

Aus dem
Universitätsklinikum Tübingen
Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik

***Das striatale* Transkriptom der Chorea Huntington
im Kontext von Verhalten, Umwelt und Alter:
Implementierung eines netzwerkanalytischen
Ansatzes im transgenen Tiermodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Kilzheimer, Alexander

2026

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Kahle

3. Berichterstatter: Prof. Dr. I. Kurth

Tag der Disputation: 11.12.2025

Meiner Familie gewidmet,

die mir Papier und Stift schenkte, um meine eigene Geschichte zu schreiben.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| Tabellen- und Abbildungsverzeichnis | 7 |
| 1 Einleitung | 9 |
| 1.1 Genetik und Pathophysiologie der Huntington-Erkrankung | 9 |
| 1.2 Epidemiologie | 12 |
| 1.3 Klinisches Bild der Huntington-Erkrankung | 12 |
| 1.3.1 Motorische Beschwerden | 13 |
| 1.3.2 Kognitive Einschränkungen | 13 |
| 1.3.3 Weitere neuropsychiatrische Symptome | 14 |
| 1.3.4 Prognose | 14 |
| 1.4 Variabilität im Verlauf der Huntington-Erkrankung | 14 |
| 1.5 Simulierung putativ schützender Lebensstileinflüsse im Tiermodell: das <i>enriched environment</i> | 16 |
| 1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit | 21 |
| 1.7 Studiendesign und Hypothesen | 22 |
| 2 Material und Methoden | 25 |
| 2.1 Datengewinnung und genutzte Programme | 25 |
| 2.1.2 Aufzucht, Haltung und Umweltbedingungen | 25 |
| 2.1.3 Isolation und Sequenzierung der RNA | 26 |
| 2.1.4 Zusätzlich genutzte Expressionsdaten | 27 |
| 2.1.5 Verwendete Programme | 27 |
| 2.2 Verhaltenstests | 28 |
| 2.2.1 Gewichtsentwicklung | 28 |
| 2.2.2 <i>Simple swim test</i> (SST) | 28 |
| 2.2.3 <i>Elevated plus maze</i> (EPM) | 28 |
| 2.2.4 PhenoMaster | 29 |
| 2.2.5 Statistische Analyse der Verhaltensmessung | 29 |
| 2.3 (Ko)Expressionsanalyse | 30 |
| 2.3.1 Netzwerkkonstruktion | 30 |
| 2.3.2 <i>Konservierungsanalyse (module preservation)</i> | 31 |
| 2.3.3 Differentielle Expressionsanalyse | 32 |
| 2.3.4 <i>Over-representation analysis</i> | 32 |
| 2.3.5 Weitere statistische Verfahren | 33 |
| 3 Ergebnisse | 34 |
| 3.1 Publierte Ergebnisse im Rahmen der Promotion | 34 |

| | |
|---|-----|
| 3.2 Verwendete Nomenklatur | 34 |
| 3.3.1 Gewichtszunahme in der frühen Entwicklung | 34 |
| 3.3.2 <i>Simple swim test</i> (SST) | 36 |
| 3.3.3 <i>Elevated plus maze</i> (EPM) | 39 |
| 3.3.4 PhenoMaster Aktivität (PM) | 41 |
| 3.3.5 Zusammenfassung der Analyse der Verhaltensdaten..... | 45 |
| 3.4 Bestimmung der Koexpression und mHTT-induzierter transkriptioneller Dysregulation | 45 |
| 3.4.1 Generierung des Koexpressionsnetzwerks..... | 45 |
| 3.4.2 Reproduzierbarkeit und Stabilität der identifizierten Module | 48 |
| 3.4.3 Komparative Validierung der Netzwerkmodule mit den Ergebnissen einer globalen differentiellen Expressionsanalyse | 50 |
| 3.4.4 Modul-Selektion..... | 52 |
| 3.4.5 Module <i>Cyan</i> und <i>Purple</i> | 53 |
| 3.4.6 Zwischenergebnis: Striatale Dysregulation durch <i>mHTT</i> | 59 |
| 3.5 Alterseffekte in Bezug auf striatale Dysregulation | 59 |
| 3.5.1 Differentielle Expression in der sechs Monate alten Kohorte | 59 |
| 3.5.2 Alterseffekte in den Pseudotrajektorien | 60 |
| 3.6 Modifikation mHTT-induzierter Dysregulation durch <i>environmental enrichment</i> 61 | |
| 4 Diskussion | 67 |
| 4.1 Zusammenfassung und Kontextualisierung der Ergebnisse | 67 |
| 4.2 Identifikation potenzieller Kandidatengene | 73 |
| 5 Zusammenfassung | 78 |
| Appendix | 82 |
| Literaturverzeichnis | 89 |
| Erklärung zum Eigenanteil | 110 |
| Veröffentlichungen | 111 |
| Danksagung | 112 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| (r)ANOVA | (robuste) Varianzanalyse / (robust) analysis of variance |
| BACH | bacterial artificial chromosome |
| BF | Bayes-Faktor |
| CAA | Cytosin-Adenin-Adenin-Trinukleotidsequenz |
| CAG | Cytosin-Adenin-Guanin-Trinukleotidsequenz |
| DEG | differentially expressed gene |
| EE | environmental enrichment / enriched environment |
| EPM | elevated plus maze |
| H_0 bzw. H_1 | Null- bzw. Alternativhypothese |
| HD | Huntington's disease |
| <i>(m)HTT</i> | (mutiertes) Huntingtin-Gen |
| KA | körperliche Aktivität |
| KAL | kognitiv aktiver Lebensstil |
| LFC | \log_2 fold change |
| MR | Magnetresonanztomographie |
| MSN | medium spiny neuron |
| ORA | over-representation analysis |
| PM | PhenoMaster |
| SE | standard environment |
| SST | simple swim test |
| TOM | topological overlap measure |
| UHDRS | Unified Huntington's Disease Rating Scale |
| WGCNA | weighted gene co-expression network analysis |
| WT | Wildtyp |
| YAC128 | yeast artificial chromosome |

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Stichprobenbeschreibung der verwendeten Daten aus Hodges et al. (2006).

Tabelle 2: Interpretation des Bayes Faktors.

Tabelle 3: Interpretation der Z_{summary} Statistik.

Tabelle 4: Verwendete Kürzel zur Bezeichnung der jeweiligen Versuchsgruppe.

Tabelle 5: Gewichtsentwicklung in den Versuchsbedingungen während der ersten 22 Lebenswochen.

Tabelle 6: Ergebnisse der reverse trials des Simple Swim Test (SST-RT).

Tabelle 7: Ergebnisse des acquisition training des Simple Swim Test (SST-AT).

Tabelle 8: Ergebnisse des Elevated Plus Maze.

Tabelle 9: Lokomotorische Aktivität während der Dunkelphase.

Tabelle 10: Lokomotorische Aktivität während der Hellphase.

Tabelle 11: Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität während der Dunkelphase zwischen zwölf Monate alten BACHD und WT Tieren in Abhängigkeit der Haltungsbedingung.

Tabelle 12: Netzwerk-Indizes für verschiedene Exponenten γ der Potenzfunktion.

Tabelle 13: Charakteristika der Module mit signifikanter Eigengen-Genotyp Korrelation.

Tabelle 14: Konservierung der ausgewählten Module in anderen Datensätzen.

Tabelle 15: Aggregation der Konservierungsanalysen in Ratte, Maus und Mensch.

Tabelle 16: Anreicherung der Netzwerk-Module mit DESeq2 Genen.

Tabelle 17: Differentielle Expression in Abhängigkeit von Genotyp und Haltungsbedingung.

Tabelle 18: Mittlere Ränge der relativen Expressionsveränderungen der Modulgene zwischen WT und BACHD Tieren in Abhängigkeit der Haltungsbedingung.

Abbildung 1: Käfiggestaltung unter *environmental enrichment* Haltungsbedingungen.

Abbildung 2: Gewichtsentwicklung der Experimentalgruppen in den ersten 22 Lebenswochen.

Abbildung 3: *Time to platform* im reverse trial des Simple Swim Test (Sechsmonatskohorte).

Abbildung 4: *Time to platform* im reverse trial des Simple Swim Test (Zwölfmonatskohorte).

Abbildung 5: *Time in open arms* im *Elevated Plus Maze* (EPM) in der Zwölfmonatskohorte.

Abbildung 6: Zurückgelegte mittlere Distanz in der Sechsmonatskohorte (Dunkelphase).

Abbildung 7: Zurückgelegte mittlere Distanz in der Zwölfmonatskohorte (Dunkelphase).

Abbildung 8: Segmentierung der Genexpression in Koexpressionsmodule.

Abbildung 9: Unterschiede der Eigenen-Expression ausgewählter Module nach Genotyp.

Abbildung 10: Verteilung der globalen differentiellen Genexpression im Koexpressionsnetzwerk.

Abbildung 11: Zusammenhang *module membership* und *gene significance* (Modul Cyan)

Abbildung 12: Zusammenhang *module membership* und *gene significance* (Modul Purple).

Abbildung 13: Heatmap der relativen Veränderung der Expression von Genen zwischen den Genotypen (Modul Cyan).

Abbildung 14: Funktionelle Anreicherung der differentiell exprimierten Gene in Modul Cyan.

Abbildung 15: Heatmap der relativen Veränderung der Expression von Genen zwischen den Genotypen (Modul Purple).

Abbildung 16: Funktionelle Anreicherung der differentiell exprimierten Gene in Modul Purple.

Abbildung 17: Differentielle Genexpression in den Sechsmonatskohorten (Module Cyan und Purple).

Abbildung 18: Alterseffekte in den betrachteten Pseudotrajektorien.

Abbildung 19: Reduktion der differentiellen Genexpression in den Modulen Cyan und Purple.

Abbildung 20: Veränderung von Modul Cyan und Modul Purple DEGs in beiden *enriched environment* Bedingungen zum Zwölfmonatszeitpunkt.

Abbildung 21: Expressionsprofil *Mbp* in den Versuchsbedingungen.

Abbildung 22: Expressionsprofil *Mag* in den Versuchsbedingungen.

Abbildung 23: Expressionsprofil *Cryab* in den Versuchsbedingungen.

Abbildung 24: Expressionsprofil *Dnm2* in den Versuchsbedingungen.

1 Einleitung

1.1 Genetik und Pathophysiologie der Huntington-Erkrankung

Chorea Huntington (MIM: 143100), auch Morbus Huntington, Veitstanz oder Chorea major genannt und im Folgenden nach der englischen Bezeichnung *Huntington's disease* mit HD abgekürzt, ist eine monogenetische neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, welche erstmals 1872 von George Huntington beschrieben wurde (Huntington, 1872). Die Krankheit folgt einem autosomal-dominantem Erbgang. Ursächlich ist eine Mutation in Exon 1 des Huntingin Gens (*HTT*) auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (4p16.3), bei der es zu einer Repeat-Expansion der dort in variabler Anzahl vorhandenen Cytosin-Adenin-Guanin-Trinukleotidsequenz (CAG) kommt, welche für die Aminosäure Glutamin (GLN, Q) kodiert. Während Repeat-Längen bei nicht Erkrankten im Bereich von 9 bis 35 CAG-Wiederholungen liegen und einen Verteilungsschwerpunkt von 17 bis 20 Repeats aufweisen, führen Sequenzlängen zwischen 36 und 39 Trinukleotiden mit verminderter Penetranz und Längen ab 40 CAG-Einheiten mit voller Penetranz zur Manifestation von HD (Rubinsztein et al., 1996; Bates et al., 2015; Thion et al., 2016; Talukder et al., 2021). 27 bis 35 CAG-Repeats stellen ein hochnormales Intervall dar (Huntington's Disease: A Clinical Review, 2018), bei dessen Trägerschaft ein Risiko zur Ausbildung isolierter HD-Symptome diskutiert wird (Killoran et al., 2013; Savitt & Jankovic, 2019; Semaka & Hayden, 2014; Stoker et al., 2021).

Aufgrund ihrer Repetitivität ist die genaue Zahl der CAG-Wiederholungen mit zunehmender Länge vermehrt anfällig für Replikationsfehler. Insbesondere ab dem hochnormalen Bereich liegt eine zunehmende Replikationsinstabilität vor, die in drei von vier Fällen eine weitere Expansion der CAG-Repeats in den Gameten bewirkt (MacDonald et al., 1999; Leeflang et al., 1995; Chattopadhyay et al., 2005; Djoussé et al., 2004; Semaka et al., 2010). Dies führt zu Antizipationsphänomenen (Ridley et al., 1988; Ranen et al., 1995). So können phänotypisch unauffällige Menschen mit hochnormaler CAG-Wiederholungssequenz Nachfahren zeugen, die eine weiter verlängerte Repeat-Expansion auf einem *HTT*-Allel aufweisen und bei denen sich folglich trotz zweier gesunder Elternteile eine HD manifestiert. Auch zeigen Nachfahren von an HD erkrankten Personen tendenziell einen früheren Krankheitsbeginn mit rascherer Progression, sofern das pathogene *HTT*-Allel an sie weitergegeben wurde. Bei der Antizipation zeigt sich ein deutlicher Geschlechtereffekt. So scheint die Spermatogenese besonders anfällig für CAG-Instabilität zu sein, da sich transgenerationale Repeat-Expansionen vornehmlich bei

Vererbung des betroffenen Allels über die paternale Linie finden (Telenius et al., 1994; Wheeler et al., 2007; Aziz et al., 2011; Chao et al., 2017; Fusilli et al., 2018).

Das Wildtyp Huntingtin-Protein (HTT) gehört mit einer Molekülmasse von etwa 348 kDa zu den größten Proteinen des menschlichen Organismus (Saudou & Humbert, 2016; Seefelder et al., 2022). Es liegt ubiquitär im Organismus vor, wobei es im Nervensystem am stärksten exprimiert wird, dort sowohl von Neuronen als auch Gliazellen (Li et al., 1993; Strong et al., 1993; Landwehrmeyer et al., 1995; Sapp et al., 1997; Marques Sousa & Humbert, 2013; Saudou & Humbert, 2016; Stoker et al., 2022). HTT ist mehrheitlich im Cytoplasma lokalisiert, findet sich allerdings auch im Nucleus (Saudou & Humbert, 2016). HTT übt eine Vielzahl von physiologischen Funktionen aus, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Als zentral wird eine Rolle als Gerüstprotein in enger funktioneller Verbindung mit dem Cytoskelett angenommen (Vitet et al., 2020). Saudou & Humbert (2016) geben eine Übersicht über die beobachteten Funktionen von HTT im Zusammenspiel mit über 350 bisher bekannten Interaktionspartnern. Es steht in Zusammenhang mit dem intrazellulären Transport von Vesikeln und Organellen (Velier et al., 1998; Gauthier et al., 2004; Saudou & Humbert, 2016), der Ausrichtung des Spindelapparats im Rahmen der Mitose (Godin et al., 2010; Elias et al., 2014), der Ciliogenese (Keryer et al., 2011; Haremaki et al., 2015) sowie Clathrin-vermittelter Endocytose (El-Daher et al., 2015; Saudou & Humbert, 2016). In seiner Gerüstfunktion unterstützt es daneben wesentlich eine Reihe von Enzymen, etwa die *Ataxia Telangiectasia Mutated* Kinase, einem zentralen Regulator von DNA-Reparaturmechanismen (Maiuri et al., 2017). Auch unterstützt es die Autophagie, indem es die Zuführung von Zellmaterial zu Autophagosomen erleichtert, deren Transport reguliert und an der Induktion selektiver autophagaler Prozesse beteiligt ist (Wong & Holzbaur, 2014; Saudou & Humbert, 2016; Vitet et al., 2020). Daneben wirkt es über Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren, -aktivatoren, -repressoren und Wachstumsfaktoren als Regulator an der Expression einer Vielzahl von Genen mit, beispielhaft über die Beeinflussung von BDNF, CREB, NF- κ B sowie p53 und deren assoziierten Signalwegen (Saudou & Humbert, 2016). Hierdurch ist es involviert in eine Vielzahl von Prozessen wie der Kontrolle des Zellzyklus, der Reaktion auf zellulären Stress, der Entwicklung und Erhaltung von Nervenzellen und Chromatin *remodeling* (Zuccato et al., 2001; Saudou & Humbert, 2016; Barnat et al., 2020).

Im Rahmen von HD kommt es zur Translation von mutiertem Huntingtin (mHTT). Dieses weist eine von der Länge der CAG-Sequenz im pathogenen *HTT* Gen abhängige Vergrößerung des Polyglutamintrakts (polyQ-Trakt) am N-Terminus auf (MacDonald et al., 1993). Anders als der

Polyglutamintrakt des Wildtyp HTT ist der des mHTT schwer löslich und aggregiert in Neuronen zu intrazellulären Einschlusskörpern mit in der Regel fibrillärer Struktur, wobei die Geschwindigkeit der Akkumulation maßgeblich von der Länge der polyQ-Einheit abhängt (Perutz et al., 1994; DiFiglia et al., 1997; Becher et al., 1998; Rüb et al., 2016; Stoker et al., 2022). Ob diese Aggregate für den Pathomechanismus bedeutend sind, aus einer protektiv ausgerichteten Zellantwort resultieren oder ein Nebenprodukt ohne kausalen Einfluss darstellen, ist noch nicht abschließend geklärt (Scherzinger et al., 1999; Arrasate & Finkbeiner, 2012; Folger & Wang, 2021). Die höhere Zahl an CAG-Wiederholungen führt möglicherweise auch zu einem aberranten Splicing und Entstehen eines toxischen Exon 1 mHTT Rumpfpotein (Sathasivam et al., 2013). Im Zentrum der Pathophysiologie von HD stehen durch die Mutation bedingte toxische Funktionszugewinne des mHTT (Stoker et al., 2022), die zur Schädigung und schließlich Degeneration vulnerabler Neurone führen. mHTT-Toxizität wird dabei über mehrere Mechanismen vermittelt, nach heutiger Vorstellung insbesondere über Exzitotoxizität, dopaminerge Dysfunktion, oxidativen Stress, schädigende Effekte auf Proteostase, axonalen Transport, Autophagie, Transkription und Translation, sowie mitochondriale und synaptische Funktionen (Cha, 2007; Ross & Tabrizi, 2011; Kumar et al., 2014; Bates et al., 2015a; McColgan & Tabrizi, 2018; Soares et al., 2019; Kim et al., 2021). Der Verlust bzw. die Reduktion der Wildtyp Funktion als zusätzlicher beitragender Kofaktor wird diskutiert (Paine, 2015).

HD führt zu Veränderungen in einer Reihe von Hirnregionen, wobei das Striatum den zentralen Schädigungsort darstellt (Halliday et al., 1998; Waldvogel et al., 2014). Die dortigen GABAergen Projektionsneurone, sogenannte medium spiny neurons (MSNs), degenerieren in einem typischerweise biphasischen Prozess, bei dem zunächst die MSNs der indirekten und später der direkten Bahn der Basalganglienschleife untergehen (Papoutsis et al., 2014; Plotkin & Surmeier, 2015). MSNs machen etwa 95% der striatalen Zellpopulation aus (Ehrlich, 2012), im Hirnparenchym von HD Patienten imponiert entsprechend eine bilaterale Atrophie der Basalganglien (Huntington's Disease: A Clinical Review, 2018). Am frühesten zeigt sich die Degeneration dabei am Caput nuclei caudati (Stoker et al., 2022). Der Schwerpunkt der striatalen Veränderungen liegt im Bereich des Neostriatums, d.h. des Ncl. caudatus und des Putamens, während Ncl. accumbens und Globus Pallidus erst im Verlauf sowie in geringerer Ausprägung betroffen sind (Vonsattel & DiFiglia, 1998). Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es auch zu Atrophien im Bereich des zerebralen Kortex, Hypothalamus, Thalamus, Ncl. subthalamicus, Kleinhirn und der weißen Substanz, bei letzterer vordringlich im frontalen

Marklager (Vonsattel et al., 1985; Halliday et al., 1998; Tabrizi et al., 2011; Paulsen et al., 2014; Johnson & Gregory, 2019; van Wamelen & Aziz, 2021).

1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz von HD zeigt global deutliche Unterschiede zwischen den Weltregionen in Abhängigkeit von der jeweiligen ethnischen Zusammensetzung. Bedingt durch das unterschiedliche Vorkommen der verschiedenen HTT-Allele in der jeweiligen Population variiert die durchschnittliche Länge der CAG-Sequenz (Huntington's Disease: A Clinical Review, 2018). Während etwa europäischstämmige Personen eine mittlere CAG-Länge von 18.4 – 18.7 Wiederholungen aufweisen, liegt diese Zahl für Menschen mit ostasiatischer Herkunft bei 17.5 – 17.7 und bei Personen mit afrikanischer Provenienz bei 16.9 – 17.4 (Huntington Disease, 2015). Dies übersetzt sich in divergierende Prävalenzraten von HD. So finden sich in dominant europäischstämmigen Populationen Prävalenzen von 10.6 – 13.7 Erkrankten pro 100 000 Personen, in Japan, Taiwan und Hong Kong zeigen sich mit 0.1 – 0.7 Erkrankten pro 100 000 Einwohnenden deutlich geringere Raten (Huntington's Disease: A Clinical Review, 2018). In der kanadischen Provinz British Columbia erkrankten Menschen europäischer Abstammung wesentlich häufiger an HD als die übrigen Teile der Bevölkerung (17.2 versus 2.1 Krankheitsfälle auf 100 000 Personen; Fisher & Hayden, 2014). Ähnliche Unterschiede zeigen sich in Südafrika zwischen europäisch- und afrikanischstämmigen Bevölkerungsgruppen (Hayden et al., 1980).

