, Patrick; Drobeck, Hervé; Bégard, Séverine et al. (2007): Alkalinizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (25), S. 18197–18205. DOI: 10.1074/jbc.M609475200.
- Vinueza-Gavilanes, Rodrigo; Íñigo-Marco, Ignacio; Larrea, Laura; Lasa, Marta; Carte, Beatriz; Santamaría, Enrique et al. (2020): N-terminal acetylation mutants affect alpha-synuclein stability, protein levels and neuronal toxicity. In: *Neurobiology of disease* 137, S. 104781. DOI: 10.1016/j.nbd.2020.104781.
- Waelter, S.; Boeddrich, A.; Lurz, R.; Scherzinger, E.; Lueder, G.; Lehrach, H.; Wanker, E. E. (2001): Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. In: *Molecular Biology of the Cell* 12 (5), S. 1393–1407. DOI: 10.1091/mbc.12.5.1393.
- Walters, Kylie J.; Lech, Patrycja J.; Goh, Amanda M.; Wang, Qinghua; Howley, Peter M. (2003): DNA-repair protein hHR23a alters its protein structure upon binding proteasomal subunit S5a. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (22), S. 12694–12699. DOI: 10.1073/pnas.1634989100.
- Wang, Fangyu; Cerione, Richard A.; Antonyak, Marc A. (2021): Isolation and characterization of extracellular vesicles produced by cell lines. In: *STAR protocols* 2 (1), S. 100295. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100295.
- Wang, Xuejun; Pattison, J. Scott; Su, Huabo (2013): Posttranslational modification and quality control. In: *Circulation research* 112 (2), S. 367–381. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268706.
- Wanker, E. E.; Scherzinger, E.; Heiser, V.; Sittler, A.; Eickhoff, H.; Lehrach, H. (1999): Membrane filter assay for detection of amyloid-like polyglutamine-containing protein aggregates. In: *Methods in enzymology* 309, S. 375–386. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)09026-6.
- Wihastuti, Titin Andri; Nurwidyaningtyas, Wiwit; Cesa, Fibe Yulinda; Tri Tjahjono, Cholid (2020): Cytoplasm and nuclear crude protein proportion observed in peripheral blood mono nuclear cells

- under senescence inducing stress exposure. In: *J. Phys.: Conf. Ser.* 1665, S. 12034. DOI: 10.1088/1742-6596/1665/1/012034.
- Winklhofer, Konstanze F.; Tatzelt, Jörg; Haass, Christian (2008): The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. In: *The EMBO journal* 27 (2), S. 336–349. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601930.
- Wolfe, Katie J.; Cyr, Douglas M. (2011): Amyloid in neurodegenerative diseases: friend or foe? In: *Seminars in cell & developmental biology* 22 (5), S. 476–481. DOI: 10.1016/j.semcdb.2011.03.011.
- Wong, Shi Q.; Kumar, Anita V.; Mills, Joslyn; Lapierre, Louis R. (2020): Autophagy in aging and longevity. In: *Human genetics* 139 (3), S. 277–290. DOI: 10.1007/s00439-019-02031-7.
- Wu, Yufei; Janmey, Paul; Sun, Sean X. (2021): The Correlation Between Cell and Nucleus Size is Explained by an Eukaryotic Cell Growth Model.
- Xu, Rong; Greening, David W.; Rai, Alin; Ji, Hong; Simpson, Richard J. (2015): Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 87, S. 11–25. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.04.008.
- Xu, Wei-Sheng; Parmigiani, Raphael B.; Marks, Paul A. (2007): Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. In: *Oncogene* 26 (37), S. 5541–5552. DOI: 10.1038/sj.onc.1210620.
- Yang, Hui; Yue, Hong-Wei; He, Wen-Tian; Hong, Jun-Ye; Jiang, Lei-Lei; Hu, Hong-Yu (2018): PolyQ-expanded huntingtin and ataxin-3 sequester ubiquitin adaptors hHR23B and UBQLN2 into aggregates via conjugated ubiquitin. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32 (6), S. 2923–2933. DOI: 10.1096/fj.201700801RR.
- Yang, Huiming; Yang, Su; Jing, Liang; Huang, Luoxiu; Chen, Luxiao; Zhao, Xianxian et al. (2020): Truncation of mutant huntingtin in knock-in mice demonstrates exon1 huntingtin is a key pathogenic form. In: *Nature communications* 11 (1), S. 2582. DOI: 10.1038/s41467-020-16318-1.
- Yang, Wen; Dunlap, John R.; Andrews, Richard B.; Wetzel, Ronald (2002): Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. In: *Human molecular genetics* 11 (23), S. 2905–2917. DOI: 10.1093/hmg/11.23.2905.
- Yao, Yongli; Xu, Xiang-Hong; Jin, Liping (2019): Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 792. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00792.
- Yokoi, Masayuki; Hanaoka, Fumio (2017): Two mammalian homologs of yeast Rad23, HR23A and HR23B, as multifunctional proteins. In: *Gene* 597, S. 1–9. DOI: 10.1016/j.gene.2016.10.027.

- Young, Anne B. (2003): Huntingtin in health and disease. In: *The Journal of clinical investigation* 111 (3), S. 299–302. DOI: 10.1172/JCI17742.
- Yu, Yanting; Bai, Feng; Qin, Nan; Liu, Wenjin; Sun, Qi; Zhou, Yang; Yang, Junwei (2018): Non-Proximal Renal Tubule-Derived Urinary Exosomal miR-200b as a Biomarker of Renal Fibrosis. In: *Nephron* 139 (3), S. 269–282. DOI: 10.1159/000487104.
- 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. In: *Nature genetics* 11 (2), S. 155–163. DOI: 10.1038/ng1095-155.
- Zglinicki, Thomas von; Wan, Tengfei; Miwa, Satomi (2021): Senescence in Post-Mitotic Cells: A Driver of Aging? In: *Antioxidants & Redox Signaling* 34 (4), S. 308–323. DOI: 10.1089/ars.2020.8048.
- Zhang, Yong-Jie; Gendron, Tania F.; Grima, Jonathan C.; Sasaguri, Hiroki; Jansen-West, Karen; Xu, Ya-Fei et al. (2016): C9ORF72 poly(GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins. In: *Nature neuroscience* 19 (5), S. 668–677. DOI: 10.1038/nn.4272.
- Zhao, Yingming; Jensen, Ole N. (2009): Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. In: *Proteomics* 9 (20), S. 4632–4641. DOI: 10.1002/pmic.200900398.
- Zientara-Rytter, Katarzyna; Subramani, Suresh (2019): The Roles of Ubiquitin-Binding Protein Shuttles in the Degradative Fate of Ubiquitinated Proteins in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. In: *Cells* 8 (1). DOI: 10.3390/cells8010040.

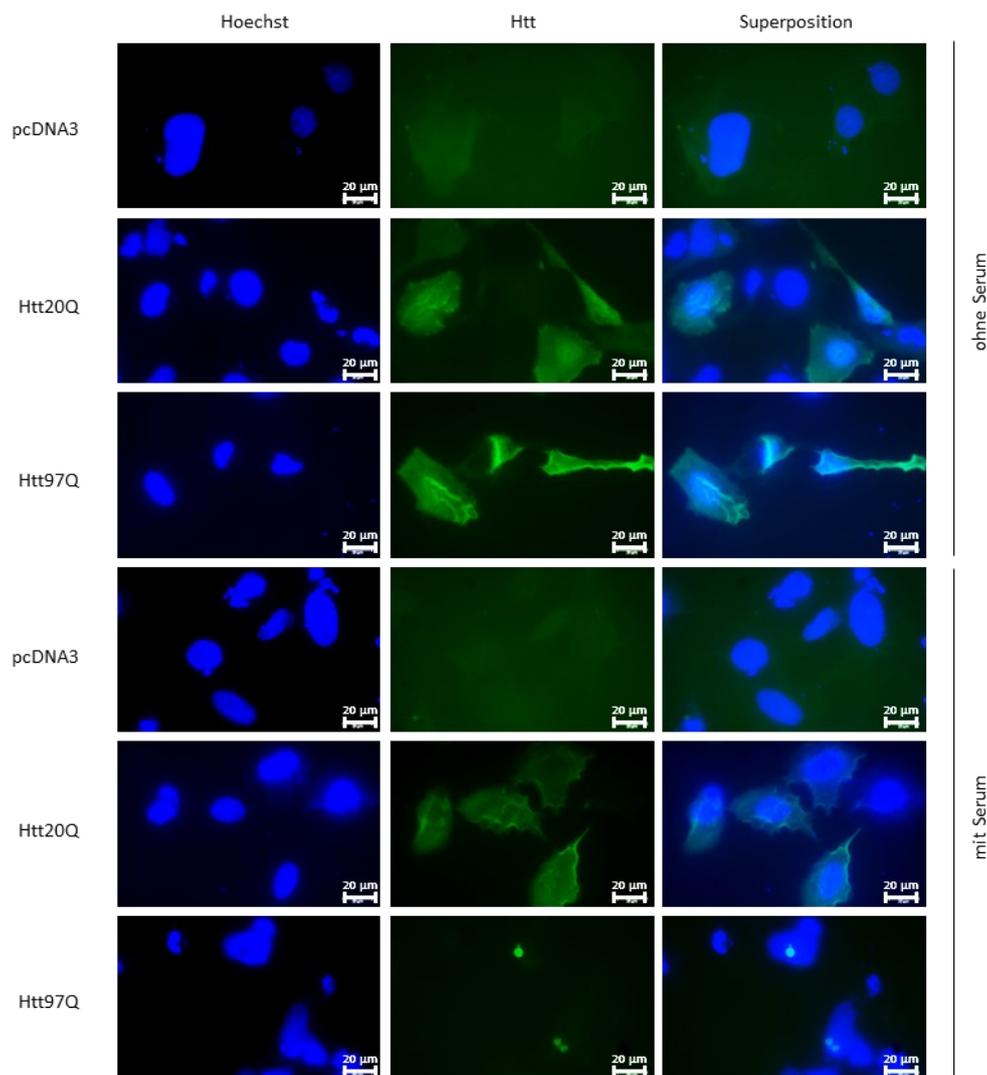


Abbildung S3: Etablierung der Expression von Exon 1 von Huntingtin in der Immunfluoreszenzmikroskopie bei einer Inkubationszeit von 48 h

U2OS Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q für 48 h unter Serumentzug oder mit Serum transfiziert. Dafür wurde das Transfektionsreagenz GeneJuice® verwendet. Die Detektion des HA-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe von anti-HA (Cell Signaling Technologies® #2367). Dabei zeigte die Transfektion mit Serum die für das pathologisch verlängerte Huntingtin typischen Aggregate.