1.3 Klinisches Bild der Huntington-Erkrankung

HD manifestiert sich typischerweise zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr und betrifft Frauen wie Männer in gleichem Maße (Nguyen & Weydt, 2018; Schwarz, 2020). Das Erkrankungsalter korreliert dabei invers mit der Anzahl der CAG repeats im *HTT* Gen. Goldberg und KollegInnen quantifizieren die Stärke dieses linearen Zusammenhangs mit etwa $r = .70$ (Andrew et al., 1993). Die Mehrzahl der PatientInnen weist eine repeat Expansion im Bereich zwischen 40 und 50 Trinukleotiden auf, deutlich höhere Wiederholungsraten von 70 bis 100 führen zu juvenilem HD mit einer entsprechend früheren Krankheitsmanifestation im Kindes- und Jugendalter (Andrew et al., 1993; Persichetti et al., 1995).

Die möglichen Symptome der HD teilen sich in drei Krankheitsaspekte, namentlich motorische, kognitive und weitere neuropsychiatrische Befunde. Eine standardisierte Einschätzung des klinischen Schweregrads kann über Testskalen erfolgen; die Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS; Kiebertz, 1996) findet hierbei breite Verwendung. Zu Beginn zeigen sich milde, aber kontinuierlich voranschreitende psychopathologische Veränderungen, zu

denen im Verlauf motorische Beschwerden hinzukommen (Stoker et al., 2022). Die Krankheit wird üblicherweise mit Einsetzen der typischen motorischen Symptome diagnostiziert, wobei diesen in der Regel erste unspezifische neuropsychiatrische und teils bereits subtile motorische Veränderungen um bis zu 15 Jahre vorausgehen und als Prodromalstadium angesehen werden (Ross et al., 2014; Stoker et al., 2022).

1.3.1 Motorische Beschwerden

Motorische Symptome zeigen ein krankheitstypisches biphasisches Muster. Entsprechend der zeitversetzten Degeneration striataler MSNs mit Beeinträchtigung zunächst der indirekten und später der direkten Bahn der Basalganglienschleife, steht zu Beginn der Erkrankung ein hyperkinetisches Störungsbild im Vordergrund, das im Verlauf zunehmend in einen hypokinetischen Phänotyp übergeht (Plotkin & Surmeier, 2015). Im hyperkinetischen Stadium dominiert die namensgebende Chorea durch nicht-repetitive distal betonte unwillkürliche Hyperkinesien mit einschließendem Charakter und niedriger Amplitude sowie als zweites klinisches Charakteristikum eine gestörte Aufrechterhaltung initiiertes Willkürmotorik (Schwarz, 2020; Stoker et al., 2022). Hyperkinesien zeigen sich anfangs zunächst meist subtil, intermittierend und isoliert in einzelnen Muskeln, werden im Verlauf dann ausgeprägter und betreffen schließlich alle Muskelgruppen (Stoker et al., 2022). Nahezu alle PatientInnen sind im Verlauf von einer zunehmenden Störung des Schluckakts mit resultierender Dysphagie betroffen (Manor et al., 2019; Pizzorni et al., 2020). Hypokinetische Aspekte umfassen insbesondere einen symmetrischen Parkinsonismus sowie Dystonien und prägen im Laufe der Erkrankung das klinische Bild zunehmend, während hyperkinetische Symptome nach einiger Zeit eine Plateauphase erreichen oder sich sogar in moderatem Umfang regredient zeigen (Stoker et al., 2022).

1.3.2 Kognitive Einschränkungen

Erste kognitive Defizite beginnen häufig bereits im Prodromalstadium (Stout et al., 2012; Tabrizi et al., 2011, 2013) und münden stets in eine Demenz (Snowden, 2017). Die betroffenen Domänen folgen dem Muster einer subkortikalen Demenz mit einem dominierendem dysexekutiven Syndrom sowie Bradyphrenie und Beeinträchtigung der visuell-räumlichen Fähigkeiten und der Emotionserkennung (Papoutsis et al., 2014; McColgan & Tabrizi, 2018; Stoker et al., 2022; Zhang et al., 2022). Letzteres prädisponiert PatientInnen für Auffälligkeiten im Sozialverhalten, welche zu Stigmatisierung und sozialem Rückzug führen können (Stoker et al., 2022). Weitere typische Symptome sind eine verminderte Krankheitseinsicht bis hin zur

Anosognosie, insbesondere zu Beginn der Erkrankung, sowie eine Logopenie mit gestörter Sprachproduktion (Nguyen & Weydt, 2018; Tovar et al., 2020; Stoker et al., 2022).

1.3.3 Weitere neuropsychiatrische Symptome

Nicht-kognitive psychiatrische Auffälligkeiten zeigen sich ebenfalls bereits frühzeitig im Krankheitsverlauf (Craufurd et al., 2001; Tabrizi et al., 2009, 2013). Zu den häufigsten psychopathologischen Befunden zählen Apathie, Wesensveränderung hin zu erhöhter Reizbarkeit und Ängstlichkeit, Depressivität sowie anankastische Symptome, seltener auch psychotisches Erleben (Van Duijn et al., 2014; Stoker et al., 2022). Suizidale Gedanken sind in allen Krankheitsstadien verbreitet, schätzungsweise bis zu 10% der Erkrankten unternehmen im Laufe ihrer Krankheitsgeschichte mindestens einen Suizidversuch (Honrath et al., 2018).

1.3.4 Prognose

Die Erkrankung verläuft stetig progredient und führt zu einer deutlich verkürzten Lebenserwartung mit einem mittleren Überleben von 18 Jahren nach Manifestation erster motorischer Symptome (Ross et al., 2014). Die häufigsten Todesursachen sind Infektionen, hier insbesondere die Aspirationspneumonie infolge der oftmals bestehenden Dysphagie, sowie Suizid (Rodrigues et al., 2017). Es ist aktuell keine kausale oder den Krankheitsverlauf beeinflussende Therapie verfügbar, die Behandlung erfolgt supportiv und symptomatisch (Tabrizi et al., 2019; Saft et al., 2022; Stoker et al., 2022).

1.4 Variabilität im Verlauf der Huntington-Erkrankung

Wie bereits dargestellt wird die Krankheitslast von HD stark vom Ausmaß der CAG-Repeat-Expansion bestimmt. Daneben üben weitere, nicht-*HTT*-abhängige Faktoren einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf aus. Der Verlauf neuropsychiatrischer Symptome etwa scheint nicht mit der Länge der CAG-Wiederholungssequenz zu korrelieren (Zappacosta et al., 1996). So wird etwa 60% der Varianz des Erkrankungsbeginns durch die Repeat-Länge erfasst, was auf zusätzliche Krankheitsmodifikatoren hindeutet (Ross & Tabrizi, 2011; Lee et al., 2012; Gusella et al., 2014). Für diese verbleibende unerklärte Varianz wird geschätzt, dass etwa 40% auf weitere genetische Faktoren entfallen, während circa 60% Lebensstil- und Umweltvariablen attribuiert werden (Wexler et al., 2004). Auf genetischer Ebene werden beispielsweise Varianten der Gene *FAN1*, *MTMR10*, *RRM2B*, *URB5*, *MSH3*, *PGC-1 α* , *ASK1* und *MAP2K6* sowie die Länge der CAG-Sequenz im nicht-pathogenen Allel als mögliche Komoderatoren des Krankheitsverlaufs angenommen (Arning et al., 2008; Aziz et al., 2009; Taherzadeh-Fard et al., 2009; Jong Min Lee et al., 2015; Moss et al., 2017; McColgan & Tabrizi, 2018; Jurcau, 2022).

Auch eine Reihe von Verhaltens- und Umweltfaktoren werden als potentielle Einflussgrößen diskutiert, die den Verlauf einer Huntington-Erkrankung bidirektional modifizieren können (Novati et al., 2022). So wird ein möglicher Zusammenhang von körperlicher Inaktivität, Tabak-, Koffein- oder Drogenkonsum sowie milchproduktlastiger und hochkalorischer Ernährung mit einer früheren Krankheitsmanifestation und schwererem Verlauf diskutiert (Buruma et al., 1987; K. Marder et al., 2009; Trembath et al., 2010; Simonin et al., 2013; Karen Marder et al., 2013; Panegyres et al., 2015; Schultz et al., 2017; Wang et al., 2022; Novati et al., 2022). Potenziell protektive Lebensstilfaktoren sind insbesondere aufgrund fehlender kausalthapeutischer Interventionen von besonderem therapeutischem und wissenschaftlichem Interesse. Ein körperlich wie mental aktiver Lebensstil, mediterrane Ernährung und Stressvermeidung werden als Moderatoren für einen milderen Krankheitsverlauf diskutiert (Mo et al., 2015; Cubo et al., 2015; Rivadeneyra et al., 2016; Garcia-Gorro et al., 2019; Novati et al., 2022; Trovato et al., 2022). Diese Faktoren und ihr Zusammenspiel mit biologischen Einflussgrößen sind in ihrer pathophysiologischen Wertigkeit aktuell nicht abschließend beurteilbar, die im Vergleich breiteste Evidenzbasis liegt momentan für den Nutzen körperlicher Betätigung und mentaler Aktivität vor.

So ist ein kognitiv aktiver Lebensstil (KAL) assoziiert mit einer späteren Manifestation und weniger schwerem Krankheitsverlauf. Kognitive Aktivität als abstraktes Konstrukt wird dabei insbesondere über das prämorbid Intelligenzniveau, Bildungsgrad, Art der Berufsausübung und die Testleistung in psychometrischen Verfahren operationalisiert. Garcia-Gorro und KollegInnen beschreiben einen Zusammenhang zwischen KAL und dem späteren Einsetzen von klinischen Symptomen, verlangsamtem Volumenverlust in Striatum und Kortex sowie besserem Erhalt der exekutiven Funktionen (Garcia-Gorro et al., 2019). Analog hierzu zeigten in der PREDICT-HD Kohorte TeilnehmerInnen mit KAL einen verzögerten Abfall in kognitiven Kompetenzen und striatalem Volumen (Bonner-Jackson et al., 2013). In der REGISTRY Studie korrelierte die Länge der schulisch-akademischen Ausbildung von PatientInnen invers mit der Symptomschwere (López-Sendón et al., 2011). Für Bilingualität ab der frühen Kindheit als Spezialfall kognitiver Stimulation zeigt sich ein Zusammenhang mit milderer kognitiver Symptomschwere und bildgebenden cerebralen Befunden (Martínez-Horta et al., 2019). Eine Analyse der Daten von Teilnehmenden der TRACK-HD Studie zeigte gemischte Ergebnisse mit einem Zusammenhang von KAL mit einem längeren Erhalt kognitiver Leistungsfähigkeit im Prodromalstadium; dieser Effekt schwächte sich im Krankheitsverlauf zunehmend ab und kehrte sich sogar teils um (Trembath et al., 2010). Papoutsis und KollegInnen (2022) schließlich fanden keinen Zusammenhang zwischen

Erkrankungsalter und KAL, wodurch die Notwendigkeit einer differenzierteren Betrachtung von kognitiver Aktivität und ihrem Einfluss auf HD unterstrichen wird. Evidenz liegt auch für einen gesundheitssupportiven Einfluss von körperlicher Aktivität (KA) auf den Verlauf von HD vor. Wallace und KollegInnen (2016) beschreiben einen Zusammenhang zwischen KA und mildereren klinischen Symptomen bei aus der PREDICT-HD Kohorte rekrutierten ProbandInnen. Umgekehrt fanden McLaren et al. (2021) eine Assoziation von physischer Inaktivität mit einem schwereren Krankheitsbild. Übersichtsarbeiten und Meta-Analysen stärken die Evidenz für einen Zusammenhang von KA mit mildereren Krankheitsverläufen (Fritz et al., 2017; Mueller et al., 2019; Dauwan et al., 2021; Quinn et al., 2022). Eine prospektive Interventionsstudie konnte eine Verbesserung des klinischen Zustands nach einem einjährigen multidisziplinären Rehabilitationsregime zeigen, bei dem insbesondere körperliche Aktivität, soziale Interaktion und mentale Aktivierung gefördert wurden (Piira et al., 2013). Ähnlich konzipierte Studien mit vergleichbaren Ergebnissen unterstreicht den therapeutischen Nutzen solcher Interventionen weiter (Zinzi et al., 2007; Thompson et al., 2013). Bartlett et al. (2020) konnten bei ProbandInnen im Prodromalstadium durch ein neunmonatiges Interventionsprogramm bestehend aus körperlichem und kognitivem Training und regelmäßigen sozialen Aktivitäten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe geringere Abnahme des zerebralen Volumens feststellen.

1.5 Simulierung putativ schützender Lebensstileinflüsse im Tiermodell: das *enriched environment*

Zur wissenschaftlichen Bearbeitung der Frage nach Verlaufsmodifikation einer Huntington-Erkrankung durch Verhaltens- und Umweltfaktoren bietet sich das Tiermodell als Möglichkeit an, interessierende Variablen experimentell zu manipulieren und neben Verhaltensmessungen auch neurobiologische Daten zu interessierenden Zeitpunkten zu erheben.

Für die Huntington-Erkrankung stehen eine Reihe von Tiermodellen zur Verfügung, die in ihrer biologischen Komplexität von *Caenorhabditis elegans* über *Drosophila melanogaster*, Nagetiere und größere Säugetiere bis zu nichtmenschlichen Primaten reichen (Jacobsen et al., 2010; Howland et al., 2020; Zhunina et al., 2019). Nagetiere, insbesondere Mäuse, stellen dabei den meistgenutzten Modellorganismus dar (Mo et al., 2015). Genetisch modifizierte Tiermodelle bieten sich angesichts der monogenetischen Ätiologie von HD in besonderem Maße an, um die Erkrankung oder einzelne Aspekte im Tier zu modellieren. Die einzelnen Modelle unterscheiden sich in dem Ausmaß der phänotypischen und pathophysiologischen Abbildung von HD sowie in Art und Ausmaß der vorgenommenen Geninsertion, etwa als transgenes oder *knock-in* Modell mit gesamter oder partieller *HTT*-Insertion mit unterschiedlicher Exon 1 CAG-

Sequenzlänge, teils unterbrochen durch CAA-Einschübe und gegebenenfalls die Promotorregion einbeziehend (Yang & Gray, 2010; Stricker-Shaver et al., 2018). Seltener werden Toxin-induzierte Krankheitsmodelle verwendet, die beispielsweise über exzitotoxische Stoffe einen HD-ähnlichen Phänotyp erzeugen (Sanberg et al., 1989).

Novati und KollegInnen (2022) und Jurcau (2022) geben detaillierte Zusammenfassungen etablierter Nagetiermodelle: Die murinen R6/1 und R6/2 transgenen Modelle exprimieren das humane Exon 1 *HTT* mit 115 bzw. 150 CAG repeats und zeigen progressive phänotypische und neuropathologische Veränderungen (Mangiarini et al., 1996; J. Y. Li et al., 2005); weitere transgene Modelle sind die YAC128 und BACHD Maus- und BACHD Rattenlinien, die humanes *HTT* in voller Länge mit 128 CAG repeats (YAC128) bzw. 97 gemischte CAG/CAA repeats (BACHD murin und rattin) in Exon 1 exprimieren und einen im Vergleich zu R6/1 und R6/2 Modellen langsamer und milder verlaufenden Phänotyp aufweisen (Hodgson et al., 1999; Gray et al., 2008; Yu-Taeger et al., 2012; Stricker-Shaver et al., 2018); *knock-in* Modelle wie beispielsweise die HdhQ150 Mauslinie, die murines *HTT* mit 150 CAG repeats exprimiert, zeigen im Vergleich zu transgenen Modellen im Allgemeinen mildere phänotypische Veränderungen (Lin et al., 2001; Novati et al., 2022).

Die Nutzung von Tiermodellen erlaubt die Ableitung kausaler Zusammenhänge und die Betrachtung klinischer, anatomischer und molekularbiologischer Veränderungen zu festlegbaren Zeitpunkten unter wählbarer experimenteller Manipulation. Manipulationen, die die Umgebung der Versuchstiere betreffen, werden unter dem Oberbegriff der *environmental stimulation* zusammengefasst (Novati et al., 2022). Ist das Ziel die positive Beeinflussung der Tiere etwa in Bezug auf behaviorale, molekularbiologische oder strukturelle Merkmale, handelt es sich konkreter um *environmental enrichment* (EE; Robison et al., 2020; Han et al., 2022). Durch Erweiterung beispielsweise der physischen und sozialen Interaktionsmöglichkeiten werden Tiere einer im Vergleich zur Standardhaltung kognitiv und physisch komplexeren Umgebung exponiert, was im Modellorganismus stimulierenderes Verhalten induzieren und als Abbildung eines aktiven Lebensstils im von HD betroffenen Menschen dienen soll. Auf diese Weise wird versucht, die interessierenden Lebensstilfaktoren im Humankontext zu modellieren. *Environmental enrichment* wird beispielsweise über das Hinzufügen zusätzlicher Objekte mit verschiedenen sensorischen Eigenschaften und Interaktionsmöglichkeiten realisiert, alternativ oder ergänzend auch via größere Käfige, Bereitstellung von spezifischem Futter oder mehr sozialer Interaktion durch Haltung in größeren Gruppen (Mo et al., 2015).

Pionierarbeit zur experimentellen Untersuchung von *environmental enrichment* und dessen Einfluss auf ein HD-Tiermodell leisteten Van Dellen et al. (2000). Sie zeigten bei R6/1 Mäusen, dass die Haltung in einem *enriched environment* die klinische und hirnvolumetrische Verschlechterung der Tiere deutlich verzögern konnte. Diese und nachfolgende Studien an verschiedenen HD-Tiermodellen unterstreichen das Potential von *environmental enrichment* und ermöglichen ein wachsendes Verständnis für die biologischen Mechanismen, über die Verhalten und Umwelt den Krankheitsverlauf modifizieren können; gleichzeitig zeigt sich eine große Diversität in der Ausgestaltung der jeweiligen *enriched environments* und ihrer teils divergierenden Effekte auf Phänotyp und Neuropathologie (für eine Übersicht, siehe Mo et al., 2015, und Novati et al., 2022).

So konnte EE mit dem Fokus auf Induktion physischer Aktivität modellübergreifend motorische und neuropsychiatrische Defizite verlangsamten oder verbessern (Pang et al., 2006; Van Dellen et al., 2008; Renoir et al., 2012; Harrison et al., 2013; Ransome & Hannan, 2013; Cuesta et al., 2014; Y.-M. Kim et al., 2015; Stefanko et al., 2017; Caldwell et al., 2020) und die Lebenszeit der Tiere verlängern (Herbst & Holloway, 2015). Designs mit kognitiv stimulierenden Aspekten zeigten ähnliche Ergebnisse (Nithianantharajah et al., 2008; Pang et al., 2009; Renoir et al., 2013; Mazarakis et al., 2014; Steventon et al., 2015; Curtin et al., 2016; Yhnell et al., 2016) wie auch die Kombination beider Aspekte (Nithianantharajah et al., 2009). Die Stärke des Effekts eines *environmental enrichment* wird daneben auch von der Dauer und Intensität der Exposition beeinflusst (Novati et al., 2022). So hatte eine zeitlich stark limitiertes EE Design in Verbindung mit einem operanten Konditionierungsschema für kurze Zeit täglich über einen Zeitraum von zwei Wochen bereits einen milden Effekt auf den Phänotyp männlicher R6/2 Mäuse, der sich mit längerer Exposition in der Regel vergrößert (Wood et al., 2010, 2011; Skillings et al., 2014). Auch eine Steigerung der Anreicherung des EEs führt zu stärkeren Effekten (Hockly et al., 2002; Mazarakis et al., 2014). Während also bereits die kurze Nutzung von *environmental enrichment* einen positiven Einfluss auf den Phänotyp nehmen kann, nimmt der Nutzen mit Dauer und Intensität der Exposition zu. Einige Studien stellten allerdings auch gemischte Effekte von *environmental enrichment* auf Krankheitsmerkmale fest. So konnten Skillings et al. (2014) zwar zeigen, dass EE in Kombination mit einer nahrungsmedierten Synchronisierung der circadianen Rhythmik bei R6/2 Mäusen zwar zur phänotypischen Verbesserung führte, gleichzeitig verkürzte sich jedoch auch das Überleben. Ein kognitiv stimulierendes EE führte bei YAC128 Mäusen neben motorischer Verbesserung auch zur Verschlechterung in der kognitiven Verlaufstestung (Steventon et al., 2015).

Daneben wurden auch molekularbiologische Auswirkungen von *environmental enrichment* untersucht, um ein mechanistisches Verständnis zu erhalten, wie sich die durch ein EE induzierten Verhaltensweisen auf den Organismus auswirken und ins zelluläre Regulationsprogramm integriert werden. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Beeinflussung von Prozessen, die aus HD-PatientInnen als gestört bekannt sind.