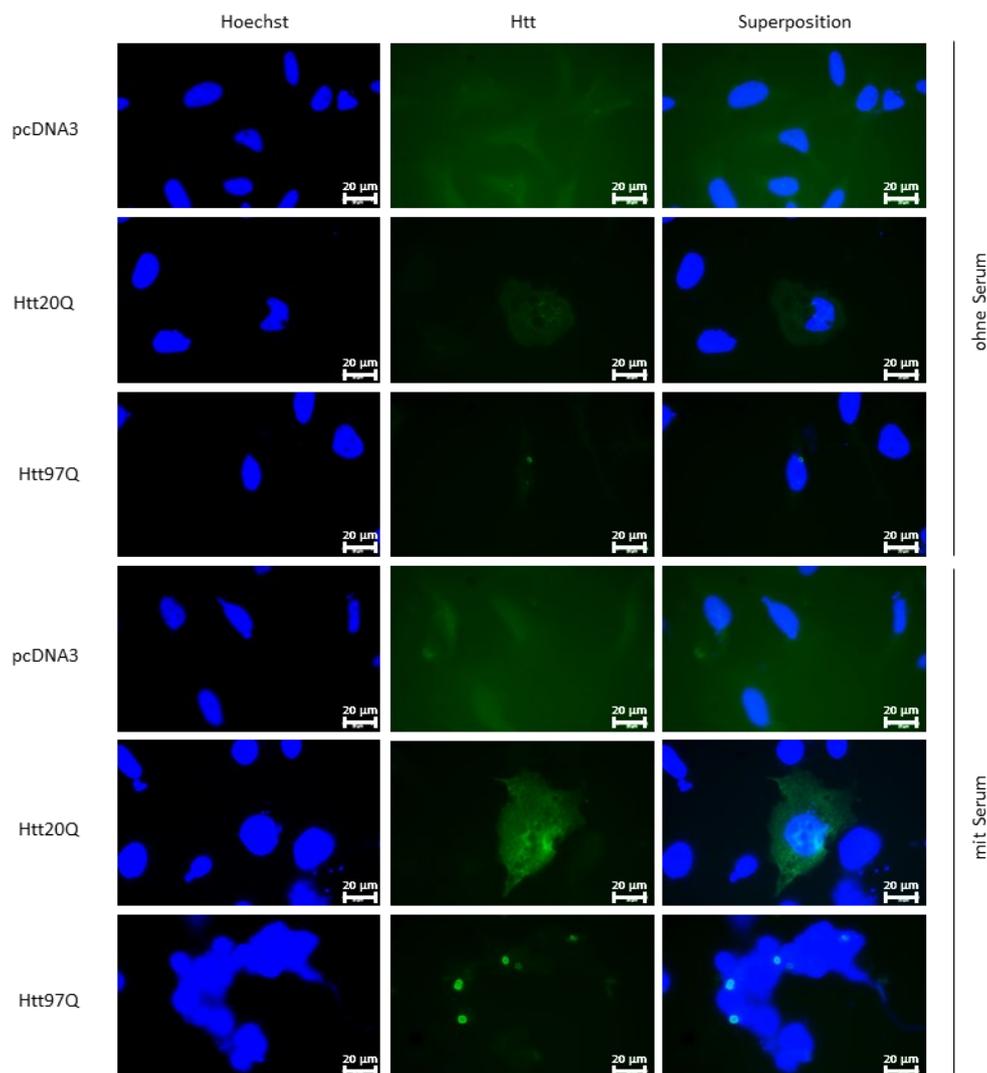


Abbildung S4: Etablierung der Expression von Exon 1 von Huntingtin in der Immunfluoreszenzmikroskopie bei einer Inkubationszeit von 72 h

U2OS Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q für 72 h unter Serumentzug oder mit Serum transfiziert. Dafür wurde das Transfektionsreagenz GeneJuice® verwendet. Die Detektion des HA-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe von anti-HA (Cell Signaling Technologies® #2367). Dabei zeigte die Transfektion mit Serum eine ausgeprägtere Fluoreszenz. Im Vergleich zu der Inkubationszeit von 48 h (Abbildung S3) ist eine etwas höhere Toxizität beobachtbar.

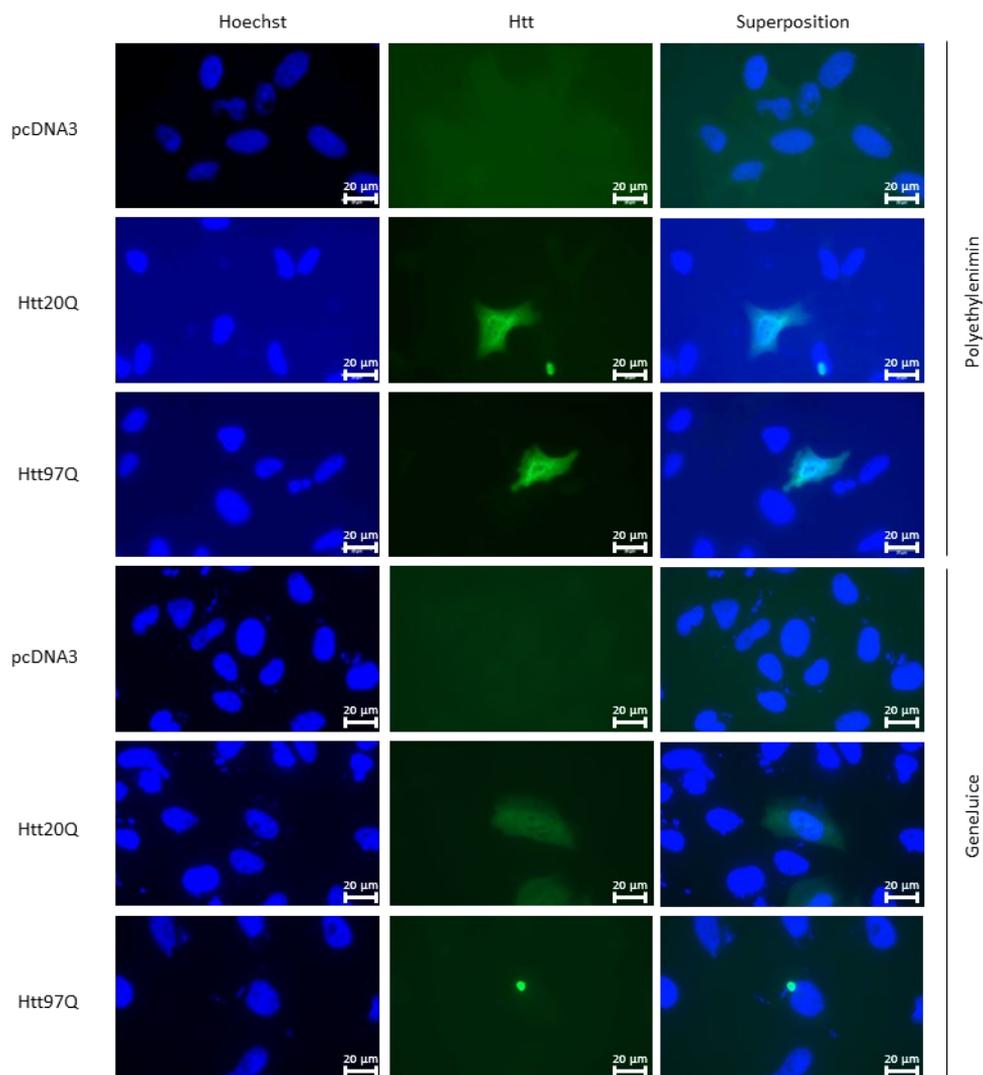


Abbildung S5: Etablierung der Expression von Exon 1 von Huntingtin in der Immunfluoreszenzmikroskopie mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien

U2OS Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q für 48 h mit Serum transfiziert. Dafür wurden die Transfektionsreagenzien GeneJuice® und Polyethylenimin verwendet. Die Detektion des HA-Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe von anti-HA (Cell Signaling Technologies® #2367). Dabei zeigte die Transfektion mit GeneJuice® die für das pathologisch verlängerte Huntingtin typischen Aggregate.

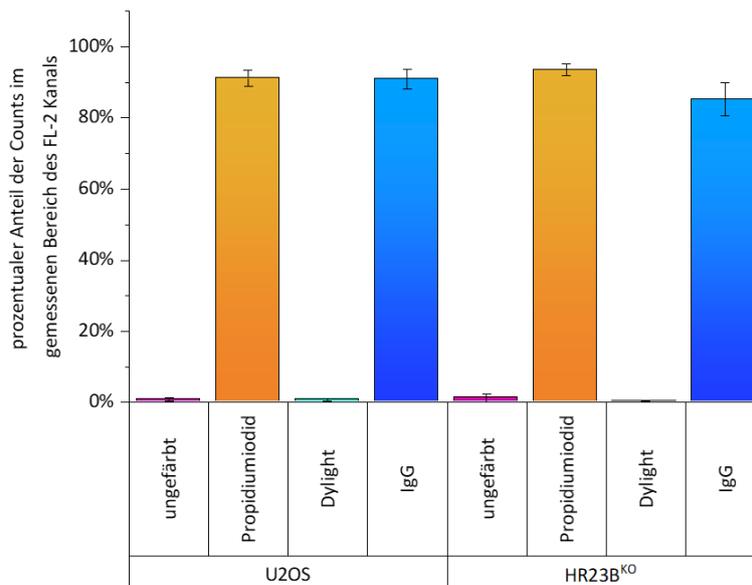


Abbildung S6: Kontrollen für die Zellzyklusmessung

Die Zellen wurden ungefärbt, nur mit Propidiumiodid gefärbt, nur mit Dylight gefärbt und mit Propidiumiodid und IgG-Kontrolle in der Durchflusszytometrie gemessen. Dabei konnte eine durch Dylight unspezifische Detektion im FL-2-Kanal ausgeschlossen werden ($n \geq 3$).