Die aus dem Menschen bekannte Aggregation von mHTT-Einschlusskörpern wird durch viele der vorgestellten Tiermodelle ebenfalls modelliert und lässt eine Untersuchung der Effekte von EE auf deren Bildung zu. Hier zeigen sich gemischte Ergebnisse. Stefanko et al. (2017) konnten durch *environmental enrichment* mit Fokus auf körperliche Aktivität die Akkumulation von mHTT-Inklusionen in CAG140 *knock-in* Mäusen reduzieren und gleichzeitig eine Verbesserung des Phänotyps beobachten. Van Dellen et al. (2008) zeigten bei R6/1 Mäusen keine Veränderung der Aggregatbildung durch physisch stimulierendes EE und dennoch einen positiven Effekt auf die motorischen Fertigkeiten der Tiere. Ein von Harrison und KollegInnen (2013) ähnlich aufgebautes EE schließlich führte bei R6/1 Mäusen zu einer Steigerung der Aggregatdichte und ungeachtet dessen ebenfalls zu einer motorischen Verbesserung. Es zeigt sich also, dass *environmental enrichment* keinen konsistenten Einfluss auf die mHTT-Akkumulation der betroffenen Versuchstiere hat und die Aggregatdichte keine eindeutige Korrelation mit der klinischen Präsentation aufweist. Die EE-induzierten Effekte scheinen vor allem über andere Mechanismen als die mHTT-Reduktion zu wirken, was die Debatte über die Rolle von Huntingtin-Aggregation als ursächlichen Pathomechanismus, zelluläre Copingstrategie oder unbeteiligtes Nebenprodukt weiter befeuert (Scherzinger et al., 1999; Arrasate & Finkbeiner, 2012; Folger & Wang, 2021).

Die striatale Degeneration insbesondere von *medium spiny neurons* ist ein bestimmendes Charakteristikum der HD-Pathologie. Dieser Prozess scheint im Tiermodell durch *environmental enrichment* beeinflussbar zu sein. Zusätzlich scheint eine Reduktion oder Verzögerung (peri-)striataler Atrophie durch EE einen deutlicheren Zusammenhang mit phänotypischen Verbesserungen aufzuweisen als die Intensität der mHTT-Aggregation (Novati et al., 2022). R6/1 Mäuse unter bewegungsfördernden EE-Bedingungen zeigten neben einem verbesserten Phänotyp eine verminderte Neurodegeneration im Striatum (Harrison et al., 2013). Unter ähnlichen Bedingungen wurde bei R6/2 Mäusen ein geringerer Verlust striataler *medium spiny neurons* berichtet (Cepeda et al., 2010). Steventon et al. (2015) beschrieben bei YAC128 Mäusen mit lebenslangem kognitiv stimulierendem EE Verbesserungen in der motorischen Verhaltenstestung und eine mildere striatale Atrophie in der *in vivo* MR-Bildgebung. Van Dellen

et al. (2000) zeigten an R6/1 Tieren mit schwerpunktmäßig kognitiv stimulierendem EE eine abgeschwächte Atrophie des peristriatalen Volumens, welches insbesondere die corticostriatalen Projektionsfasern umfasst. Diese quantitativen histologischen Veränderungen wurden begleitet von einer Verzögerung im Einsetzen motorischer Defizite. Schließlich fanden auch Hockly et al. (2002) einen verzögerten Verlust peristriatalen Hirnvolumens und verzögerten motorischen Leistungsabfall in R6/2 Mäusen mit EE-Exposition.

Neben striataler und kortikaler Dysfunktion wird auch eine Affektion des Hippocampus und der hippocampalen Neurogenese im Rahmen von HD angenommen und für die Affektion der Gedächtnisleistung mitverantwortlich gemacht (Ransome et al., 2012). Kim und KollegInnen (2015) beobachteten am Chinolinsäure-induzierten Rattenmodell eine verringerte Zellproliferation im Gyrus dentatus, die durch physisch aktivierendes *environmental enrichment* erhöht werden konnte, vorrangig über eine Steigerung der BDNF Expression; zugleich wurde eine verbesserte Gedächtnisleistung beobachtet. Ähnliches zeigte sich bei R6/1 Mäusen, bei denen ein 21-wöchiges, primär kognitiv anregendes EE Proliferation und Überleben neuronaler Vorläuferzellen im Gyrus dentatus sowie deren Migration und neuritische Aussprossung verbessern konnte (Lazic et al., 2006).

Mitochondriale Dysfunktion und daraus resultierende Störungen des zellulären Energiehaushalts lässt sich in HD-Betroffenen wie auch im Tiermodell zeigen (Mochel & Haller, 2011). Caldwell und KollegInnen (2020) zeigten durch ein bewegungsinduzierendes EE Normalisierungen einer Reihe mitochondrialer Enzyme im Cerebrum und verbesserte motorische Funktionen in CAG140 *knock-in* Mäusen. Auf körperliche Aktivität abzielendes EE konnte bei R6/1 Mäusen den Verlust von Proteinen der Atmungskette im Striatum verhindern und so deren Funktion normalisieren; gleichzeitig zeigte sich ein längeres Überleben (Herbst & Holloway, 2015). Diese Befunde stützen die Hypothese, dass der positive Effekt körperlicher Aktivität mindestens teilweise über eine Verbesserung der mitochondrialen Kreisläufe mediiert wird.

Transkriptionelle Veränderungen finden in jedem Stadium statt und sind im Menschen wie im Tiermodell am stärksten im Striatum ausgeprägt (Hodges et al., 2006; Langfelder et al., 2016). Im Tiermodell zeigte sich eine Dysregulation einer Vielzahl von Funktionssystemen und Transkriptionswegen, insbesondere mit Bezug auf synaptische Funktionen, DNA-Reparatur, Apoptose, Zelldifferenzierung, Synthese von Neurotransmittern und Funktion der zugehörigen Rezeptoren, Energiehaushalt, BDNF-Signalweg und eine Reihe epigenetischer Regulationsmechanismen (Cha, 2007; Yu-Taeger et al., 2017; Ament et al., 2018; Hervás-

Corpión et al., 2018). Hierzu passend beschreiben Novati und KollegInnen (2018) in zwei Monate alten BACHD Ratten *mHTT*-abhängige Veränderungen der striatalen Genexpression, die funktionell mit Vesikeltransport und -sekretion sowie synaptischer Übertragung in Verbindung stehen. Diese Veränderungen konnten durch dauerhaftes *environmental enrichment* teilweise abgemildert werden.

Insgesamt kann für den EE-Ansatz ein positiver Einfluss auf Phänotyp und Neuropathologie in HD-Tiermodellen angenommen werden (Novati et al., 2022). Gleichzeitig zeigt sich in der aktuellen Forschungslandschaft eine sehr heterogene Umsetzung, deren konkrete Elemente bisher kaum auf ihren einzelnen Effekt und den dahinterstehenden biologischen Mechanismus untersucht wurden. Auch zusätzliche Variablen wie Tiermodell, Geschlecht der Tiere, betrachtete Domänen und deren Operationalisierung verdeutlichen die Notwendigkeit einer genaueren Betrachtung des Einflusses einzelner Facetten zur Optimierung des schützenden Effekts. Insbesondere der genaue Mechanismus, über den die Stimulation eines *enriched environment* in das Zellprogramm integriert wird, ist noch weitgehend ungeklärt. Transkriptionelle Faktoren, mitbedingt durch epigenetische Veränderungen, werden dabei als zentral diskutiert (Novati et al., 2022).

1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Wie dargestellt, ist die Huntington-Erkrankung ihrer monogenetischen Ätiologie zum Trotz reaktiv gegenüber dem Einfluss von Lebensstilmaßnahmen. Von besonderem Interesse aus therapeutischer Sicht sind dabei potenziell protektive Lebensstileinflüsse. Nach heutigem Wissensstand können allerdings keine gesicherten Empfehlungen zu Lebensführung für HD-PatientInnen oder AnlageträgerInnen ausgesprochen werden (Saft et al., 2022). Dabei eröffnet die Latenz zwischen Geburt und Krankheitsmanifestation die Gelegenheit, frühzeitig auf die sich entfaltende Pathologie einzuwirken. Gleichmaßen sind spätere Interventionsmöglichkeiten im manifesten Krankheitsstadium relevant, um im Rahmen der medizinischen Behandlung den weiteren Verlauf im Sinne des PatientInnenwohles beeinflussen zu können. Auf pathologischer Ebene interessiert der mechanistische Einfluss von Lebensstilfaktoren auf die Pathophysiologie zu verschiedenen Zeitpunkten, um perspektivisch aus einem besseren Verständnis der Erkrankung und ihrer Modulierbarkeit heraus identifizierte Regelkreise gezielt anzusprechen und möglicherweise neue Therapieoptionen bereitzustellen, etwa im Sinne von *environmimetics*. Experimentelle Studien an Tiermodellen, die gegenüber *enriched environments* exponiert sind, leisten hierzu einen essentiellen grundlagenwissenschaftlichen Beitrag.

Aus dieser Motivation heraus untersucht die vorliegende Arbeit den Einfluss von *environmental enrichment* auf transgene BACHD Ratten, ein murines Modell der Huntington-Erkrankung. Angesichts der großen Variabilität von EE-Paradigmen mit im Allgemeinen positiven, aber teils divergierenden Effekten werden zwei unterschiedliche Varianten von EE verglichen, die sich in ihrem zeitlichen Aspekt unterscheiden. Die erste Variante besteht aus einem permanenten *environmental enrichment*, während die Tiere in der zweiten Variante erst im späteren Verlauf einem *enriched environment* exponiert werden. Aus translationaler Perspektive sollen diese Ansätze zwei Szenarien modellieren und vergleichen, in denen HD-AnlageträgerInnen bereits frühzeitig in Gesundheit bzw. Prodromalstadium einen mutmaßlich gesundheitsförderlichen Lebensstil führen oder diesen erst später nach Krankheitsmanifestation adaptieren. Das genutzte EE-Design intendiert eine Induktion von körperlicher Aktivität, kognitiver Stimulierung und sozialer Interaktion. Zum besseren Verständnis der Verbindung zwischen *environmental enrichment* und Progress des HD-Phänotyps wurde neben behavioralen Messungen auch die striatale Genexpression zu zwei Alterszeitpunkten untersucht. Diese ist von besonderem Interesse, da transkriptionelle Dysregulation einerseits einen wichtigen HD-Pathomechanismus darstellt und bereits im Prodromalstadium mit striatalem Schwerpunkt nachweisbar ist (Hodges et al., 2006; Agus et al., 2019). Andererseits dient das Transkriptom als zentrales Verbindungsglied, um Verhaltens- und Umwelteinflüsse in das zelluläre Programm von Versuchstieren und HD-PatientInnen zu integrieren (Seredenina & Luthi-Carter, 2012; Novati et al., 2022).

1.7 Studiendesign und Hypothesen

Um den Effekt von Genotyp und *environmental enrichment* und auf das Krankheitsmodell zu beurteilen, wurden drei Gruppen bestehend aus Wildtyp (WT) und transgenen Ratten (BACHD) gebildet. Die erste Gruppe fungiert als Kontroll- und Referenzgruppe, in der die Tiere dauerhaft in Standardkäfigen in einem *standard environment* (SE) gehalten wurden. Ein Teil dieser Gruppe wurde nach sechs Monaten geopfert, der andere nach zwölf Monaten. Der Genotyp der Versuchstiere stellt die einzige systematisch manipulierte Variable in dieser Gruppe dar, wodurch prinzipiell Kausalaussagen über den Effekt der durch das Transgen modellierten HD-Erkrankung möglich sind. Die zweite Gruppe aus WT und BACHD Ratten wurde nach Trennung vom Muttertier dauerhaft in einem *enriched environment* gehalten und aufgrund der frühen und lebenslangen Umweltmodifikation als EE_{früh} bezeichnet. Sie dient der Evaluation des Effekts einer möglichst frühzeitigen EE-Intervention und erlaubt in Verbindung mit der Kontrollgruppe eine Betrachtung des Transgen-Effekts in Abhängigkeit von Haltungsbedingungen. Auch die Tiere dieser Gruppe wurden nach sechs bzw. zwölf Monaten

geopfert. Die dritte und letzte Gruppe bestand schließlich aus WT und BACHD Tieren, die initial wie die SE-Kohorten unter Standardbedingungen gehalten wurden, bis sie nach sechs Monaten einem *enriched environment* exponiert wurden, in dem sie weitere sechs Monate bis zur Opferung lebten. Aufgrund des verzögerten *environmental enrichment* wird diese Gruppe als EE_{spät} bezeichnet und ermöglicht die Beobachtung, welchen Effekt ein EE zu einem späteren Zeitpunkt im Leben der Tiere hat, zu dem sich der Transgen-Effekt bereits über einen längeren Zeitpunkt entfalten konnte. Diese Tiere wurden nach zwölf Monaten geopfert. Nach sechs Monaten fand anders als in den vorherigen beiden Gruppen keine Opferung statt, da die Haltungsbedingungen bis dahin identisch zu denen der Kontrollgruppe waren. Sowohl zum Sechs- wie zum Zwölfmonatszeitpunkt wurden Verhaltensmessungen durchgeführt und die striatale Genexpression bestimmt. Zusätzlich wurde die Gewichtsentwicklung bis zur 22. Lebenswoche verfolgt.

Mit dem vorgestellten Versuchsaufbau bearbeitet die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen und Hypothesen:

- I. **Effekt des Genotyps:** Welche Genotyp-induzierten Unterschiede finden sich zwischen BACHD und Wildtyp Ratten in Phänotyp und striatalem Transkriptom?

Hypothese 1.a (gerichtet): BACHD Tiere der Kontrollgruppe zeigen in Verhaltenstests insgesamt eine schlechtere Leistung als WT Tiere

Hypothese 1.b (ungerichtet): BACHD Tiere der Kontrollgruppe weisen eine partiell differentielle striatale Genexpression im Vergleich zu WT Tieren der Kontrollgruppe auf

- II. **Effekt des Alters:** Zeigen die beobachteten durch das Transgen vermittelte Veränderungen einen progressiven Alterseffekt?

Hypothese 2.a (gerichtet): Die in 1.a angenommenen phänotypischen Unterschiede sind zum Zwölfmonatszeitpunkt ausgeprägter als zum Sechsmonatszeitpunkt

Hypothese 2.b (gerichtet): In 1.b angenommene transkriptionelle Unterschiede zwischen den Genotypen sind zum Zwölfmonatszeitpunkt ausgeprägter als zum Sechsmonatszeitpunkt

III. **Modulierbarkeit des Transgen-Effekts durch *environmental enrichment*:**

Lassen sich diese Transgen-induzierten Veränderungen durch das verwendete *environmental enrichment* reduzieren?

Hypothese 3.a (gerichtet): Im Vergleich der SE Tiere mit beiden EE Gruppen zeigt sich in den Verhaltensdaten eine Interaktion von Genotyp mit Umwelt zugunsten eines geringeren Transgen-Effekts unter beiden EE-Bedingungen.

Hypothese 3.b (gerichtet): Die in 1.b angenommene differentielle Expression zwischen den Genotypen liegt in beiden EE-Gruppen reduziert vor.

IV. **Effekt eines früh oder spät einsetzenden *environmental enrichment*:** Bestehen zwischen den beiden untersuchten Varianten des *enriched environment* Unterschiede in dessen Modifikation des Transgen-Effekts?

Hypothese 4.a (ungerichtet): Der in 3.a angenommene Interaktionseffekt unterscheidet sich zwischen früherer und späterer EE-Exposition.

Hypothese 4.b (ungerichtet): Die in 1.b angenommene differentielle Expression wird durch EE_{früh} und EE_{spät} unterschiedlich stark reduziert.

2 Material und Methoden

2.1 Datengewinnung und genutzte Programme

2.1.2 Aufzucht, Haltung und Umweltbedingungen

Das BACHD Rattenmodell wurde mittels eines künstlichen Bakterienchromosoms (*bacterial artificial chromosome*, BAC) erzeugt, welches den humanen *HTT* Locus enthielt mit 97 CAA/CAG Wiederholungen inklusive der Areale 20 kb upstream und 50 kb downstream zu diesem Bereich (Yu-Taeger et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten genutzt; es wurden transgene BACHD Tiere und ihre Wildtyp Wurfgeschwister verwendet, welche durch Verpaarung männlicher heterozygoter BACHD Tiere mit Wildtyp Weibchen erzeugt wurden. Zur Vermeidung konfundierender Einflussfaktoren erfolgte die Datenerhebung zur gleichen Phase des Brunstzyklus.

Die Versuchstiere – transgene wie Wildtyp-Ratten – wurden nach erfolgter Genotypisierung zufällig in drei Gruppen eingeteilt, die unter verschiedenen Umweltbedingungen gehalten wurden: Standardhaltung (*standard environment*, SE) sowie frühes und spätes *environmental enrichment* (EE_{früh} und EE_{spät}). Die Haltung erfolgte in Gruppen mit gemischtem Genotyp unter Konstanthaltung von Lichtzyklus (täglich 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit), Temperatur (22 ± 1 °C) und Luftfeuchtigkeit ($55 \pm 10\%$).

SE-Haltung erfolgte in Gruppen von vier Versuchstieren mit ausreichend Einstreu- und Nistmaterial in Standard Typ IV Käfigen mit den Maßen 598 x 380 x 200mm (Gesamtfläche ca. 2272cm²). EE-Haltungsbedingungen bestanden aus größeren Versuchstiergruppen (12 Tiere pro Käfig), die in größeren Käfigen gehalten wurden (Zwei über einen Durchgang miteinander verbundene Tecniplast Hasenkäfige à 600mm x 600mm x 500 mm mit einer Gesamtfläche von ca. 7688cm²; zusätzlich abgesichert mit Gittergewebe und Plexiglas); in den Käfigen befanden sich Laufräder, Tunnelelemente und verschiedene Spielmaterialien wie Kugeln, Boxen und Rollen (siehe **Abbildung 1**). Zur Erhaltung der Neuartigkeit der Umgebung wurden alle Elemente einmal wöchentlich neu im Käfig positioniert.

Haltungsbedingungen, Verhaltensmessungen und Opferung der Tiere wurden durch den Tierschutzausschuss und das Ethikkomitee der Universität Tübingen geprüft und genehmigt (TVA HG 2/17).



Abbildung 1. Käfiggestaltung unter *environmental enrichment* Haltungsbedingungen. Die Elemente wurden wöchentlich neu positioniert.

2.1.3 Isolation und Sequenzierung der RNA

Die Gewebegewinnung erfolgte nach Opferung von Versuchstieren mittels Dekapitation, Entnahme der Gehirne mit Präparation des Striatums und anschließender Schockgefrierung der Proben in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -80°C . Die Extraktion von RNA und DNA aus striatalem Gewebe erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen). Zur RNA-Sequenzierung wurden polyadenylierte (polyA) Anteile der isolierten striatalen RNA verwendet. Zur Erstellung der *sequencing library* wurden Proben mit einer ausreichend hohen RNA-Integrität verwendet (*RNA integrity number* > 8); die Qualitätskontrolle erfolgte mittels Agilent 2100 Bioanalyzer, die Sequenzierung mittels Illumina NextSeq und NovaSeq mit einer Sequenzierungstiefe von je ca. 15-20 Millionen *reads*. Die Erstellung der Sequenzierungslibraries (50bp paired-end bzw. 75bp single-end) erfolgte mit dem TruSeq Stranded RNA Sample Prep Kit (Illumina), wobei pro *library* 100ng RNA verwendet wurden. Die Qualitätskontrolle der RNA-Seq Daten wurde mit FastQC (v0.11.4) vorgenommen. Das Sequenzialignment der *reads* erfolgte mit STAR (v2.7.0a; Dobin et al., 2013) unter Nutzung des *Rattus norvegicus* Ensembl Genoms (v95) und des humanen *HTT* Transgens als Referenz und Kontrolle mittels samtools (v1.1; Li et al., 2009) und Integrative Genome Viewer (Thorvaldsdóttir et al., 2013). Normalisierte *read counts* wurden mit DESeq2 (v1.22.0; Love et al., 2014) ermittelt; Gene mit weniger als 50 *reads* wurden aus der Analyse exkludiert.

2.1.4 Zusätzlich genutzte Expressionsdaten

Zur Validierung der im verwendeten BACHD Rattenmodell durchgeführten Netzwerkanalyse wurden zusätzlich bereits veröffentlichte striatale Expressionsdaten eines HD Mausmodells (Langfelder et al., 2016) sowie humaner post-mortem Proben (Hodges et al., 2006; Durrenberger et al., 2015) verwendet. Daten aus Langfelder et al. (2016) basieren auf Wildtyp und heterozygoten *Knock-in* Mäusen, welche auf einem Allel das Exon 1 des humanen *Htt* mit unterschiedlicher CAG-Länge exprimierten. Verwendet wurden Daten von weiblichen Wildtyp und *Knock-in* Tieren im Alter von 10 Monaten; *Knock-in* Tiere wiesen eine CAG-Länge von 80, 92, 111 oder 140 *repeats* auf. Die mittels RNA-Sequenzierung gewonnenen Expressionsdaten stammten von insgesamt 20 Versuchstieren (jeweils 4 Versuchstiere pro Genotyp-Gruppe). Aus Durrenberger et al. (2015) stammen humane post-mortem Microarray Expressionsdaten des Ncl. caudatus von 5 männlichen und 15 weiblichen Huntington-PatientInnen; aus Hodges et al. (2006) wurde eine Selektion von 64 Microarray-basierten Expressionsdaten des humanen Ncl. caudatus von post-mortem Proben ausgewählt (32 Huntington-PatientInnen mit Vonsattel-Grad 0 bis 2 sowie 32 nichterkrankte Kontrollpersonen, siehe **Tabelle 1**).