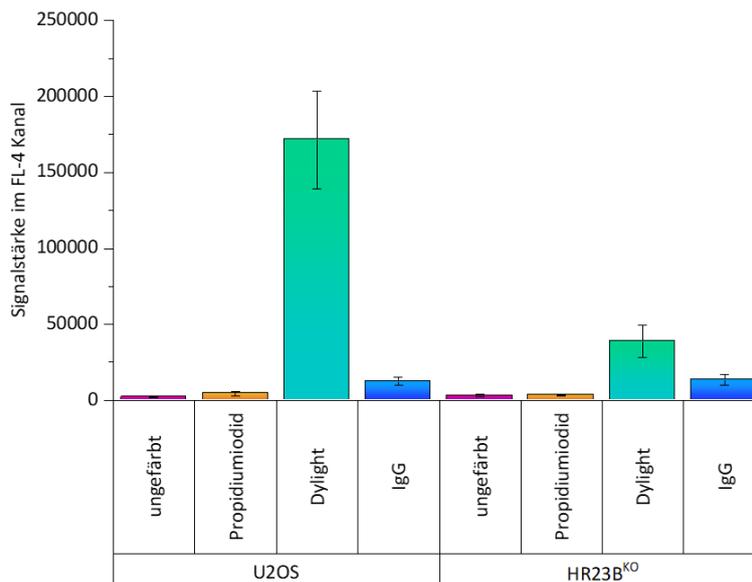


Abbildung S7: Kontrollen für die HR23B-Detektion in den einzelnen Zellzyklusphasen

Die Zellen wurden ungefärbt, nur mit Propidiumiodid gefärbt, nur mit Dylight gefärbt und mit Propidiumiodid und IgG-Kontrolle in der Durchflusszytometrie gemessen. Dabei konnte eine durch Propidiumiodid oder durch den Sekundärantikörper unspezifische Detektion im FL-4-Kanal ausgeschlossen werden. Der Knockout von HR23B zeigte wie zu erwarten eine Reduktion des HR23B-Signals ($n \geq 3$).

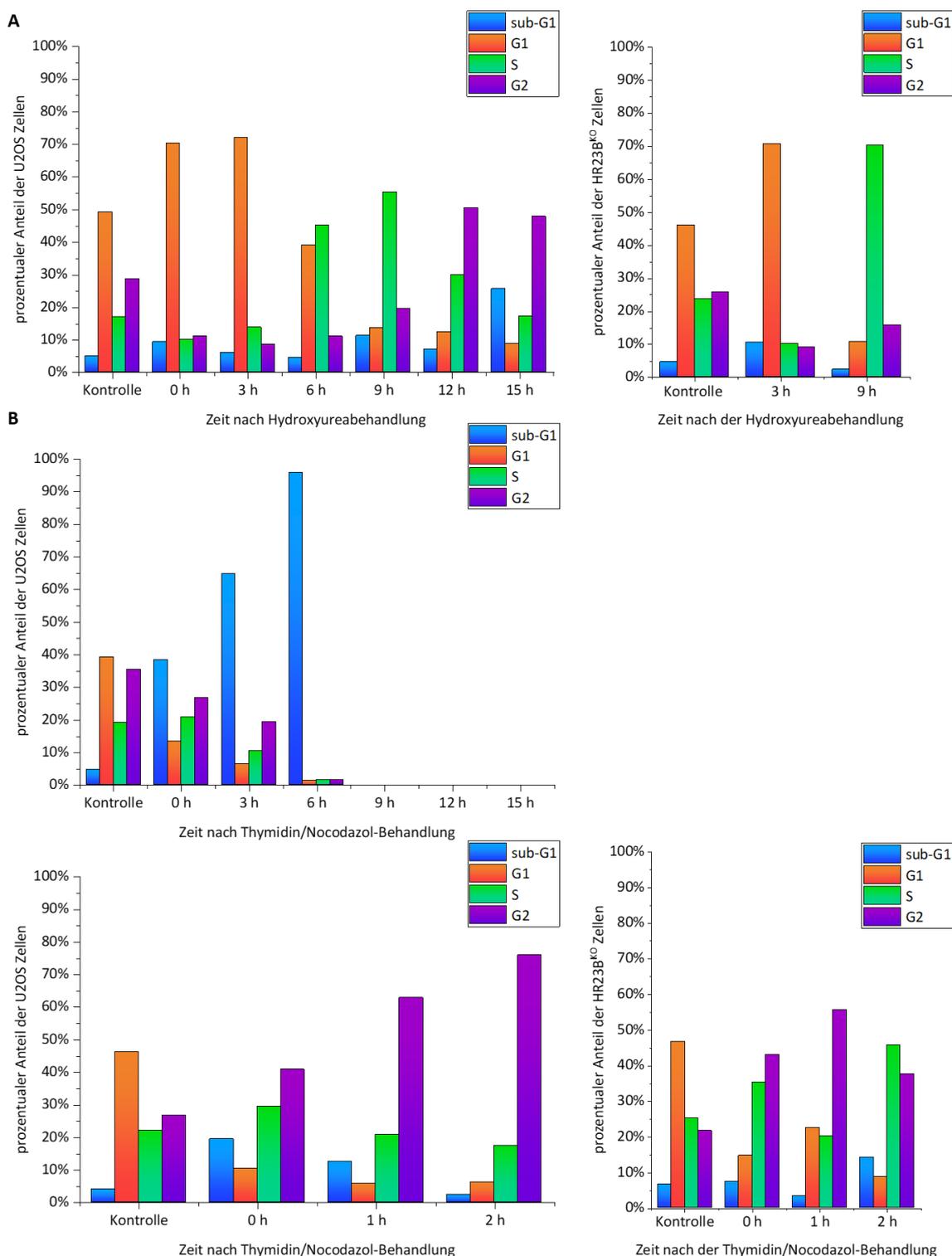


Abbildung S8: Etablierung der Synchronisation von U2OS und HR23B^{KO} Zellen

U2OS und HR23B^{KO} Zellen wurden Hydroxyurea (A) oder Thymidin/Nocodazol (B) behandelt und anschließend für unterschiedliche Zeiten in normalem Medium kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit Propidiumiodid gefärbt und in der Durchflusszytometrie (FL-2-Kanal) gemessen. Dabei befanden sich die meisten Zellen 3 h nach der Hydroxyureabehandlung in der G1-Phase und 9 h nach der Hydroxyureabehandlung in der S-Phase (A). Die Behandlung mit Thymidin/Nocodazol war toxisch, jedoch konnten die meisten U2OS Zellen 1 bis 2 h nach der Behandlung in der G2-Phase detektiert werden, die meisten HR23B^{KO} Zellen befanden sich 1 h nach der Behandlung in der G2-Phase, sodass sich im weiteren Verlauf für eine einstündige Inkubation der Zellen in normalem Medium entschieden wurde.

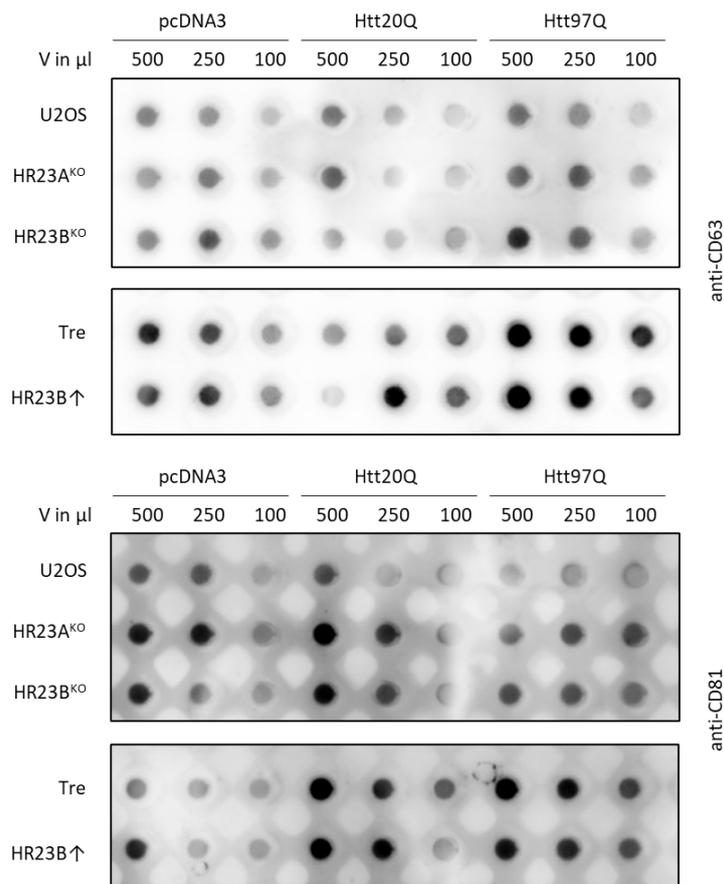


Abbildung S9: Nachweis der extrazellulären Vesikel im Überstand mittels Dot Blot

Die Zellen wurden mit den Konstrukten pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfiziert. Unterschiedliche Volumina ihrer Überstände wurden mittels Dot Blot auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und mit Hilfe der Antikörper anti-CD63 bzw. anti-CD81 detektiert.

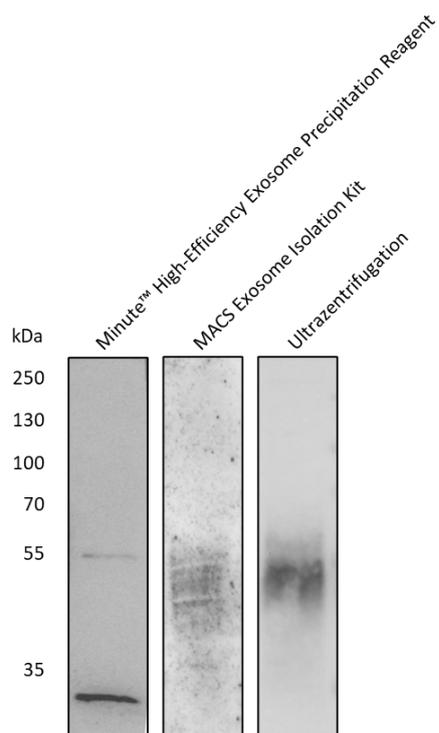


Abbildung S10: Vergleich der Aufreinigungsmethoden von extrazellulären Vesikeln

Die extrazellulären Vesikel wurden über verschiedene Methoden aufgereinigt und mittels anti-CD63 auf einer PVDF-Membran im Western Blot detektiert.