Tabelle 1. Stichprobenbeschreibung der verwendeten Daten aus Hodges et al. (2006). Angegeben sind Gruppenzugehörigkeit (nicht-erkrankte Kontrollgruppe vs. HD-PatientInnen, letztere unterteilt nach Vonsattel-Grad), Größe der Subgruppe und Geschlechterverhältnis.

| Subgruppe | Anzahl | Geschlecht (weiblich:männlich) |
|------------------|--------|-----------------------------------|
| Kontrolle | 32 | 9:23 |
| Vonsattel-Grad 0 | 3 | 1:2 |
| Vonsattel-Grad 1 | 13 | 6:7 |
| Vonsattel-Grad 2 | 16 | 9:7 |

2.1.5 Verwendete Programme

Sämtliche Analysen wurden mittels R und RStudio (R Core Team, 2018) durchgeführt (v3.5.1 „Feather Spray“) unter Verwendung der Zusatzpakete WGCNA (Langfelder & Horvath, 2008, 2012), DESeq2 (Love et al., 2014), gProfileR (Reimand et al., 2019), ggplot2 (Hadley Wickham, 2016), reshape (Hadley Wickham, 2007), WebGestaltR (Wang & Liao, 2020), compute.es (Del Re, 2013), multcomp (Hothorn et al., 2008), pastecs (Grosjean & Ibanez, 2018), sva (Leek et al., 2019) und dplyr (Wickham et al., 2020). Sämtliche Konvertierungen von Gen-Identifikatoren und Identifikation von orthologen Genen erfolgten mit biomaRt (v2.38.0; Durinck et al., 2005, 2009) unter Verwendung der *rattus norvegicus*, *mus musculus*

und *homo sapiens* Ensembl Datenbanken (v87). Die gezeigten Abbildungen wurden mittels R und R Studio sowie Microsoft PowerPoint erstellt.

2.2 Verhaltenstests

2.2.1 Gewichtsentwicklung

Nach dem Absetzen bzw. *weaning* der Versuchstiere, d.h. dem Ende der Säugezeit mit Trennung vom Muttertier, erfolgte die Erhebung des Gewichtszuwachses. Hierzu wurde während der Hellphase das Gewicht der Tiere jeweils 3, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 20 und 22 Wochen nach *weaning* bestimmt.

2.2.2 *Simple swim test* (SST)

Mittels *simple swim test* (SST) wurde die räumliche Merkfähigkeit als Ausdruck der kognitiven Leistungsfähigkeit der Versuchstiere erfasst. Diese wurden in die Mitte eines mit Wasser (Temperatur 28 ± 1 °C) gefüllten Tanks mit den Maßen 150x25x40cm gesetzt, in welchem sich eine durch das Wasser verborgene Plattform befand. Außerhalb dieser Plattform war ein Stehen der Tiere nicht möglich. Die Tiere wurden über drei Tage trainiert die Plattform zu erreichen (*acquisition trials*). Die Plattform befand sich dabei stets an der gleichen Stelle und die Tiere wurden in jeder Trainingssitzung bei der initialen Positionierung im Tank so orientiert, dass sich die Plattform hinter ihnen befand. Am vierten Tag wurde die Plattform an das der ursprünglichen Position gegenüberliegende Ende des Tanks montiert, der übrige Versuchsaufbau und -ablauf veränderte sich nicht (*reverse trials*). An jedem Tag fanden zwei Versuchsblöcke mit jeweils drei Versuchsdurchläufen in der Dunkelphase statt. Während die Übungs- bzw. Akquisitionsphase (SST-A) insbesondere Lern- und Gedächtniskompetenzen prüft, dient die reverse trial Phase (SST-RT) der Beurteilung einer allgemeineren Adaptivität der kognitiven Domäne. Gemessen wurde jeweils die Zeit, welche die Tiere zum Erreichen der Plattform benötigten (*time to platform*). Als Metrik für den Lerneffekt während der *acquisition trials* wurde die mittlere individuelle Veränderung zwischen den Trainingstagen verwendet, in den *reverse trials* die Mittelung der individuellen *time to reach platform*.

2.2.3 *Elevated plus maze* (EPM)

Ängstlichkeit beziehungsweise angstbezogenes Verhalten der Versuchstiere wurde mittels *elevated plus maze* (EPM) erfasst. Bei diesem gehen von einer erhöhten Position aus vier längliche Arme von einer gemeinsamen Mitte ab, wobei benachbarte Arme stets einen Winkel von 90° bilden; das mittige Areal bestand aus einer Fläche von 12x12cm, die Arme maßen 42x12cm. Zwei gegenüberliegende Arme waren geschlossen, d.h. von Wänden umgeben, während die übrigen beiden Arme offen waren. Die Versuchstiere wurden während der

28

Dunkelphase in die Mitte des Aufbaus gesetzt; dabei wurden sie so positioniert, dass sich vor ihnen einer der offenen Arme befand. Anschließend konnten sie sich über einen Zeitraum von fünf Minuten frei im Versuchsaufbau bewegen. Gemessen wurde die Zeitdauer, über die die Versuchstiere sich in den offenen Armen des EPM aufhielten.

2.2.4 PhenoMaster

Das Bewegungsausmaß der Tiere wurde durch automatisierte Beobachtung mittels PhenoMaster (TSE Systems) evaluiert. Bewegungsdaten der einzelnen Versuchstiere wurden via Infrarot-Lichtschranken über 22 Stunden in Intervallen von 20 Minuten erhoben.

2.2.5 Statistische Analyse der Verhaltensmessung

Beschreibende und schließende Statistik erfolgte auf Basis der nach Genotyp, Umweltbedingung und Alter differenzierten Subgruppen. Zur Charakterisierung wurden jeweils Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler und 95% Konfidenzintervall (KI_{95%}), Median, Minimum und Maximum, Varianz und Standardabweichung angegeben. Die induktive Analyse der Verhaltensdaten erfolgte über Mittelwertsvergleiche der jeweiligen Subgruppen im Rahmen von ein- bzw. zweifaktoriellen Varianzanalysen (ANOVAs). Im Falle verletzter Annahmen zu Normalverteilung bzw. Varianzhomogenität der zugrundeliegenden Daten – untersucht mittels Shapiro-Wilk-Test sowie Levene- und Hartley's Test – wurden robuste Varianzanalysen (rANOVAs) durchgeführt, die auf 20%-getrimmten Mittelwerten mit Bootstrap-Schätzung (n = 2000) beruhten. Die Untersuchung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test wurde der ebenfalls üblichen Testung nach Kolmogorov-Smirnow vorgezogen, da Ersterer bei kleinen Stichproben zuverlässigere Aussagen zulässt. Im Falle signifikanter Interaktionseffekte wurde im Anschluss eine simple effects Analyse durchgeführt, bei ausschließlich signifikanten Haupteffekten erfolgten Post-hoc-Testungen mit paarweisen Vergleichen (t-Test bzw. robuster lincon Post-hoc-Test nach Wilcox). Die Stärke der Interaktions- und Haupteffekte wurde mit ω^2 geschätzt. Die Adjustierung des globalen α -Niveaus erfolgte über die Verwendung angepasster p-Werte mittels Bonferroni-Holm Korrektur. Als Schätzung der Post-hoc Effektstärken wurde Cohen's d oder als robuste Metrik ξ genutzt, jeweils mit 95% Konfidenzintervall.

2.3 (Ko)Expressionsanalyse

2.3.1 Netzwerkkonstruktion

Die Analyse der Koexpression erfolgte nach dem Ansatz der *weighted gene co-expression network analysis* (WGCNA; Zhang & Horvath, 2005). Basierend auf einer über eine robuste median-basierte *biweight midcorrelation* mit 10% data trimming (Wilcox, 2011) definierten Korrelationsmatrix der Expressionsdaten wird dabei ein Ähnlichkeitsmaß konstruiert, welches positive Korrelationen unverändert überträgt und negative auf Null setzt; hiervon wird über eine Potenzfunktion eine Nachbarschaftsmetrik (*network adjacency*) abgeleitet, die den Effekt schwacher und mit hoher Wahrscheinlichkeit artifizieller Korrelationen unterdrückt. Der Wert des Exponenten β in dieser Potenzfunktion wird festgelegt als das Minimum der Menge ganzer positiver Zahlen, unter dem für die resultierende *network adjacency* Matrix Skalenfreiheit angenommen werden kann. Diese Matrix wird schließlich in ein Konnektivitätsmaß transformiert, das *topological overlap measure (TOM)*, in welchem neben der paarweisen Nachbarschaft der Expressionsdaten auch das Ausmaß geteilter Nachbarschaft mit der übrigen Genexpression einfließt. Die hierdurch definierte Koexpression 1-TOM dient als Input für eine hierarchische Clusteranalyse. Im resultierenden Koexpressionsdendrogramm werden schließlich via *Dynamic Tree Cut* Algorithmus (Langfelder et al., 2008) Gruppen von ähnlich exprimierten Genen zu sog. Modulen zusammengefasst.

Die Daten jedes Moduls wurden einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen; die jeweils erste Hauptkomponente dient stellvertretend als Metrik der zusammengefassten Modulexpression und wird als Eigenen des Moduls bezeichnet. Über die Korrelation der Netzwerk-Eigenen mit dem Genotyp-Status können Module identifiziert werden, deren Expressionsprofile sich zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren unterscheiden. Zur Identifikation signifikanter Eigenen-Genotyp-Korrelationen wurde ein gemischter bayesscher-frequentistischer Ansatz gewählt, in dem Bayes-Faktor (Wetzels & Wagenmakers, 2012; zur Interpretation siehe **Tabelle 2**) und Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau kombiniert wurde ($p_{\text{Bonferroni}} \leq 0.05 \mid \text{BF} \geq 3$). Als Methode wurde auch hier die *biweight midcorrelation* genutzt. Auf individuelle Gene bezogen wurde die *module membership*, definiert als die Korrelation der Gen- mit der Eigenenexpression, als Zusammenhangsmaß für die Modulzugehörigkeit verwendet und die *gene significance*, d.h. die Korrelation der Genexpression mit dem Transgen-Status (WT = 0, BACHD = 1), als Metrik für den Zusammenhang zwischen Genexpression und Genotyp. Durch Ordnung der Gene nach ihrer *module membership* wurde deren *hubgene* Status bestimmt als

Orientierungsmaß dafür, wie stark ein Gen in seiner Konnektivität mit anderen Modulgenen zusammenhängt relativ zur Konnektivität der übrigen Modulgene.

Tabelle 2. Interpretation des Bayes Faktors (BF; Jeffreys, 1961) als Maß der Evidenz für die Null- bzw. die Alternativhypothese (H_0 bzw. H_1). In der vorliegenden Arbeit wurden diese definiert als $H_0: r = 0$ und $H_1: r \neq 0$ bezogen auf den Korrelationskoeffizienten r .

| BF | Interpretation |
|----------------|--|
| < 1/100 | Entscheidende Evidenz für H_0 |
| [1/100 – 1/30) | Sehr starke Evidenz für H_0 |
| [1/30 – 1/10) | Starke Evidenz für H_0 |
| [1/10 – 1/3) | Moderate Evidenz für H_0 |
| [1/3 – 1) | Anekdotische Evidenz für H_0 |
| 1 | Weder Evidenz für H_0 noch für H_1 |
| (1 – 3] | Anekdotische Evidenz für H_1 |
| (3 – 10] | Moderate Evidenz für H_1 |
| (10 – 30] | Starke Evidenz für H_1 |
| (30 – 100] | Sehr starke Evidenz für H_1 |
| > 100 | Entscheidende Evidenz für H_1 |

2.3.2 Konservierungsanalyse (module preservation)

Zur weiteren Validierung des Koexpressionsnetzwerks wurden Konservierungsanalysen mittels *WGCNA* durchgeführt, welche theoretisch in Langfelder et al., (2011) beschrieben werden. Genutzt wurden neben den oben bereits beschriebenen weiteren BACHD Expressionsdaten veröffentlichte Daten von Mäusen (Langfelder et al., 2016) und Menschen (Hodges et al., 2006; Durrenberger et al., 2015). Im Rahmen der Konservierungsanalyse wurden dichte- und konnektivitätsbasierte Statistiken zu einer zusammenfassenden sog. *preservation metric* zusammengefasst, welche die Generalisierbarkeit der in einer Netzwerkanalyse etablierten Moduleinteilung auf weitere Datensätze überprüft. Die statistische Signifikanz dieser Statistik wird über die zugehörige Z-Metrik Z_{summary} angegeben; die von Langfelder et al. (2011) zur Interpretation empfohlenen Richtwerte finden sich in **Tabelle 3**. Um eine kombinierte Wahrscheinlichkeitsaussage zur Generalisierbarkeit der Netzwerkstruktur über alle betrachteten Datensätze zu erhalten, wurde eine Metaanalyse der Z-Werte mittels Stouffer's Z-transformiertem Test durchgeführt (Stouffer et al., 1949; Whitlock, 2005), einer Abwandlung des Fisher's kombinierten Wahrscheinlichkeitstests (Fisher, 1933):

$$Z_{\text{Stouffer}} \sim \frac{\sum_{i=1}^k Z_i}{\sqrt{k}},$$

wobei k die Anzahl der aggregierten Z-Metriken darstellt und Z_i den Wert des i -ten aggregierten Z-Werts. Die Richtwerte zu Interpretation ergeben sich aus den in **Tabelle 3** aufgeführten Schwellenwerten, welche als durchschnittliche Z_i betrachtet werden und in Abhängigkeit zur

Gesamtzahl an Z-Werten stehen; so ergibt sich bspw. bei zwei zu aggregierenden Z-Werten Grenzwerte für Z_{Stouffer} von 2.828, 8.485 und 14.142 für schwache, moderate und starke Evidenz.

Tabelle 3. Interpretation der Z_{summary} Statistik hinsichtlich der Generalisierbarkeit der Moduleinteilung eines Koexpressionsnetzwerks in einem unabhängigen Datensatz (nach Langfelder et al., 2011; ergänzt wurde eine zusätzliche Unterteilung des Bereichs schwache bis moderate Evidenz im Intervall [2;10) in zwei Subintervalle)

| Z_{summary} | Interpretation |
|----------------------|------------------|
| > 10 | Starke Evidenz |
| [6;10) | Moderate Evidenz |
| [2;6) | Schwache Evidenz |
| < 2 | Keine Evidenz |

2.3.3 Differentielle Expressionsanalyse

Von der jeweiligen Experimentalbedingung abhängige Unterschiede in der Genexpression wurden sowohl auf globaler wie auf Modulebene mittels *DESeq2* analysiert (adjustiertes Signifikanzniveau $\alpha = .1$); Expressionsunterschiede wurden in logarithmischer relativer Veränderung (*log₂ fold change*, LFC) angegeben und ab $LFC \geq |0.1|$ als klinisch relevant angenommen. Genexpressionsprofile, welche beide Bedingungen erfüllten, wurden als differentiell exprimiert (*differentially expressed gene*, DEG) angenommen. Zur Testung des Zusammenhangs zwischen globaler differentieller Expression und Modulzugehörigkeit wurde ein Fisher-Yates-Test angewandt ($p_{\text{Bonferroni}} \leq .05$). Die Korrelation von LFC mit *module membership* erfolgte aufgrund logarithmierter Daten mittels Spearman's ρ .

2.3.4 Over-representation analysis

Zur funktionellen Analyse der identifizierten differentiell exprimierten Modulgene (DEGs) wurde eine *over-representation analysis* (ORA) mittels WebGestaltR (v0.4.3; Liao et al., 2019) durchgeführt. Die *gene ontology* Datenbank wurde mit den Annotationen der Bereiche *biological process*, *cellular component*, *molecular function* als Referenz genutzt. Als unteren und oberen Grenzwert für die Kategoriengröße wurden 50 und 1500 Gene gewählt. Zur Korrektur des Signifikanzniveaus wurde die vom Programm standardmäßig empfohlene Falscherkennungsrate nach Benjamini-Hochberg verwendet ($\alpha_{\text{korrigiert}} = .1$). Die 10 am stärksten in den DEGs signifikant überrepräsentierten Kategorien wurden berichtet.

2.3.5 Weitere statistische Verfahren

Als primäres Zusammenhangsmaß wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson angegeben; im Falle nicht erfüllter Annahmen wurde der nicht-parametrische Spearman-Korrelationskoeffizient ρ verwendet.

Veränderungen in der Anzahl an differentiell exprimierten Modulgenen in den verschiedenen Haltungsbedingungen wurden mittels Binomialtest untersucht; als Effektstärke wurde das korrespondierende *odd's ratio* angegeben. Die Analyse der quantitativen Veränderungen der differentiell exprimierten Modulgene erfolgte bei verletzten Annahmen einer Varianzanalyse über einen Kruskal-Wallis Test mit *post-hoc* Rangvergleichen.

3 Ergebnisse

3.1 Publierte Ergebnisse im Rahmen der Promotion

Die hier vorgestellten Ergebnisse sollen in ihren wesentlichen Aussagen im Rahmen einer wissenschaftlichen Publikation veröffentlicht werden (Kilzheimer et al., im Einreichungsprozess). Im Rahmen der Promotion entstanden zwei weitere Veröffentlichungen, in welchen der hier beschriebene Analyseansatz im Kontext von Morbus Parkinson (Kilzheimer et al., 2023) und dem Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom (Hentrich et al., 2020) angewandt wurde. Zusätzlich wurden thematisch assoziierte Übersichtsarbeiten in Kilzheimer & Schulze-Hentrich (2018) und Kilzheimer et al. (2019) veröffentlicht.

3.2 Verwendete Nomenklatur

Die Bezeichnung der verschiedenen durch das Versuchsdesign festgelegten Versuchsgruppen wurde über Genotyp (WT und BACHD), Haltungsbedingung (SE und EE) sowie Dauer der Exposition gegenüber Letzterer ($EE_{\text{früh}}$ und $EE_{\text{spät}}$) definiert und benannt (siehe zusammenfassend **Tabelle 4**). Wo auf anderem Wege eindeutig ersichtlich, wurde zur besseren Lesbarkeit auf Angabe der Expositionsdauer verzichtet.

Tabelle 4. Verwendete Kürzel zur Bezeichnung der jeweiligen Versuchsgruppe

| | | Haltungsbedingung | Genotyp | |
|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------------------------|---|
| | | | WT | BACHD |
| Dauer der Exposition | Sechsmonatszeitpunkt | SE | WT SE ^{6m} | BACHD SE ^{6m} |
| | | EE | WT EE _{früh} ^{6m} | BACHD EE _{früh} ^{6m} |
| | Zwölfmonatszeitpunkt | SE | WT SE ^{12m} | BACHD SE ^{12m} |
| | | EE _{früh} | WT EE _{früh} ^{12m} | BACHD EE _{früh} ^{12m} |
| | | EE _{spät} | WT EE _{spät} ^{12m} | BACHD EE _{spät} ^{12m} |

3.3 Verhaltensmessung

Aufgrund verletzter Annahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität (siehe **Tabellen 5-10**) wurden robuste Varianzanalysen durchgeführt (rANOVA, 20% Trimm, $n_{\text{Bootstraps}} = 2000$).

3.3.1 Gewichtszunahme in der frühen Entwicklung

In der Gewichtsentwicklung während der ersten 22 Lebenswochen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den robusten Mittelwerten der Kohorten ($F_{\text{bootstrapped}} = 32.6$, $p < .001$, siehe **Abbildung 2** und **Tabelle 5**). Beide BACHD Gruppen nahmen mit 309 (in SE) bzw. 331

Gramm (in EE_{früh}) signifikant mehr Gewicht zu als die WT Kohorten mit korrespondierenden Werten von 265 bzw. 260 Gramm ($\hat{\psi} < -51.5$, $p_{\text{Holm}} < .001$, $\xi > .69$).

Tabelle 5. Gewichtsentwicklung in den Versuchsbedingungen während der ersten 22 Lebenswochen, zusätzlich Teststatistiken zur Überprüfung der Annahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität. Die Normalverteilungsannahme wurde mittels Test nach Shapiro-Wilks geprüft, die Testung auf Varianzhomogenität erfolgte mit Levene-Test und Hartley's Test. Tiere der EE_{spät} Gruppen wurden angesichts der zum Erhebungszeitpunkt gleichen Umgebungsbedingungen mit den SE Tieren des korrespondierenden Genotyps zusammengefasst.

| Bedingung | Gewichtszunahme [Gramm] | n | Shapiro-Wilks (W) | Levene (F(df)) | Hartley (F(df, k)) |
|--------------------------|-------------------------|----|-------------------|----------------|-------------------------------|
| WT SE | 265 | 54 | 0.931** | | |
| WT EE _{früh} | 260 | 36 | 0.982 | F(3)=2.334' | F _{Max} (35,4)=2.72* |
| BACHD SE | 309 | 54 | 0.983 | | |
| BACHD EE _{früh} | 331 | 35 | 0.969 | | |

Interpretation: ' p <.1, * p <.05, ** p <.01, *** p <.001

df: Anzahl der Freiheitsgrade

k: Anzahl einbezogener Gruppen

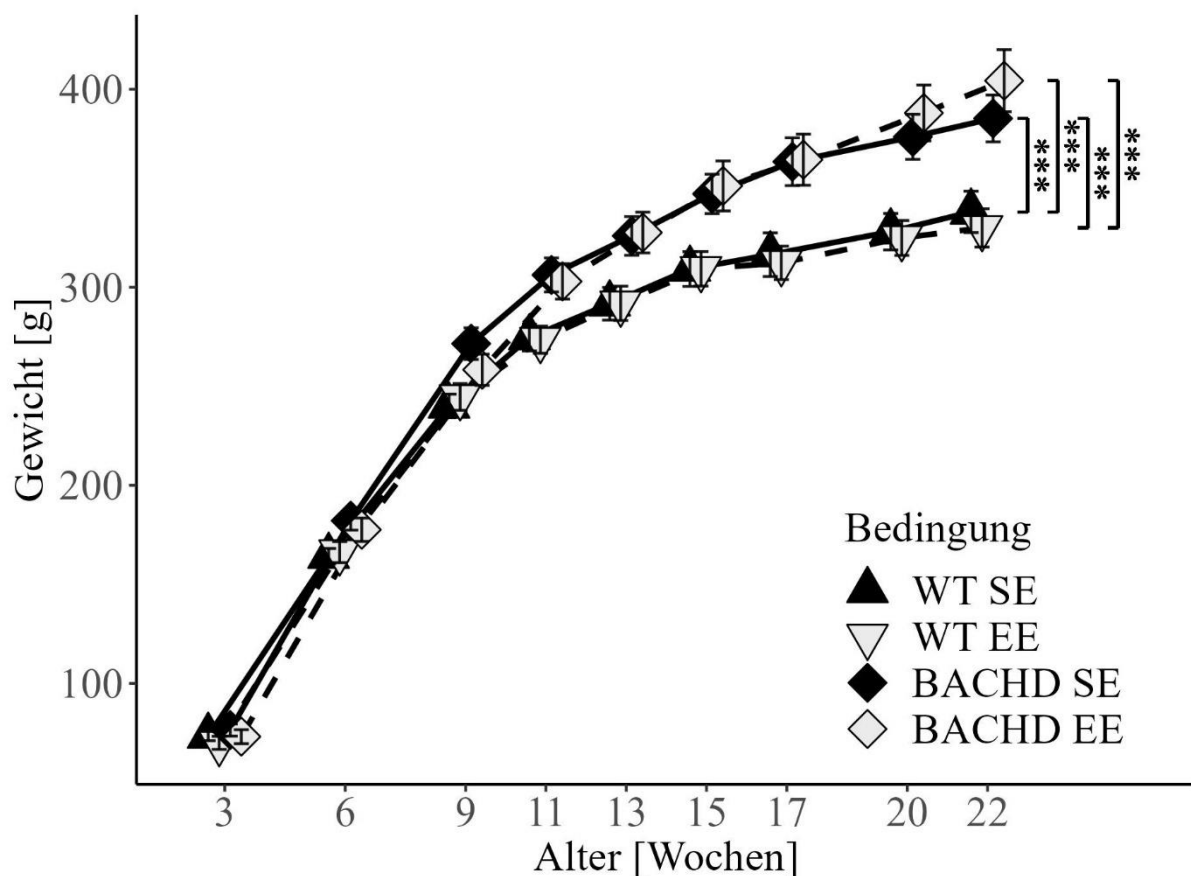


Abbildung 2. Mittlere Gewichtsentwicklung der Experimentalgruppen in den ersten 22 Lebenswochen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

Interpretation: ' p <.1, * p <.05, ** p <.01, *** p <.001

3.3.2 Simple swim test (SST)

Der SST wurde zur Evaluation der kognitiven Fähigkeiten durchgeführt (siehe **Tabellen 6 und 7**). Während die Übungs- bzw. Akquisitionsphase (SST-A) Lern- und Gedächtniskompetenzen prüft, dient die *reverse trial* Phase (SST-RT) der Beurteilung einer allgemeineren Adaptivität der kognitiven Domäne. Gemessen wurde jeweils die Zeit, in der Tiere nach Aussetzen im Wassertank die Plattform erreichten (*time to platform*). Für SST-A wurde die mittlere Verbesserung über alle Versuche genutzt.

Tabelle 6. Ergebnisse der *reverse trials* des Simple Swim Test (SST-RT). Angegeben ist die mittlere *time to platform* in der jeweiligen Versuchsbedingung sowie daneben Teststatistiken zur Überprüfung der Annahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität (Test nach Shapiro-Wilks, Levene-Test und Hartley's Test).

| Bedingung | <i>time to platform</i> [Sekunden] | n | Shapiro- Wilks (W) | Levene (F(df)) | Hartley (F(df, k)) |
|-----------------------------|---------------------------------------|----|--------------------------|---------------------|---------------------------------|
| Sechsmonatszeitpunkt | | | | | |
| WT SE | 5.7 | 18 | 0.972 | | |
| WT EE _{früh} | 6.0 | 18 | 0.764*** | F(3)=3.125* | F _{Max} (17,4)=8.42*** |
| BACHD SE | 7.8 | 18 | 0.923 | | |
| BACHD EE _{früh} | 6.0 | 18 | 0.944 | | |
| Zwölfmonatszeitpunkt | | | | | |
| WT SE | 9.1 | 18 | 0.864* | | |
| WT EE _{früh} | 9.5 | 19 | 0.943 | | |
| WT EE _{spät} | 9.6 | 17 | 0.933 | F(5)=0.771 | F _{Max} (16,6)=3.342 |
| BACHD SE | 12.9 | 17 | 0.870* | | |
| BACHD EE _{früh} | 11.5 | 14 | 0.952 | | |
| BACHD EE _{spät} | 12.9 | 17 | 0.903' | | |

Interpretation: ' p <.1, * p <.05, ** p <.01, *** p <.001

df: Anzahl der Freiheitsgrade, k: Anzahl einbezogener Gruppen

Tabelle 7. Ergebnisse des acquisition training des Simple Swim Test (SST-AT). Angegeben ist die mittlere individuelle Reduktion in der *time to platform* in der jeweiligen Versuchsbedingung sowie daneben Teststatistiken zur Überprüfung der Annahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität (Test nach Shapiro-Wilks, Levene-Test und Hartley's Test).

| Bedingung | Mittlere Verbesserung [Sekunden] | n | Shapiro-Wilks (W) | Levene (F(df)) | Hartley (F(df, k)) |
|-----------------------------|----------------------------------|----|-------------------|------------------|-------------------------------|
| Sechsmonatszeitpunkt | | | | | |
| WT SE | 1.5 | 18 | 0.877* | | |
| WT EE _{früh} | 1.5 | 18 | 0.975 | F(3)=1.351 | F _{Max} (17,4)=2.697 |
| BACHD SE | 1.6 | 18 | 0.932 | | |
| BACHD EE _{früh} | 1.5 | 18 | 0.748*** | | |
| Zwölfmonatszeitpunkt | | | | | |
| WT SE | 2.6 | 18 | 0.932 | | |
| WT EE _{früh} | 2.1 | 19 | 0.957 | | |
| WT EE _{spät} | 3.1 | 17 | 0.928 | F(5)=0.531 | F _{Max} (16,6)=2.794 |
| BACHD SE | 3.4 | 17 | 0.968 | | |
| BACHD EE _{früh} | 1.9 | 14 | 0.941 | | |
| BACHD EE _{spät} | 4.4 | 17 | 0.973 | | |

Interpretation: ' p <.1, * p <.05, ** p <.01, *** p <.001

df: Anzahl der Freiheitsgrade, k: Anzahl einbezogener Gruppen

Zum Sechsmonatszeitpunkt zeigte sich in SST-RT ein Haupteffekt des Genotyps ($\omega^2 = .04$, $p < .05$, siehe **Abbildung 3**). WT Tiere erreichten die Plattform im Mittel schneller als BACHD Tiere ($|\Delta_{robust}| = 0.9$ Sekunden, $\hat{\psi} = -1.96$, $p_{Holm} < .05$, $\xi = .39$ mit $KI_{95\%}[0 ; .70]$). Umwelt- und Interaktionseffekte waren statistisch nicht signifikant ($p_{Holm} > .13$). In SST-A zeigte sich kein statistisch signifikanter Gruppenunterschied ($p > .66$) in der Verbesserung der *time to platform*.

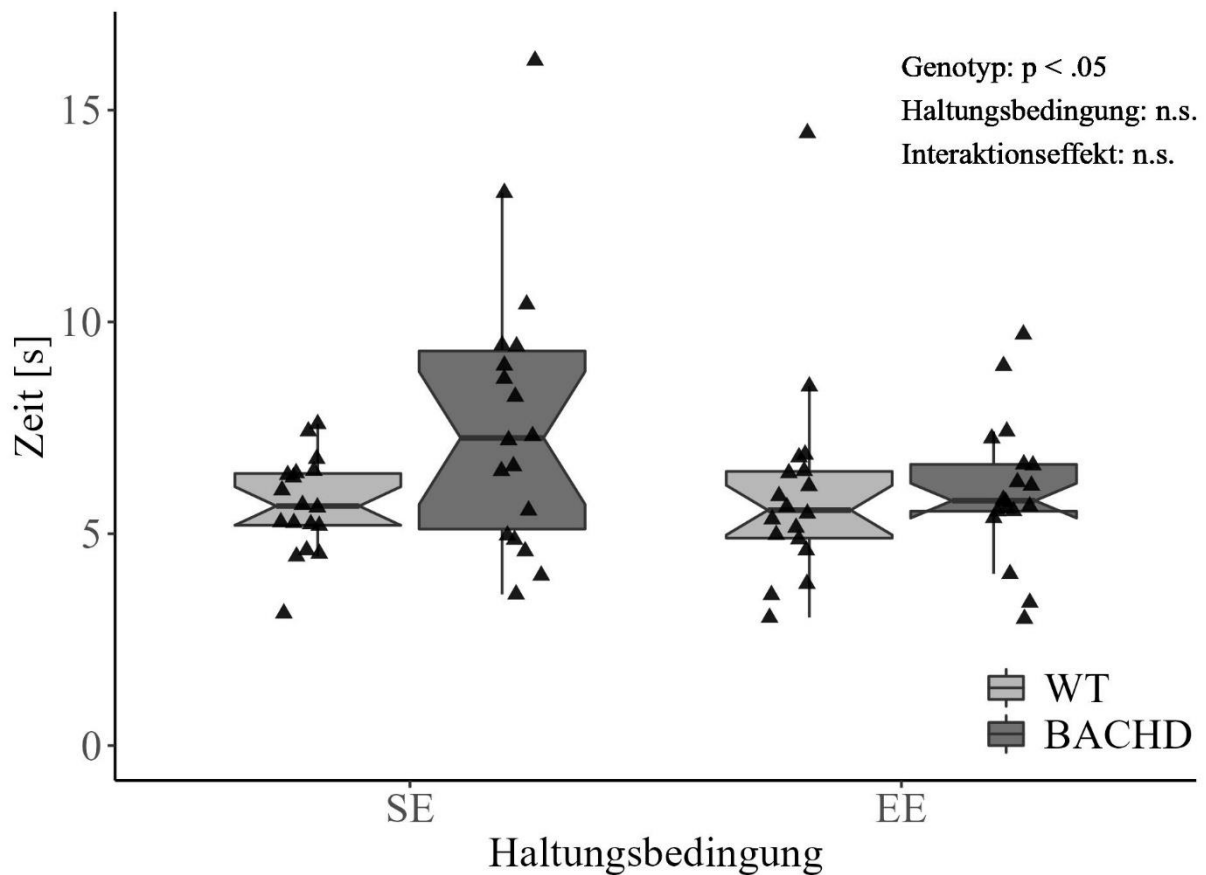


Abbildung 3. *Time to platform* während der reverse trials des Simple Swim Test (SST-RT) in der Sechsmonatskohorte. Die Kerben des Boxplot geben das 95%-Konfidenzintervall um den Median an. Ergebnisse der rANOVA für Haupt- und Interaktionseffekte sind in der rechten oberen Ecke dargestellt.

In der Zwölfmonatskohorte zeigte sich in SST-RT ebenfalls ein signifikanter Genotyp-Haupteffekt auf die mittlere zum Erreichen der Plattform benötigte Zeit ($\omega^2 = .17$, $p < .001$, siehe **Abbildung 4**). Auch hier waren wie schon zum Sechsmonatszeitpunkt BACHD-Ratten langsamer als WT Tiere ($|\Delta_{robust}| = 3.0$ Sekunden, $\hat{\psi} = -8.5$, $p_{Holm} < .001$, $\xi = .60$ mit $KI_{95\%} [.36 ; .76]$). Keine weiteren Effekte erreichten statistische Signifikanz ($p_{Holm} > .60$). In SST-A wurde die Verbesserungsrate signifikant von der Haltungsbedingung beeinflusst ($\omega^2 = .09$, $p < .01$). Konkret verbesserten sich $EE_{spät}$ Tiere stärker als Ratten unter $EE_{früh}$ Bedingungen ($|\Delta_{robust}| = 0.57$ Sekunden, $\hat{\psi} = -3.0$, $p_{Holm} < .01$, $\xi = .12$ mit $KI_{95\%} [0 ; .44]$). Der Genotyp als Haupteffekt verfehlte statistische Signifikanz nur knapp ($p = .0525$) und zeigte auch als Ko-Interaktor keinen signifikanten Einfluss auf die Lernleistung ($p = .23$).

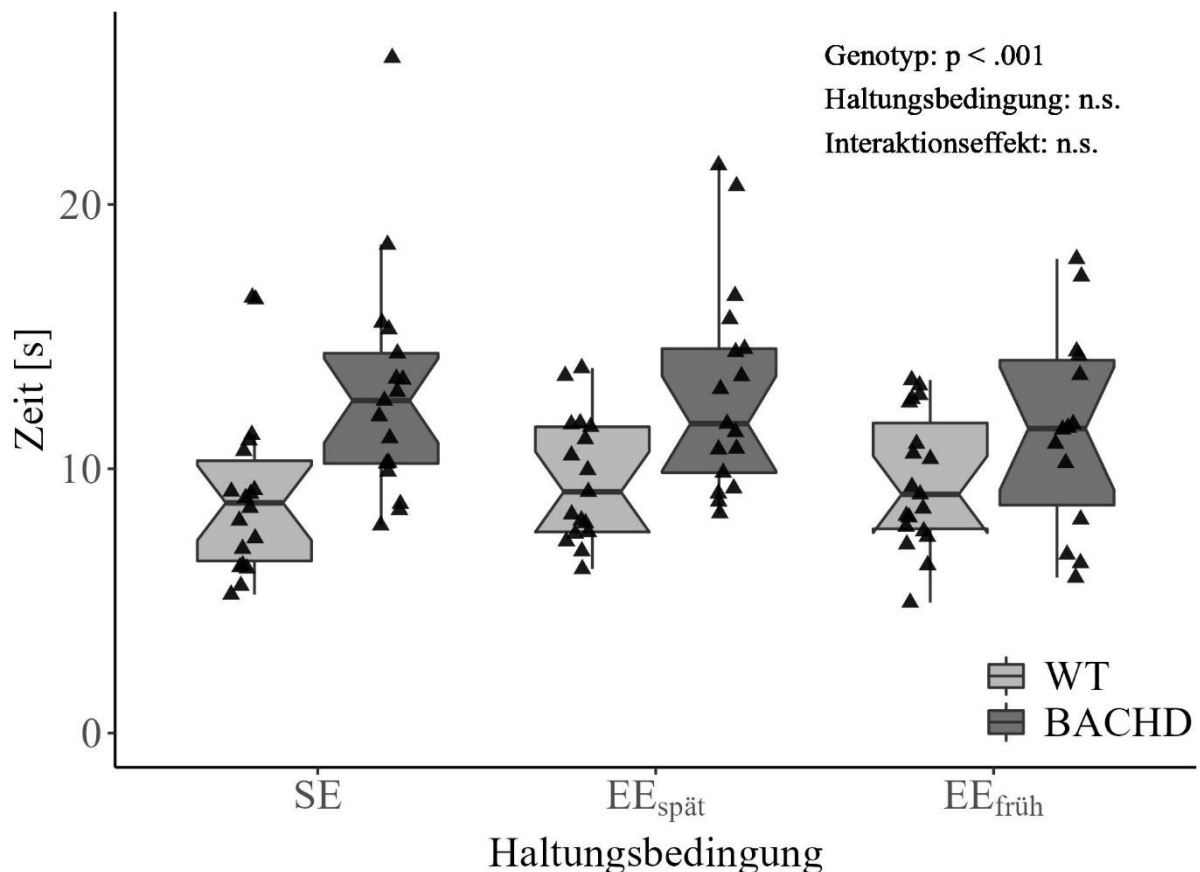


Abbildung 4. *Time to platform* während der reverse trials des Simple Swim Test (SST-RT) in der Zwölfmonatskohorte. Die Kerben des Boxplot geben das 95%-Konfidenzintervall um den Median an. Ergebnisse der rANOVA für Haupt- und Interaktionseffekte sind in der rechten oberen Ecke dargestellt.

3.3.3 Elevated plus maze (EPM)

EPM diente der Evaluation Angst-bezogenen Verhaltens operationalisiert über die Zeit, welche während des fünfminütigen Testzeitraums in den offenen Armen des Labyrinths verbracht wurde (*time in open arms*, siehe **Tabelle 8**).

In den sechs Monate alten Kohorten zeigten keine signifikanten Gruppenunterschiede in der im offenen Arm verbrachten Zeit ($p > .11$). Demgegenüber zeigte sich in der Zwölfmonatskohorte ein signifikanter Genotyp-Effekt ($\omega^2 = .05$, $p < .01$, siehe **Abbildung 5**) in Form eines kürzeren Aufhaltens von BACHD Tieren in den offenen Armen ($|\Delta_{robust}| = 27.3$ Sekunden, $\hat{\psi} = 74.8$, $p_{Holm} < .01$, $\xi = .38$ mit $KI_{95\%} [.12 ; .63]$) im Vergleich zu WT Ratten. Wohnungsbedingungen zeigten keinen Einfluss auf das demonstrierte Verhalten ($p > .08$).

Tabelle 8. Ergebnisse des Elevated Plus Maze. Angegeben ist die mittlere *time in open arms* in der jeweiligen Versuchsbedingung sowie daneben Teststatistiken zur Überprüfung der Annahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität (Test nach Shapiro-Wilks, Levene-Test und Hartley's Test).

| Bedingung | <i>time in open arms</i> [Sekunden] | n | Shapiro-Wilks (W) | Levene (F(df)) | Hartley (F(df, k)) |
|-----------------------------|-------------------------------------|----|-------------------|------------------|-------------------------------|
| Sechsmonatszeitpunkt | | | | | |
| WT SE | 72.5 | 15 | 0.913 | | |
| WT EE _{früh} | 82.7 | 18 | 0.940 | | |
| BACHD SE | 89 | 17 | 0.873* | F(3)=1.604 | F _{Max} (16,4)=2.352 |
| BACHD EE _{früh} | 99.9 | 17 | 0.976 | | |
| Zwölfmonatszeitpunkt | | | | | |
| WT SE | 118 | 18 | 0.914 | | |
| WT EE _{früh} | 90 | 18 | 0.948 | | |
| WT EE _{spät} | 128 | 18 | 0.948 | | |
| BACHD SE | 83 | 16 | 0.976 | F(5)=0.141 | F _{Max} (17,6)=1.895 |
| BACHD EE _{früh} | 99 | 16 | 0.891' | | |
| BACHD EE _{spät} | 95 | 14 | 0.938 | | |

Interpretation: 'p<.1, * p<.05, **p<.01, ***p<.001

df: Anzahl der Freiheitsgrade, k: Anzahl einbezogener Gruppen

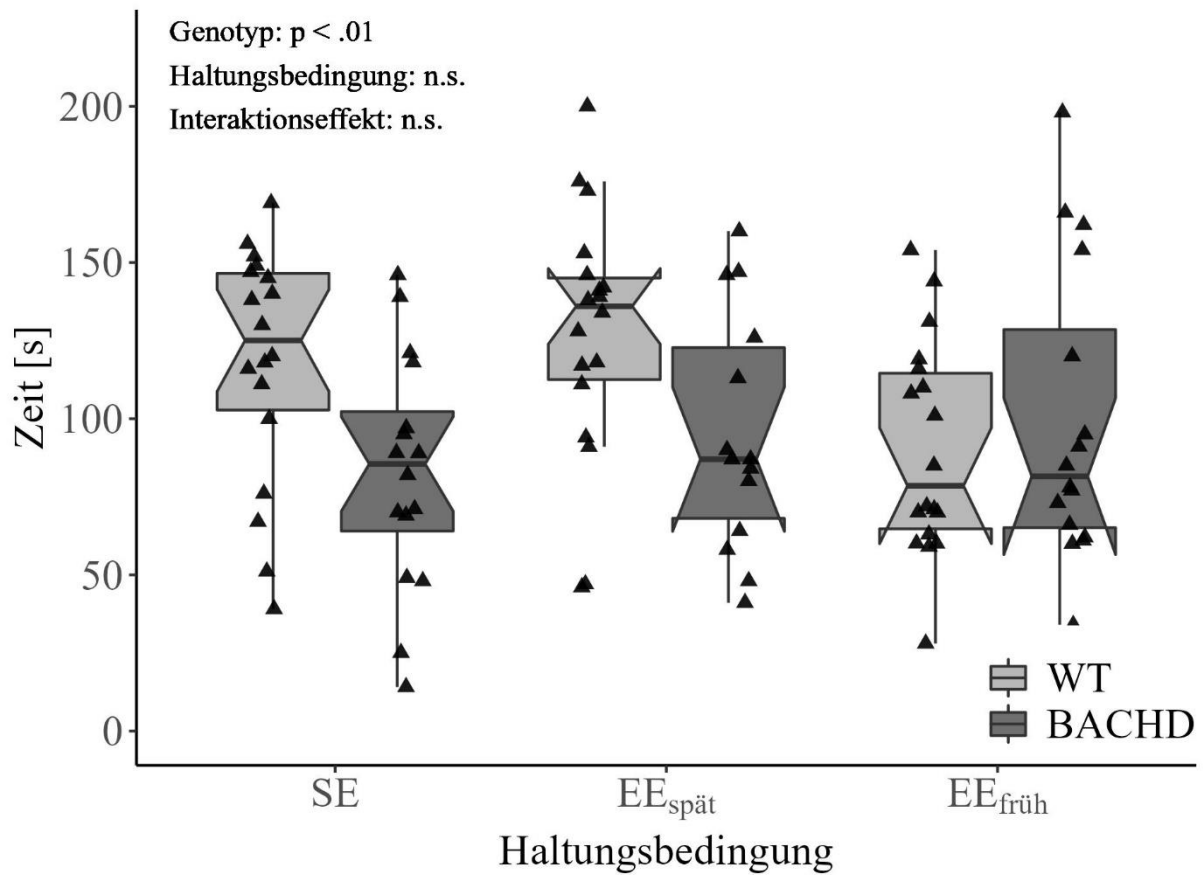


Abbildung 5. *Time in open arms* im *Elevated Plus Maze* (EPM) in der Zwölfmonatskohorte. Die Kerben des Boxplot geben das 95%-Konfidenzintervall um den Median an. Ergebnisse der rANOVA für Haupt- und Interaktionseffekte sind in der linken oberen Ecke dargestellt.