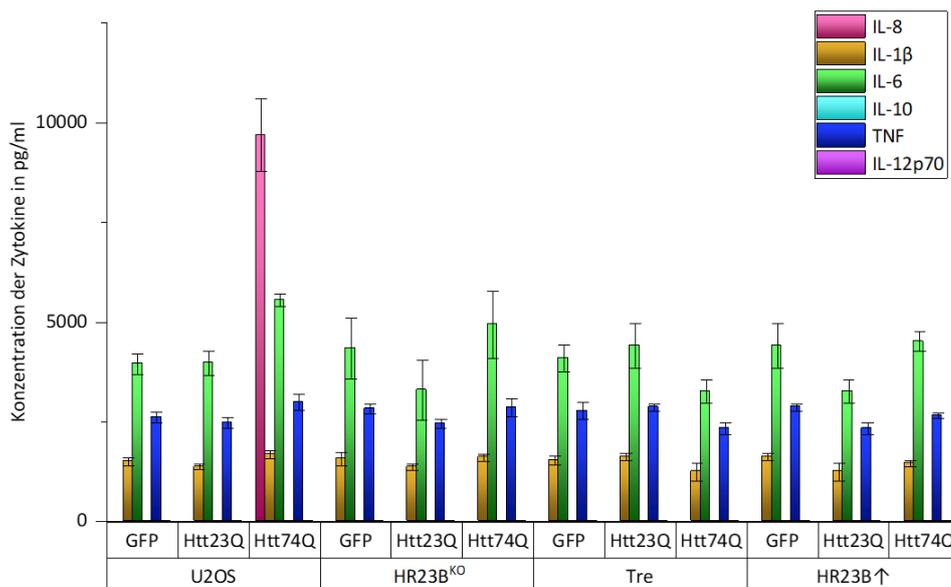


Abbildung S11: Überblick über die durch extrazelluläre Vesikel ausgeschüttete Zytokine von differenzierten THP-1 Zellen

U2OS, HR23B^{KO}, Tre und HR23B[↑] Zellen wurden mit pcGFP, Htt23Q und Htt74Q transfiziert und ihre extrazellulären Vesikel wurden aus dem Überstand isoliert. Diese wurde auf zu M1-Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen gegeben und ihre ausgeschütteten Zytokine mit Hilfe des CBA Human Inflammatory Cytokine Kit bestimmt.

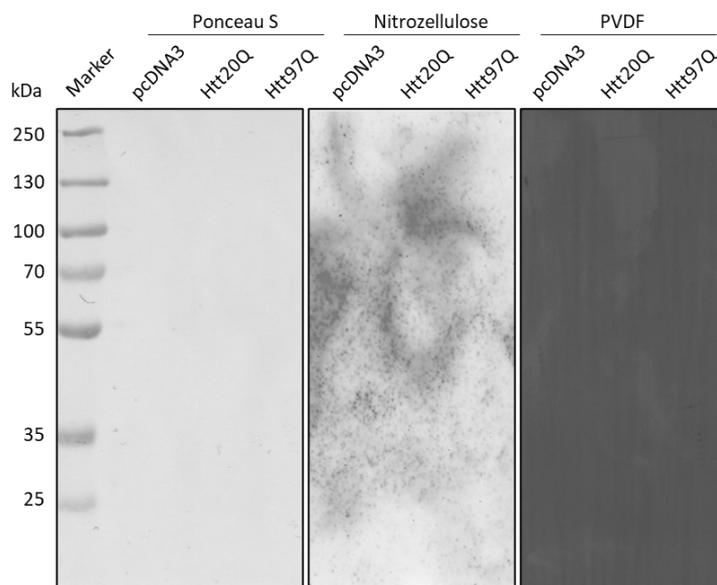


Abbildung S12: Aufreinigung der Huntingtinaggregate mittels Ultrazentrifugation

U2OS Zellen wurden mit pcDNA3, Htt20Q und Htt97Q transfiziert und lysiert. Die Huntingtinaggregate sollten mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt werden. Für den Nachweis wurden die Huntingtinaggregate im Western Blot mittels anti-HA analysiert, es konnten jedoch weder auf der Nitrozellulosemembran, noch auf der PVDF-Membran, Aggregate detektiert werden.

Wildtyp Typ C TCGGTGGGGGTTGTTGTAGC
Klon 26 Typ C TCGGTGGGGGTTGTTGTAGC
Klon 36 Typ C TCGGTGGGGGTTGTTGTAGC
Klon 39 Typ C TCGGTGGGGGTTGTTGTAGC

Abbildung S13: Sequenzierung der HR23A/B Doppelknockoutzellen

Die von Diana Panfilova erstellte Doppelknockoutzelllinie HR23A/B^{KO} wurde auf genomischer Ebene auf ihre Mutationen untersucht. Dabei konnte bei den getesteten Klonen 26, 36 und 39 kein Unterschied in Typ C festgestellt werden.

Publikationsliste

Kulka, Linda Anna Michelle; Fangmann, Pia-Victoria; Panfilova, Diana; Olzscha, Heidi (2020): Impact of HDAC Inhibitors on Protein Quality Control Systems: Consequences for Precision Medicine in Malignant Disease.

In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 425.

DOI: 10.3389/fcell.2020.00425.

Ebner, Fabian, **Gehre, Linda Anna Michelle**, Tallian Claudia (2016): *Naturstoffe und Biochemie. Essentials*. Springer Verlag

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name Linda Anna Michelle Kulka (geb. Gehre)
 Wohnort
 Geburtsdatum 04.09.1996
 Geburtsort Leipzig

Ausbildung

11/2019 – heute **Promotion**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (GRK ProMoAge)
 10/2017 – 09/2019 **M.Sc. Biochemie**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Master of Science
 10/2014 – 09/2017 **B.Sc. Biochemie**, Universität Leipzig
 Bachelor of Science
 09/2006 – 07/2014 **Wiprecht-Gymnasium Groitzsch**, Leistungskurse: Mathe und Physik
 Allgemeine Hochschulreife
 Buchpreis der Deutschen Physikalischen Gesellschaft für hervorragende Leistungen im Fach Physik und DPG Abiturpreis für sehr gute Leistungen im Fach Physik aus dem eine einjährige Mitgliedschaft in der DPG folgte

Berufserfahrung

11/2019 – heute **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, Institut für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 09/2019 – 10/2019 **Assistent der Buchhaltung**, EWINOX Heiztechnik GmbH
 07/2018 – 09/2018 **Servicekraft**, Pinguin Eisbar Leipzig
 03/2018 – 06/2018 **Aushilfe**, Gärtnerei Gebrüder Neidhardt
 06/2015 – 08/2017 **Studentische Hilfskraft**, Institut für Virologie, Universitätsklinikum Leipzig
 05/2014 – 09/2014 **Aushilfe im Verkauf**, C&A

Weiterbildungen und Praktika

03/2017 **GMP Seminar** für Studenten, Universität Leipzig
 09/2017 – 10/2017 **Auslandspraktikum**, Vancouver Infection Diseases Centre
 02/2017 – 03/2017 **Praktikum**, Labor für medizinische Mikrobiologie Mölbis
 07/2014 **Praktikum**, Selbstständigen Abteilung für Klinische Forschung Leipzig
 07/2013 – 08/2013 **Praktikum**, Leipziger Arzneimittelwerk
 10/2012 **Schülerferienakademie "Akten XY-Was die DNA aussagt"**, InstaG GmbH
 07/2012 – 08/2012 **Sprachreise**, internationale Sprach- und Studienreisen, Antibes Frankreich
 10/2011 – 02/2012 **Programmierung einer Website**, "www.ewinox.de"

Engagement

Seit 2021 **Ehrenamtliche Tätigkeit als Wahlhelfer**, Stadt Zwenkau
 Seit 2015 **Mitglied der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie**,
 2015 – 2019 jGBM Leipzig
 Seit 2006 **Ehrenamtliche Tätigkeit**, Heimatverein Zitzschen

Unterschrift

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Heidi Olzscha und Herrn Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte bedanken, die es mir ermöglicht haben im Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zu promovieren, sowie ein Teil des Graduiertenkollegs ProMoAge zu sein. Prof. Dr. Heidi Olzscha danke ich vor allem für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen. Weiterhin bot sie mir immer wieder großartige Möglichkeiten an, die zu meiner eigenen Entwicklung beitragen konnten. Nicht zuletzt möchte ich mich bei ihr für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken. Auch Herrn Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte danke ich für die konstruktiven Ratschläge und Unterstützung bei Problemen. Seine Arbeitsgruppenleitung sorgt für ein unglaublich angenehmes Arbeitsklima, welches ich sehr genossen habe.

Des Weiteren gilt Frau PD Dr. Iris Thondorf mein Dank, die sich zur Betreuung als Gutachterin für das Institut für Biochemie und Biotechnologie bereit erklärt hat.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz von der Friedrich-Schiller-Universität Jena für seine Gutachtertätigkeit danken, sowie für seine betreuende Rolle im Graduiertenkolleg ProMoAge.

Dem Graduiertenkolleg ProMoAge (GRK 2155) danke ich für die Finanzierung des Projekts und die zahlreichen Möglichkeiten der eigenen Weiterbildung. Dazu zählten vor allem der Austausch über die Workshops, Kooperationen innerhalb des Graduiertenkollegs und die Finanzierung der Teilnahme an Konferenzen und Seminaren.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Alexander Navarrete Santos, Dr. Matthias Jung und Carla Hartmann für die Unterstützung bei der Bestimmung der Oberflächenproteine auf den extrazellulären Vesikeln bedanken, sowie bei Dr. Virginie Dubourg für die Einführung am *High-Content* Operetta Analysesystem.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe für die außerordentliche Arbeitsatmosphäre bedanken, die sowohl zu einem regen Austausch über fachliche Themen als auch zu schönen Erinnerungen außerhalb der Arbeit führte. Besonderen Dank möchte ich dabei Annett Thate aussprechen, welche meine Experimente während meiner Schwangerschaft übernommen hat. Weiterhin möchte ich mich bei Judith Riemer, Diana Panfilova, Alexander Braig, Mai-Binh Nguyen, Helena Grebenchuk und Lara Peters bedanken, die durch unsere Zusammenarbeit meine Promotion vorangetrieben haben.

Judith Riemer und Tina Weiß möchte ich ebenfalls dafür danken, dass sie sich die Zeit genommen haben, meine schriftliche Arbeit zu korrigieren.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, der ich die Arbeit widme. Mein Ehemann Xaver Kulka hat mir während der letzten Jahre immer wieder Rückhalt gegeben und mich in herausfordernden Zeiten aufgemuntert. Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich vor allem für die bedingungslose Unterstützung und die Beratungen in jeder Lebenslage.

Diese Arbeit wurde von der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) über das GRK 2155 (ProMoAge) gefördert.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde und keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden.

Ort, Datum

Unterschrift