3.3.4 PhenoMaster Aktivität (PM)

Lokomotorik wurde getrennt nach Dunkel- (PM-D) und Licht- bzw. Hellphase (PM-L) in zurückgelegten Zentimetern gemessen (siehe **Tabellen 9 und 10**).

Tabelle 9. Lokomotorische Aktivität während der Dunkelphase. Angegeben ist die mittlere zurückgelegte Distanz in der jeweiligen Versuchsbedingung sowie daneben Teststatistiken zur Überprüfung der Annahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität (Test nach Shapiro-Wilks, Levene-Test und Hartley's Test).

| Bedingung | Zurückgelegte Distanz [Zentimeter] | n | Shapiro-Wilks (W) | Levene (F(df)) | Hartley (F(df, k)) |
|-----------------------------|------------------------------------|----|-------------------|------------------|----------------------------------|
| Sechsmonatszeitpunkt | | | | | |
| WT SE | 1763 | 18 | 0.880* | F(3)=1.722 | F _{Max} (17,4)=9.794*** |
| WT EE _{früh} | 1652 | 18 | 0.945 | | |
| BACHD SE | 1319 | 18 | 0.706*** | | |
| BACHD EE _{früh} | 896 | 18 | 0.967 | | |
| Zwölfmonatszeitpunkt | | | | | |
| WT SE | 1174 | 18 | 0.972 | F(5)=3.283** | F _{Max} (14,6)=6.812* |
| WT EE _{früh} | 972 | 17 | 0.939 | | |
| WT EE _{spät} | 819 | 18 | 0.951 | | |
| BACHD SE | 682 | 18 | 0.893* | | |
| BACHD EE _{früh} | 557 | 15 | 0.881* | | |
| BACHD EE _{spät} | 625 | 17 | 0.831** | | |

Interpretation: 'p<.1, * p<.05, **p<.01, ***p<.001

df: Anzahl der Freiheitsgrade, k: Anzahl einbezogener Gruppen

Tabelle 10. Lokomotorische Aktivität während der Hellphase. Angegeben ist die mittlere zurückgelegte Distanz in der jeweiligen Versuchsbedingung sowie daneben Teststatistiken zur Überprüfung der Annahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität (Test nach Shapiro-Wilks, Levene-Test und Hartley's Test).

| Bedingung | Zurückgelegte Distanz [Zentimeter] | n | Shapiro-Wilks (W) | Levene (F(df)) | Hartley (F(df, k)) |
|-----------------------------|------------------------------------|----|-------------------|------------------|-----------------------------------|
| Sechsmonatszeitpunkt | | | | | |
| WT SE | 493 | 18 | 0.845** | F(3)=2.558' | F _{Max} (17,4)=11.845*** |
| WT EE _{früh} | 505 | 18 | 0.844** | | |
| BACHD SE | 469 | 18 | 0.891* | | |
| BACHD EE _{früh} | 327 | 18 | 0.955 | | |
| Zwölfmonatszeitpunkt | | | | | |
| WT SE | 277 | 18 | 0.858* | F(5)=0.400 | F _{Max} (14,6)=2.131 |
| WT EE _{früh} | 262 | 17 | 0.963 | | |
| WT EE _{spät} | 226 | 18 | 0.840** | | |
| BACHD SE | 256 | 18 | 0.958 | | |
| BACHD EE _{früh} | 219 | 15 | 0.960 | | |
| BACHD EE _{spät} | 207 | 17 | 0.893' | | |

Interpretation: 'p<.1, * p<.05, **p<.01, ***p<.001

df: Anzahl der Freiheitsgrade, k: Anzahl einbezogener Gruppen

Im Alter von sechs Monaten zeigte sich in PM-D ein signifikanter Genotyp-Haupteffekt ($\omega^2 = .28$, $p < .001$) mit geringerer Aktivität in BACHD Tieren ($|\Delta_{robust}| = 622$ Zentimeter, $\hat{\psi} = 1188.9$, $p_{Holm} < .001$, $\xi = .87$ mit $KI_{95\%} [.69 ; .98]$, siehe **Abbildung 6**). Haltungsbedingungen zeigten weder im Haupt- ($p = .07$) noch im Interaktionseffekt ($p = .18$) einen signifikanten Einfluss. Die in PM-L gemessene Aktivität zeigte keine durch Genotyp oder Haltungsbedingungen ausgelösten signifikanten Unterschiede ($p > .12$).

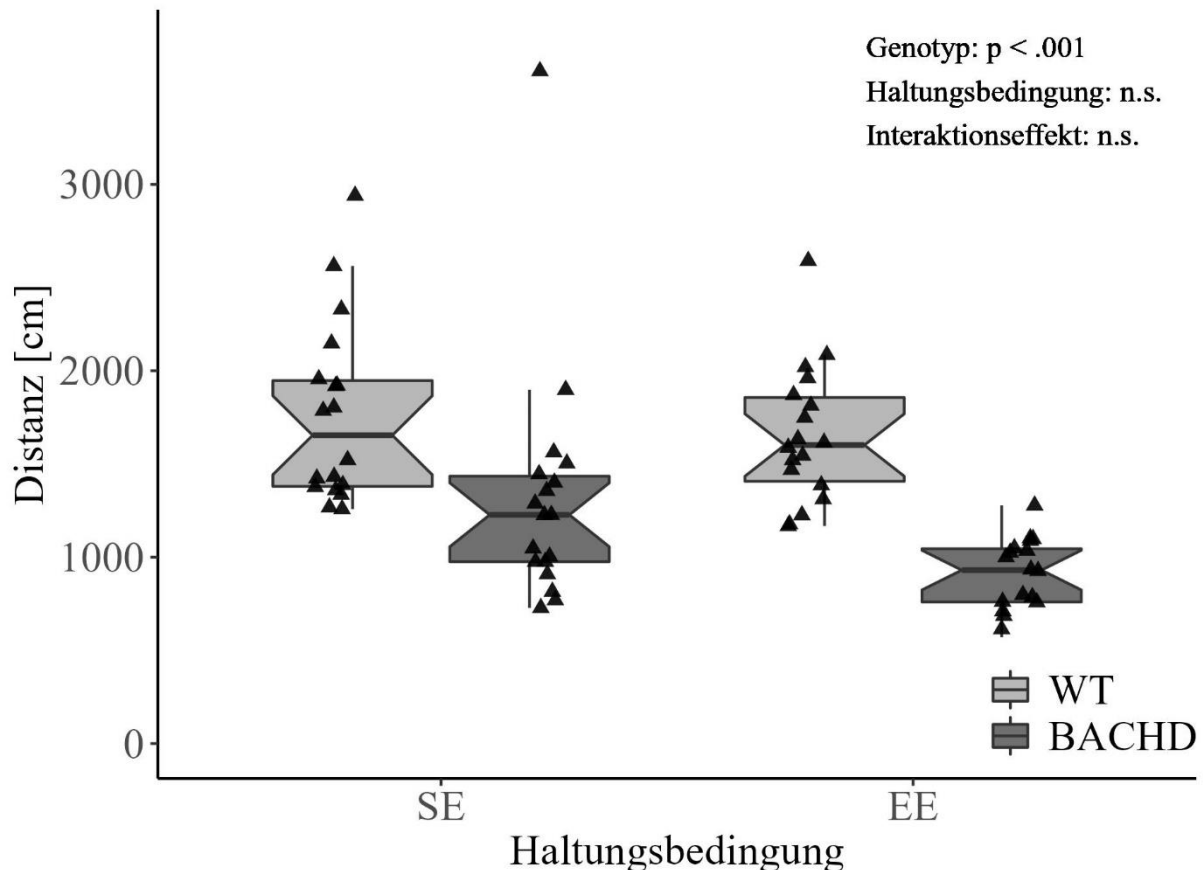


Abbildung 6. Zurückgelegte mittlere Distanz während der Dunkelphase in der Sechsmonatskohorte. Die Kerben des Boxplot geben das 95%-Konfidenzintervall um den Median an. Ergebnisse der rANOVA für Haupt- und Interaktionseffekte sind in der rechten oberen Ecke dargestellt.

Zum Zwölfmonatszeitpunkt zeigte sich in Dunkelphase-Aktivität (PM-D) eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Haltungsbedingungen ($\omega^2 = .05$, $p < .05$). Die *simple effects* Analyse zeigte signifikant geringere zurückgelegte Distanzen durch BACHD Tiere aller Haltungsbedingungen im Vergleich zu WT Tieren (siehe **Tabelle 11**). Diese Unterschiede waren in $EE_{spät}^{12m}$ geringer ausgeprägt als in SE ($\hat{\psi} = 227.6$, $p_{Holm} < .05$) oder $EE_{früh}^{12m}$ ($\hat{\psi} = -188.9$, $p_{Holm} < .01$). Zwischen SE^{12m} und $EE_{früh}^{12m}$ bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Genotyp-Effekts ($\hat{\psi} = 38.7$, $p_{Holm} = .36$). Als primär ursächlich für

den beobachteten Interaktionseffekt anzusehen sind dabei Unterschiede zwischen den WT-Subgruppen (siehe **Abbildung 7**). Die Analyse der Daten aus PM-L ergab einen signifikanten Haupteffekt der Haltungsbedingung ($\omega^2 = .06$, $p < .01$) mit einer geringeren zurückgelegten Distanz durch Tiere in $EE_{spät}^{12m}$ im Vergleich mit SE^{12m} Tieren ($|\Delta_{robust}| = 52$ Zentimeter, $\hat{\psi} = 106.2$, $p_{Holm} < .05$, $\xi = .49$ mit $KI_{95\%} [.13 ; .74]$).

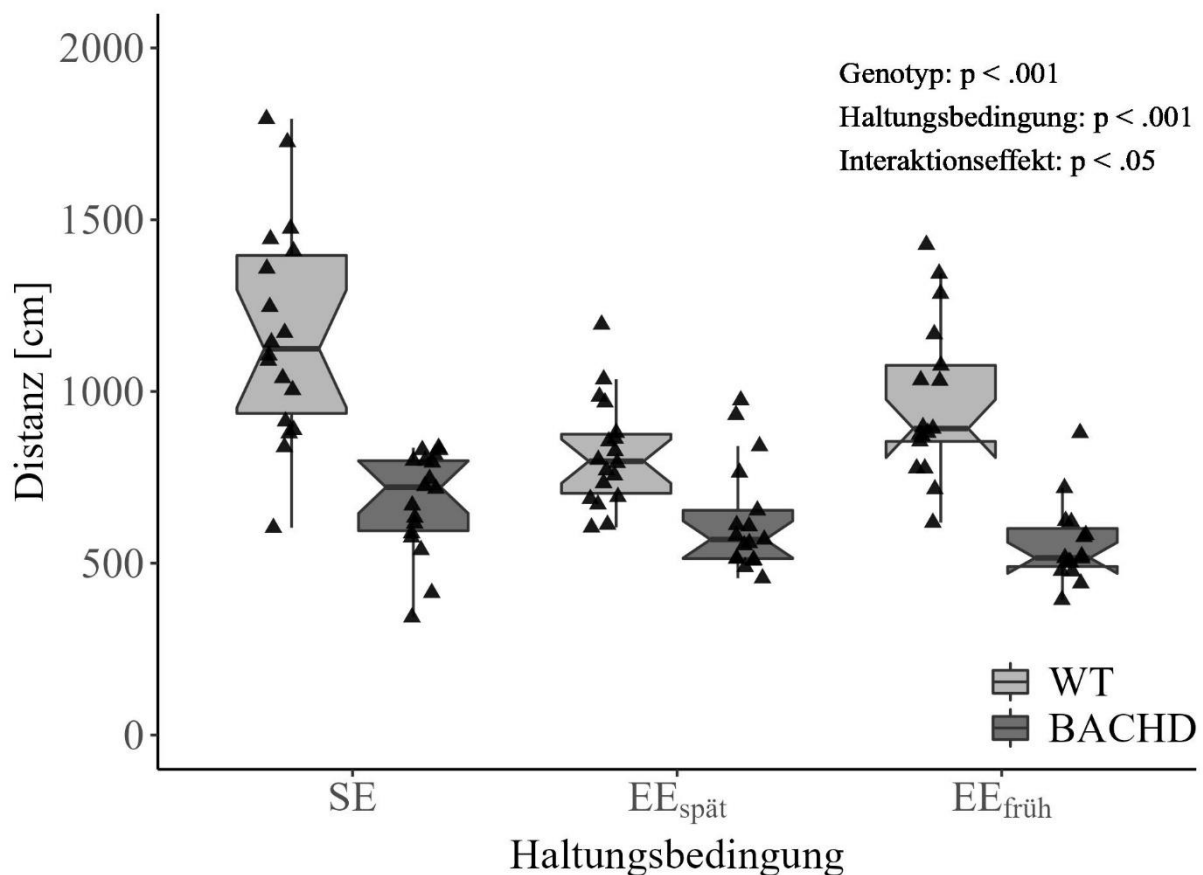


Abbildung 7. Zurückgelegte mittlere Distanz während der Dunkelpphase in der Zwölfmonatskohorte. Die Kerben des Boxplot geben das 95%-Konfidenzintervall um den Median an. Ergebnisse der rANOVA für Haupt- und Interaktionseffekte sind in der rechten oberen Ecke dargestellt.

Tabelle 11. Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität während der Dunkelpphase (PM-D) zwischen zwölf Monate alten BACHD und WT Tieren in Abhängigkeit der Haltungsbedingung. Angegeben ist der absolute Betrag der Differenz zwischen den robusten Mittelwerten der jeweiligen Versuchsgruppen und die korrespondierende Effektstärke mit 95% Konfidenzintervall.

| Haltungsbedingung | $ \Delta_{robust} $ [cm] | Effektstärke (ξ [$KI_{95\%}$]) |
|-------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| SE | 445 | .97 [.75 ; .99] |
| $EE_{früh}$ | 406 | .83 [.78; .99] |
| $EE_{spät}$ | 217 | .75 [.36; .95] |

3.3.5 Zusammenfassung der Analyse der Verhaltensdaten

In Zusammenschau der Ergebnisse der Verhaltensmessungen zeigt sich ein deutlicher Transgen-attribuerter Effekt. Dieser beeinflusste bereits in der frühen Entwicklung die Gewichtsentwicklung stark und führte zu einer stärkeren Gewichtszunahme in BACHD Tieren. Im Simple Swim Test zeigten sich im *Reverse Trial* Hinweise auf eine früh startende und progrediente Verschlechterung kognitiver Fähigkeiten in transgenen Tieren mit zunächst moderatem und schließlich starkem Effekt. Dies zeigte sich in der Akquisitionsphase nicht. Stattdessen präsentierten $EE_{spät}^{12m}$ Tiere eine leicht verbesserte Lernfähigkeit im Vergleich zu $EE_{früh}^{12m}$ Tieren, wobei dieser Effekt durch das zugehörige Konfidenzintervall infrage gestellt wird. Im *Elevated Plus Maze* präsentierten sechs Monate alte Tiere unabhängig Genotyp und Haltungsbedingungen in vergleichbarem Maße Angst-bezogenes Verhalten, während dieses bei BACHD Tieren zum Zwölfmonatszeitpunkt moderat stärker ausgeprägt als bei WT Ratten vorlag. PhenoMaster-Daten wiesen in der aktiveren Dunkelphase eine starke Beeinträchtigung der Lokomotorik bei BACHD Tieren zu beiden Zeitpunkten auf. In zwölf Monate alten Tieren zeigte sich eine von WT Ratten ausgehende leichte Modifikation des Genotyp-Effekts mit verringerten Unterschieden unter $EE_{spät}^{12m}$ Haltungsbedingungen verglichen mit beiden übrigen Bedingungen. Hellphase-Daten zeigten einen moderaten Effekt der Haltungsbedingung. Im Vergleich mit der SE^{12m} Gruppe legten $EE_{spät}^{12m}$ Tiere hier eine geringere Distanz zurück.

Insgesamt zeigte sich in der Verhaltensmessung eine deutliche, teils progressive Affektion transgener Tiere durch mHTT-induzierte Effekte. BACHD Tiere wiesen eine verstärkte Gewichtszunahme in der frühen Entwicklung auf. Die kognitive Leistung lag bei transgenen Tieren moderat bis stark beeinträchtigt vor mit Tendenz zur altersabhängigen progressiven Verschlechterung. Effekte auf Angst-bezogenes Verhalten setzten später ein mit moderater Steigerung in BACHD Tieren. Die Lokomotorik lag bei transgenen Tieren stark und zu beiden Alterszeitpunkten in vergleichbarem Maße beeinträchtigt vor.

3.4 Bestimmung der Koexpression und mHTT-induzierter transkriptioneller Dysregulation

3.4.1 Generierung des Koexpressionsnetzwerks

Um den Effekt des Transgens auf das striatale Transkriptom unabhängig von seiner potenziellen Modulation durch *environmental enrichment* beschreiben zu können, wurde mittels WGCNA ein Koexpressionsnetzwerk basierend auf den Expressionsdaten der 13 SE Tiere des Zwölfmonatszeitpunkts konstruiert (7 WT und 6 BACHD Tiere). Für die der *adjacency matrix*

unterliegenden Potenzfunktion wurde der Exponent $\gamma=4$ festgelegt, da dieser für den vorliegenden Datensatz den kleinsten Wert darstellt, mit dem Skaleneinheit für das entstehende Netzwerk angenommen werden kann ($R^2 = 0.83$, siehe **Tabelle 12**).

Tabelle 12. Netzwerk-Indizes für verschiedene Exponenten γ der Potenzfunktion. R^2 beschreibt dabei die Anpassungsgüte an ein skaleneinheitliches Modell. Markiert ist der für die Erstellung des Koexpressionsnetzwerks ausgewählte Wert.

| γ | R^2 | Konnektivität | | |
|----------|-------------|---------------|------------|------------|
| | | Mittelwert | Median | Maximum |
| 1 | 0.04 | 1539 | 1491 | 2420 |
| 2 | 0.49 | 632 | 578 | 1382 |
| 3 | 0.74 | 315 | 270 | 920 |
| 4 | 0.83 | 177 | 141 | 665 |
| 5 | 0.88 | 108 | 80 | 504 |
| 6 | 0.90 | 70 | 48 | 396 |
| 7 | 0.92 | 48 | 30 | 318 |
| 8 | 0.91 | 34 | 20 | 261 |
| 9 | 0.92 | 24 | 13 | 218 |
| 10 | 0.92 | 18 | 9 | 184 |

Das resultierende Netzwerk teilte den Expressionsraum von 11.159 Genen in 98 Module ein (siehe **Abbildung 8**). Die Modulgröße lag dabei zwischen 36 und 853 koexprimierten Genen (siehe **Appendix 1**). Der Zusammenhang zwischen Modul-Expression und Genotyp wurde über die *biweight midcorrelation* (*bicor*) von Modul-Eigenen mit Genotyp quantifiziert (0 = WT, 1 = BACHD). Dabei ergab sich für 5 Module ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p_{\text{Bonferroni}} \leq .05$ | Bayes-Faktor > 3 , siehe **Tabelle 13**). Im Rahmen der bayesschen Analyse zeigten drei dieser Module moderate (*Mediumpurple2*, *Palevioletred3* und *Purple*) und zwei Module starke (*Brown2* und *Cyan*) Evidenz für das Vorliegen eines relevanten Zusammenhangs zwischen Modulexpression und Genotyp; ein Zusammenhang war basierend auf der Modulexpression in etwa 8- bis 27-mal wahrscheinlicher als eine Unabhängigkeit vom Genotyp (siehe **Tabelle 2**).

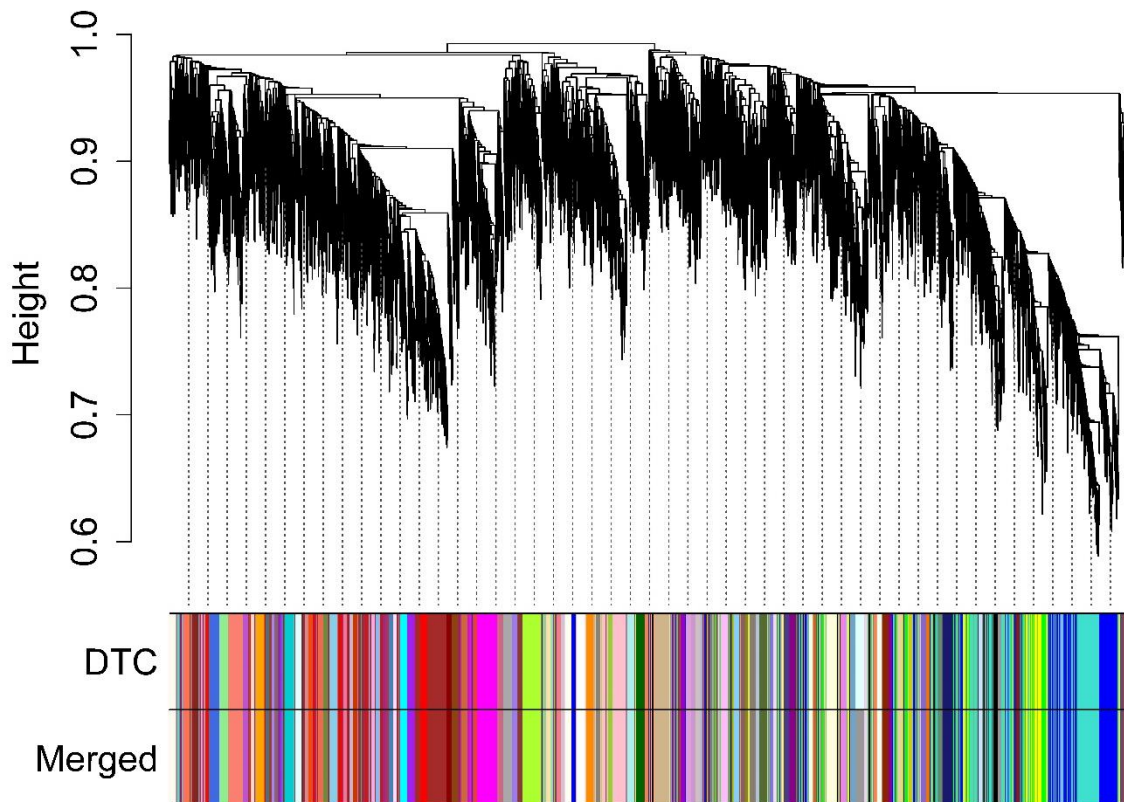


Abbildung 8. Segmentierung der Genexpression in Koexpressionsmodule durch das etablierte Netzwerk. Dargestellt ist das Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse, welche auf Basis des *topological overlap measure* (TOM) als Maß für die Interkonnektivität des Netzwerks durchgeführt wurde. Die Einteilung in Module als Cluster koexprimierter Gene erfolgte mittels *dynamic tree cut* Algorithmus (DTC). Als Maß für die Distanz zwischen den einzelnen Modulen (im Dendrogramm als *Height* angegeben) wurde die mittlere euklidische Distanz zwischen den einzelnen Expressionsprofilen der jeweiligen Module verwendet (*average linkage* Verfahren).

Tabelle 13. Charakteristika der Module mit signifikanter Eigengen-Genotyp Korrelation. Angegeben sind neben der Modulgröße die *biweight midcorrelation* (*bicor*) zwischen Modul-Eigengen und Genotyp mit zugehörigem adjustiertem p-Wert und Bayes-Faktor.

| Modul | Anzahl Gene | <i>bicor</i> | $p_{\text{Bonferroni}}$ | Bayes-Faktor |
|-----------------------|-------------|--------------|-------------------------|--------------|
| <i>Brown2</i> | 55 | -.78 | 0.010 | 27.12 |
| <i>Cyan</i> | 162 | -.73 | 0.028 | 10.98 |
| <i>Mediumpurple2</i> | 59 | -.72 | 0.035 | 9.06 |
| <i>Palevioletred3</i> | 70 | -.72 | 0.034 | 9.21 |
| <i>Purple</i> | 224 | -.71 | 0.037 | 8.67 |

Die Korrelationskoeffizienten und Eigengen-Profile dieser Module (siehe **Abbildung 9**) zeigten für alle fünf Module eine relative Unterexpression des Moduls in transgenen gegenüber Wildtyp-Tieren an.

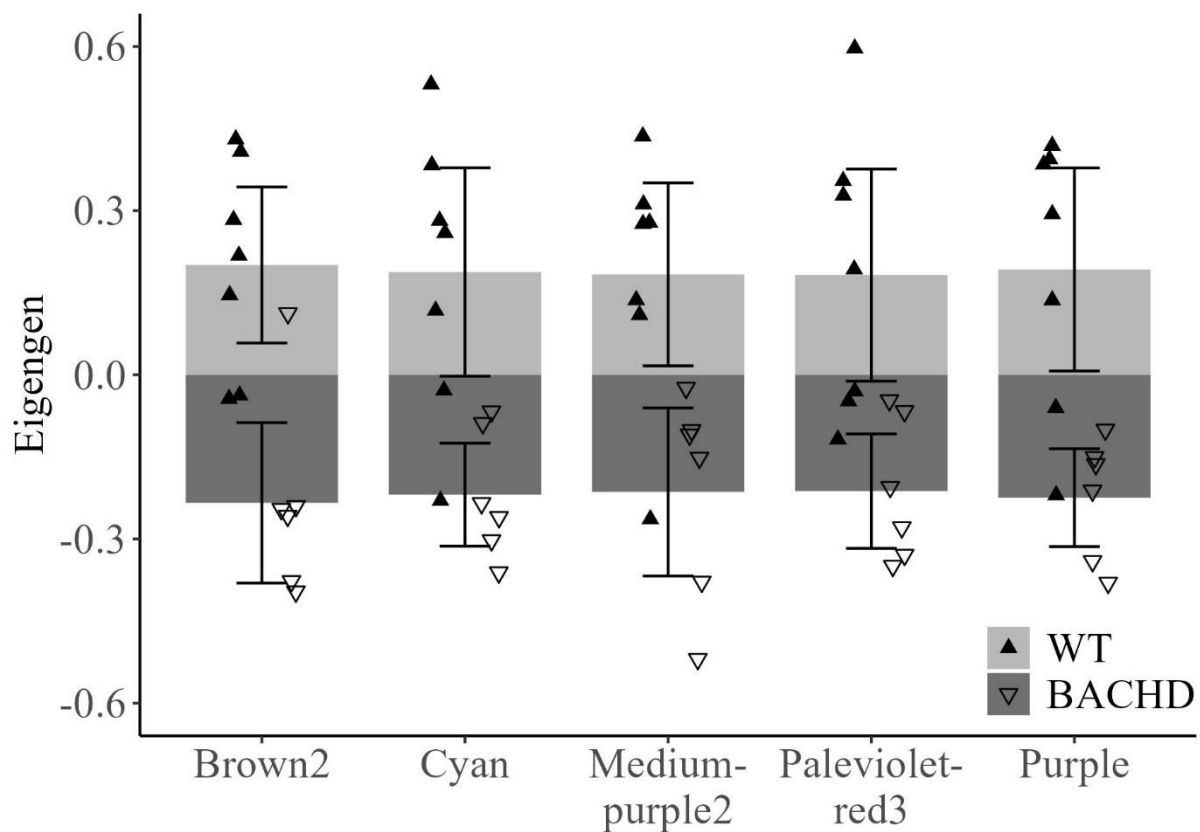


Abbildung 9. Unterschiede in der Eigengen-Expression der ausgewählten Module in Abhängigkeit des Genotyps. Fehlerbalken geben das 95%-Konfidenzintervall um die mittlere Eigengen-Expression an. Da das Eigengen als erste Hauptkomponente definiert ist und damit eine dimensionslose Größe darstellt, wird für die Ordinate keine Einheit angegeben.

3.4.2 Reproduzierbarkeit und Stabilität der identifizierten Module

Um zu überprüfen, inwiefern die auf den SE^{12m} Daten basierenden Koexpressions-Beziehungen der fünf identifizierten Module mit signifikantem Eigengen-Genotyp-Zusammenhang auf die Expressionsstruktur der übrigen Experimentalgruppen übertragbar sind, wurde eine Konservierungsanalyse dieser Module in jenen Datensätzen sowie ergänzend zur weiteren Validierung in Maus- und humanen Expressionsdaten durchgeführt (siehe **Tabellen 14 und 15**). Dabei zeigte sich für zwei Module schwache (*Brown2*, *Mediumpurple2*), für ein Modul moderate (*Palevioletr3*) und für zwei Module starke (*Cyan*, *Purple*) Evidenz für eine Stabilität der Modulstruktur über alle BACHD Datensätzen. Für die Module *Brown2* bzw. *Mediumpurple2* fand sich jedoch in einem ($EE_{spät}$) bzw. drei (SE^{6m} , $EE_{früh}$, $EE_{spät}$) Datensätzen keine ausreichende Evidenz, um eine erhaltene Modulstruktur annehmen zu können. In den aus Langfelder und KollegInnen (2016) stammenden Maus-Daten konnten zwei Module (*Palevioletr3* und *Purple*) mit schwacher und ein Modul (*Cyan*) mit moderater Evidenz reproduziert werden. In zwei humanen Datensätzen (Hodges et al., 2006; Durrenberger et al.,

2015) zeigte sich für Modul *Cyan* moderate Evidenz für eine erhaltene Modulstruktur. Über alle analysierten Daten hinweg ergab sich aggregierte Evidenz für die Reproduzierbarkeit der Modul-Koexpression insbesondere für die Module *Cyan* (starke Evidenz) und *Purple* (moderate Evidenz), in geringerem Maße für die Module *Brown2* und *Palevioletred3* (jeweils schwache Evidenz, siehe **Tabelle 15**).

Tabelle 14. Konservierung der ausgewählten Module in anderen Datensätzen. Einbezogen wurden die übrigen Expressionsdaten des untersuchten BACHD Modells sowie Maus- und humane Expressionsdaten aus Hodges et al. (2006), Durrenberger et al. (2015) und Langfelder et al. (2016).

| Modul | Ratte (BACHD) | | | | Maus (HETHD) | Mensch | |
|-------------------------|---------------|-------|--------------------|--------------------|--------------|--------|--------------|
| | SE6 | EE6 | EE _{früh} | EE _{spät} | | Hodges | Durrenberger |
| <i>Brown2</i> | 3.1* | 5.3* | 8** | 1.6 | 0.29 | 0.36 | 0.15 |
| <i>Cyan</i> | 13*** | 12*** | 15*** | 12*** | 7.7** | 5.6* | 8.1** |
| <i>Medium-purple2</i> | 1.9 | 2.8* | 1.9 | 1.7 | 1.8 | 0.27 | 1.1 |
| <i>Paleviole t-red3</i> | 5.5* | 6.8** | 7.3** | 8.4** | 4.4* | -0.23 | 0.46 |
| <i>Purple</i> | 14*** | 12*** | 11*** | 16*** | 5.4* | 0.23 | 2.6* |

Evidenz für erhaltene Modulstruktur: keine *schwache **moderate ***starke

Tabelle 15. Aggregation der Konservierungsanalysen in Ratte, Maus und Mensch sowie über alle Organismen (global) hinweg. Angegeben ist Z_{Stouffer} als meta-analytische Metrik; eine Ausnahme bildet die Konservierungsanalyse der Mausdaten, bei der keine Aggregation notwendig war.

| Modul | Z_{Stouffer} Ratte | Z_{Stouffer} Maus | Z_{Stouffer} Mensch | Z_{Stouffer} global |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>Brown2</i> | 9* | 0.29 | 0.36 | 7.11* |
| <i>Cyan</i> | 26*** | 7.7** | 9.69** | 27.74*** |
| <i>Medium-purple2</i> | 4.15* | 1.8 | 0.97 | 4.34 |
| <i>Paleviole t-red3</i> | 14** | 4.4* | 0.16 | 12.33* |
| <i>Purple</i> | 25.5*** | 5.4* | 2 | 23.14** |

Aggregierte Evidenz für erhaltene Modulstruktur: keine *schwache **moderate ***starke

3.4.3 Komparative Validierung der Netzwerkmodule mit den Ergebnissen einer globalen differentiellen Expressionsanalyse

Zur Abschätzung der Konvergenzvalidität des erhaltenen Netzwerks wurde überprüft, inwiefern sich die Ergebnisse einer globalen, modulunabhängigen *DESeq2*-Analyse im Netzwerk verorten und mit den dort identifizierten Genotyp-abhängigen Modulen in Einklang bringen lassen. Via Fisher-Yates-Test wurden differentielle Expression der Gene – im Folgenden als *DESeq2* Gene bezeichnet zur besseren Unterscheidbarkeit von der später erfolgten Analyse auf differentielle Genexpression in ausgewählten Modulen – und Modulzugehörigkeit auf Unabhängigkeit untersucht. **Tabelle 16** gibt die Ergebnisse für alle Module an, die mindestens ein Gen enthielten, welches in der globalen *DESeq2*-Analyse als differentiell exprimiert aufgefasst wurde. 13 Module erfüllten dieses Kriterium, von denen vier überzufällig ($p_{\text{Bonferroni}} \leq .05$) viele Gene enthielten, deren Expression sich im der Koexpressionsanalyse zugrundeliegenden Gesamtdatensatz zwischen den Genotypen unterschied: *Brown2*, *Cyan*, *Purple* und *Turquoise* (siehe **Abbildung 10**). Von diesen Modulen wiesen drei (*Brown2*, *Cyan* und *Purple*) eine signifikante Eigengen-Genotyp Korrelation auf, während Modul *Turquoise* – mit 853 koexprimierten Genen das größte Modul des Netzwerks – mit einer Korrelation von .61 und einem zugehörigen Bayes-Faktor von 2.40 knapp unterhalb des Schwellenwerts lag. Hinsichtlich der Veränderungsrichtung zeigte sich eine perfekte Übereinstimmung zwischen der Richtung der Transgen-assoziierten relativen Expressionsunterschiede und Unterschieden der Eigengen-Expression des zugeordneten Moduls zwischen den Genotypen.

Tabelle 16. Anreicherung der Netzwerk-Module mit DESeq2 Genen. Die Testung erfolgte mittels Fisher-Yates Test. Angegeben sind alle DESeq2 Gene enthaltenden Module und der korrigierte p-Wert der statistischen Testung.

| Modul | Modulgröße | Anzahl enthaltener DESeq2 Gene | pBonferroni |
|----------------|------------|--------------------------------|-------------|
| Black | 304 | 5 | 0.25 |
| Blue | 751 | 5 | 4.39 |
| Brown | 606 | 2 | 10.71 |
| Brown2 | 55 | 5 | 0.0001*** |
| Cyan | 162 | 8 | 1.95e-5*** |
| Grey60 | 277 | 2 | 5.40 |
| Honeydew | 45 | 1 | 2.68 |
| Mediumpurple2 | 59 | 1 | 3.40 |
| Orange | 99 | 1 | 5.19 |
| Palevioletred3 | 70 | 1 | 3.93 |
| Purple | 224 | 7 | 0.0018** |
| Sienna3 | 86 | 1 | 4.65 |
| Turquoise | 853 | 18 | 1.55e-6*** |

n.s. * > 0.05 ** >.01 ***>.001

Insofern lassen sich die Ergebnisse beider Analyseansätze miteinander in Einklang bringen: Aus der Segmentierung des Netzwerks entstandene Module, die mit via *DESeq2* identifizierten Genen angereichert waren, zeigten bis auf eine grenzwertige Ausnahme auch eine signifikante Eigengen-Genotyp Korrelation. Zudem lag eine kongruente Veränderungsrichtung vor: 54 der 57 Gene, die in der *DESeq2*-Analyse in BACHD Tieren im Vergleich zum Wildtyp herunter- bzw. hochreguliert vorlagen, wurden in der Netzwerkanalyse einem Modul zugeordnet, dessen Eigengenexpression sich gleichsinnig zwischen den Genotypen unterschied.

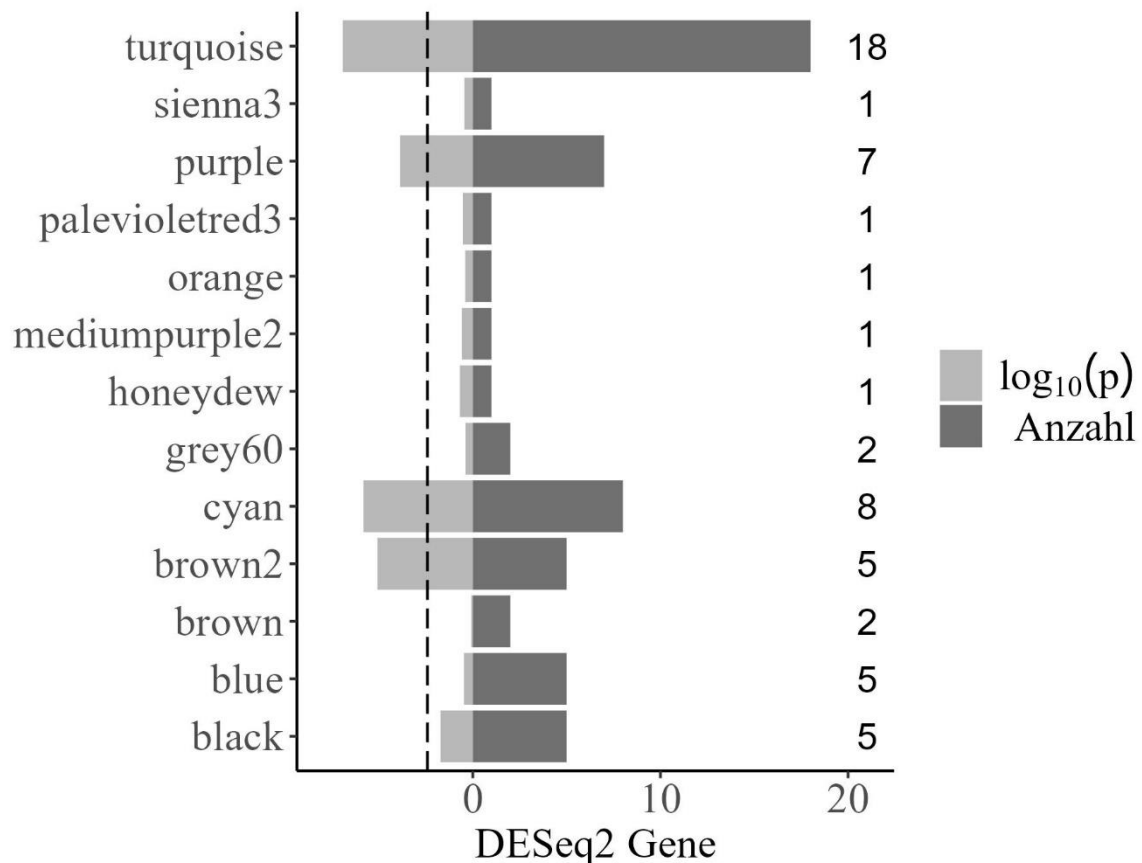


Abbildung 10. Verteilung der globalen differentiellen Genexpression im etablierten Koexpressionsnetzwerk. Dargestellt sind alle Module mit mindestens einem DESeq2 Gen. Die Randverteilung ist an der rechten Seite der Abbildung angegeben, die nach links gerichteten Balken geben die logarithmierten p-Werte des durchgeführten Fisher-Yates-Tests an, mit dem die einzelnen Module auf überzufällige Häufigkeit von DESeq2 Genen untersucht wurden. Die gestrichelte Linie gibt dabei das nach Bonferroni korrigierte Alphaniveau von $\alpha = 0.05$ an.

3.4.4 Modul-Selektion

Basierend auf den beschriebenen Validierungsanalysen lassen sich die Module mit signifikanter Eigengen-Genotyp Korrelation für die weiteren Analysen hierarchisieren. Von den fünf identifizierten Modulen zeigten drei moderate (*Palevioletred3*) bis starke (*Cyan*, *Purple*) Anzeichen für eine Reproduzierbarkeit über alle weiteren BACHD Experimentalgruppen hinweg, während zwei Module (*Mediumpurple2*, *Brown2*) insgesamt zu schwach konserviert zu sein schienen und sich nicht in allen Bedingungen reproduzieren ließen. Von den drei ausreichend stabilen Modulen zeigten zwei (*Cyan*, *Purple*) zugleich eine Anreicherung für *DESeq2*-Kandidaten-Gene. Unter Einbeziehung von Maus- und humanen Expressionsdaten zeigte sich daneben für Modul *Cyan* über alle Datensätze hinweg Evidenz für eine erhaltene Modulstruktur, während dies für Modul *Purple* für den Maus- und einen der beiden humanen Datensätze zutraf (**Tabelle 15**); somit zeigen diese beiden Module mit Blick auf die

Generalisierbarkeit der Modulstruktur die beste Evidenz. Da die beiden Module *Cyan* und *Purple* die stärkste Konservierung in anderen Bedingungen und Organismen zeigten und die größte Übereinstimmung mit der globalen *DESeq2*-Analyse aufweisen, wurden sie als relevanteste Netzwerkzentren für Transgen-induzierte Pathologie angesehen und für weitergehende Untersuchungen ausgewählt.

3.4.5 Module *Cyan* und *Purple*

Modulbeschreibung

Modul *Cyan* umfasste 162 koexprimierte Gene. Die auf Basis ihrer starken intramodularen Konnektivität identifizierten Hubgene bildeten in ihrer biologischen Bedeutung einen Schwerpunkt auf Glia-bezogene Funktionen wie Myelinisierung und Oligodendrozytendifferenzierung (siehe **Appendix 2**). Die negative Eigengen-Genotyp Korrelation von $r = -.73$ deutet auf eine relative Unterexpression der Modulgene in BACHD Tieren hin. Die mediane *module membership* betrug 0.80 ($mean = 0.73$, $SD = 0.19$), die auf den Genotyp-Status bezogene mediane *gene significance* -0.55 ($mean = -0.54$, $SD = 0.17$), wobei beide Maße einen signifikanten linearen Zusammenhang zeigen ($r = -0.74$, $p < 10^{-28}$, siehe **Abbildung 11**). Kongruent dazu unterschied sich die Expression des Modul-Eigengens zwischen den Genotypen (siehe **Abbildung 9**) und zeigte einen Abfall der Eigengen-Expression in BACHD Proben an. Dieselbe Änderungsrichtung lag auch bei den Modulgenen vor.

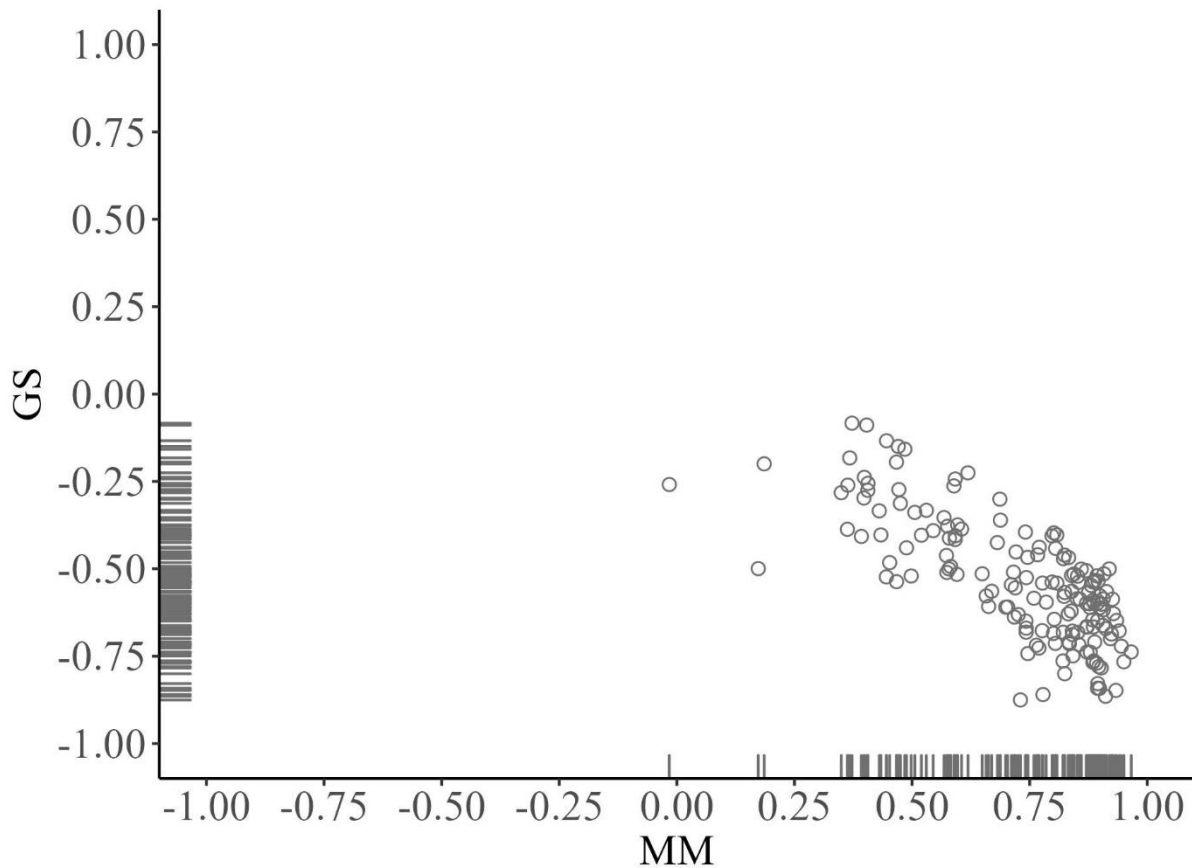


Abbildung 11. Zusammenhang zwischen *module membership* (MM) und *gene significance* (GS) der Gene in Modul Cyan. MM ergibt sich aus der Korrelation der individuellen Genexpression mit den errechneten Eigenen Werten; GS ergibt sich aus der Korrelation der individuellen Genexpression mit dem dichotomisierten Genotyp der Proben. Als Korrelation wurde jeweils die *Biweight Midcorrelation* verwendet (siehe auch Abschnitt 2.3.1).

Modul *Purple* bestand aus 224 koexprimierten Genen. Seine Hubgene waren funktionell für katalytische Aktivität angereichert (siehe **Appendix 3**). Die negative Eigenen-Genotyp Korrelation ($r = -0.71$) zeigt auch für dieses Modul eine relative Unterexpression der Modulgene in den Proben der transgenen Tiere an. Die mediane *module membership* betrug 0.72 ($mean = 0.68, SD = 0.18$), die auf den Genotyp-Status bezogene mediane *gene significance* -0.55 ($mean = -0.52, SD = 0.21$), wobei zwischen beiden Maßen ein signifikanter linearer Zusammenhang besteht ($r = -0.6, p < 10^{-22}$, siehe **Abbildung 12**). Kongruent dazu unterschied sich die Expression des Modul-Eigenens zwischen den Genotypen (siehe **Abbildung 9**) und zeigte einen Abfall der Eigenen-Expression in Proben transgener Tiere an. Dieselbe Änderungsrichtung zeigte sich auch in den Modulgenen.

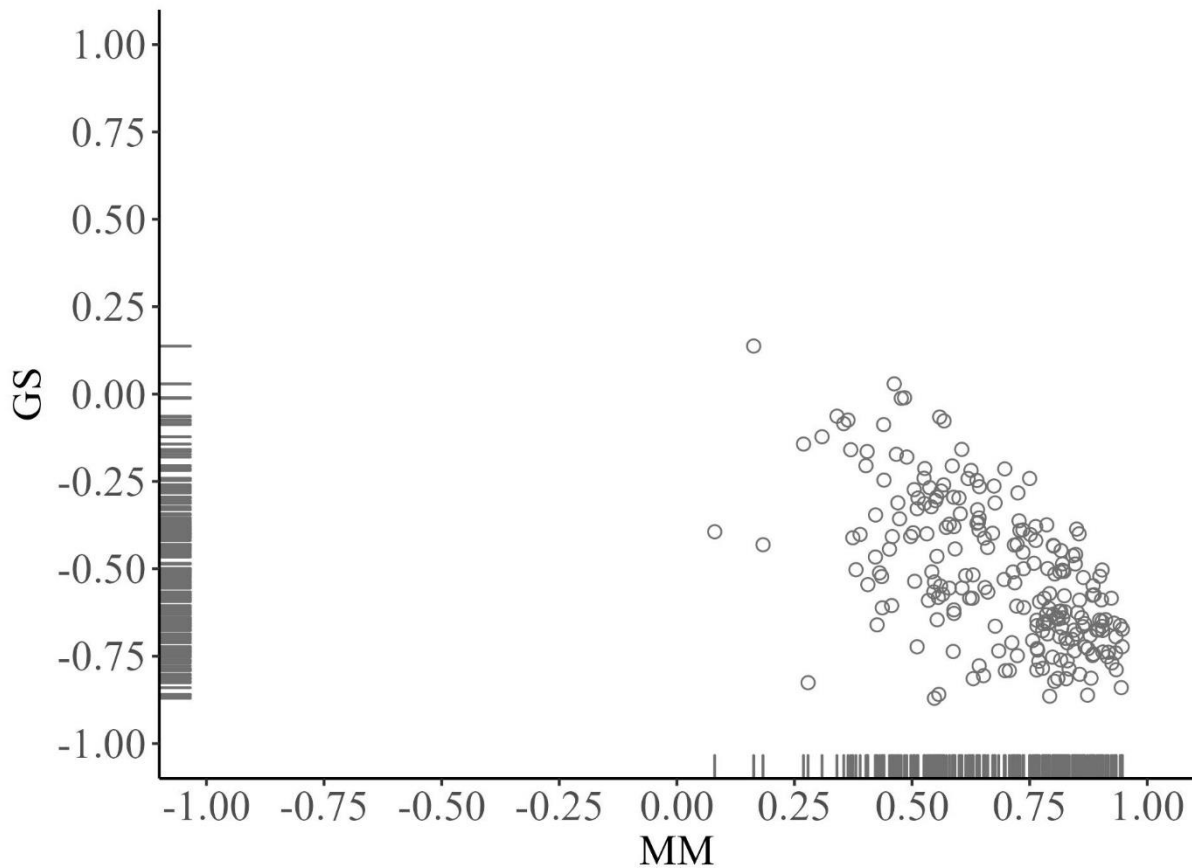


Abbildung 12. Zusammenhang zwischen *module membership* (MM) und *gene significance* (GS) der Gene in Modul Purple. MM ergibt sich aus der Korrelation der individuellen Genexpression mit den errechneten Eigenen Werten; GS ergibt sich aus der Korrelation der individuellen Genexpression mit dem dichotomisierten Genotyp der Proben. Als Korrelation wurde jeweils die *Biweight Midcorrelation* verwendet (siehe auch Abschnitt 2.3.1).

Differentielle Genexpression in den Modulen

Von den 162 koexprimierten Genen in Modul *Cyan* lagen 84 (51,9%) differentiell exprimiert vor. Für alle differentiell exprimierten Gene (DEGs) galt, dass sie eine signifikant niedrigere Expression in den BACHD Ratten im Vergleich zu den WT Tieren aufwiesen (siehe **Abbildung 13**). Es zeigt sich dabei auch ein deutlicher Zusammenhang zwischen differentieller Expression und Hubgene-Status der Modulgene (Spearman's $\rho = 0.52$ für die Korrelation von logarithmischer relativer Veränderung oder *log-fold change* und *module membership*). Die ORA dieser DEGs via *WebGestaltR* (siehe **Abbildung 14**) zeigte u.a. eine starke Überrepräsentation von Genen, welche mit glialen Funktionen und insbesondere mit Myelinisierung assoziiert sind.

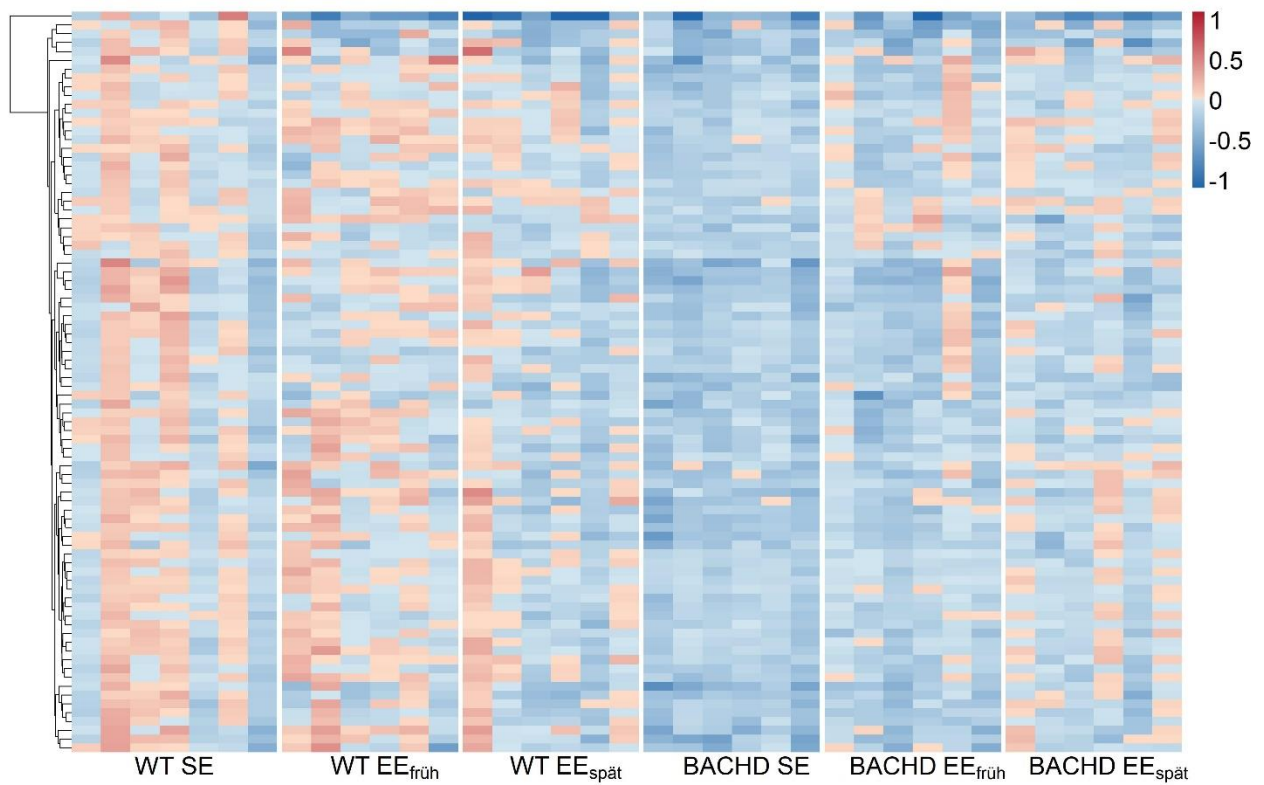


Abbildung 13. Heatmap der \log_2 -transformierten relativen Veränderung (LFC) der Expression von Genen in BACHD Tieren im Vergleich zur Wildtyp Expression in Modul Cyan. Dargestellt sind die im *standard environment* (SE) zwischen den Genotypen differentiell exprimiert vorliegenden Gene (DEGs) in allen Haltungsbedingungen.

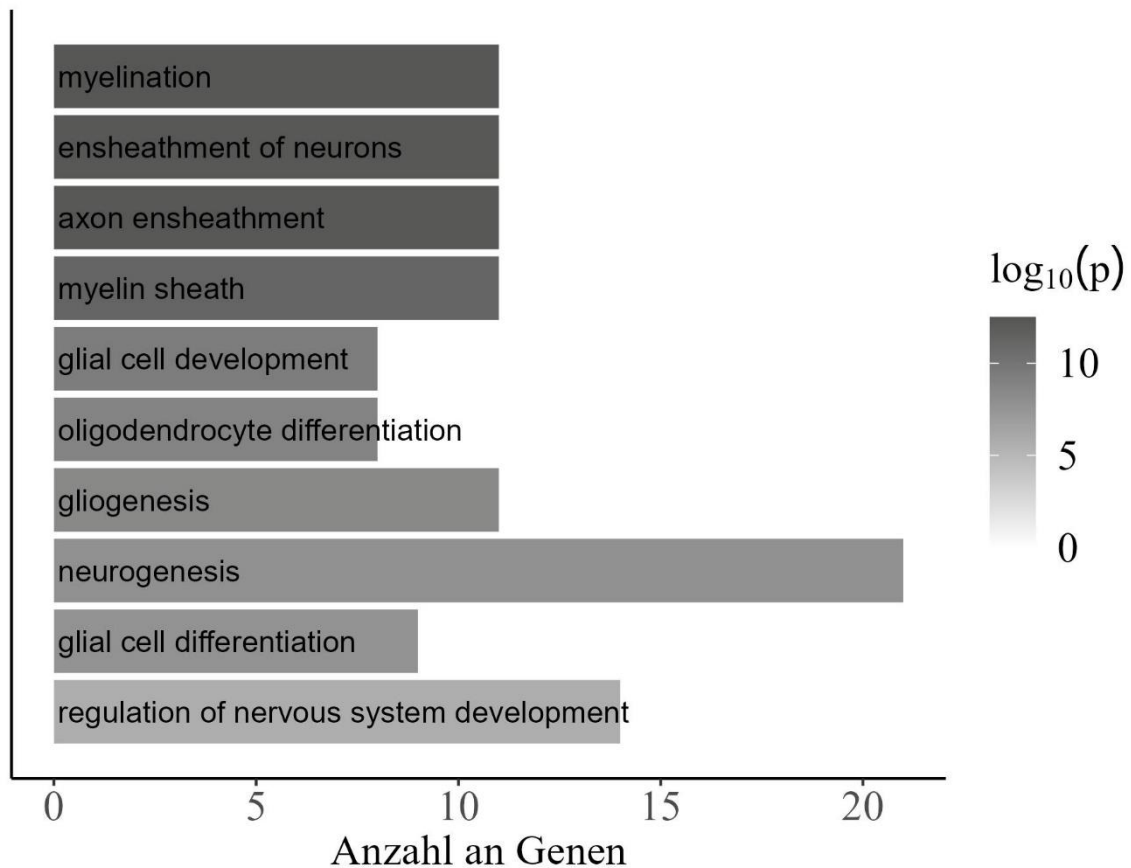


Abbildung 14. Funktionelle Anreicherung der differentiell exprimierten Gene in Modul Cyan. Angegeben sind die 10 am stärksten angereicherten *Gene Ontology* Kategorien, geordnet nach dem jeweiligen p-Wert im Rahmen der Überrepräsentationsanalyse (ORA).

Von den 224 koexprimierten Genen in Modul *Purple* lagen 65 (29,0%) differentiell exprimiert vor. Alle differentiell exprimierten Gene (DEGs) zeigten dabei eine signifikant niedrigere Expression in BACHD relativ zu WT Tieren (siehe **Abbildung 15**). Es besteht auch ein deutlicher Zusammenhang zwischen differentieller Expression und Hubgene-Status der Modulgene (Spearman's $\rho = 0.50$). Die mit *WebGestaltR* durchgeführte ORA zeigte dabei eine Überrepräsentation von Genen, die mit synaptischen Funktionen assoziiert sind (siehe **Abbildung 16**).

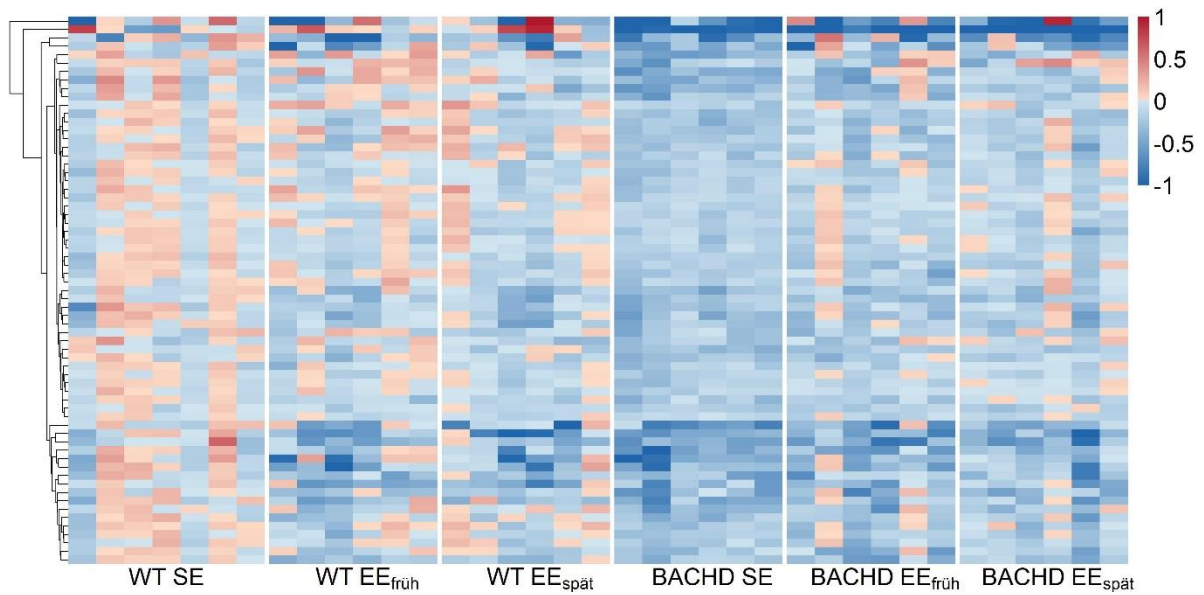


Abbildung 15. Heatmap der log₂-transformierten relativen Veränderung (LFC) der Expression von Genen in BACHD Tieren im Vergleich zur Wildtyp Expression in Modul Purple. Dargestellt sind die im *standard environment* (SE) zwischen den Genotypen differentiell exprimiert vorliegenden Gene (DEGs) in allen Haltungsbedingungen.

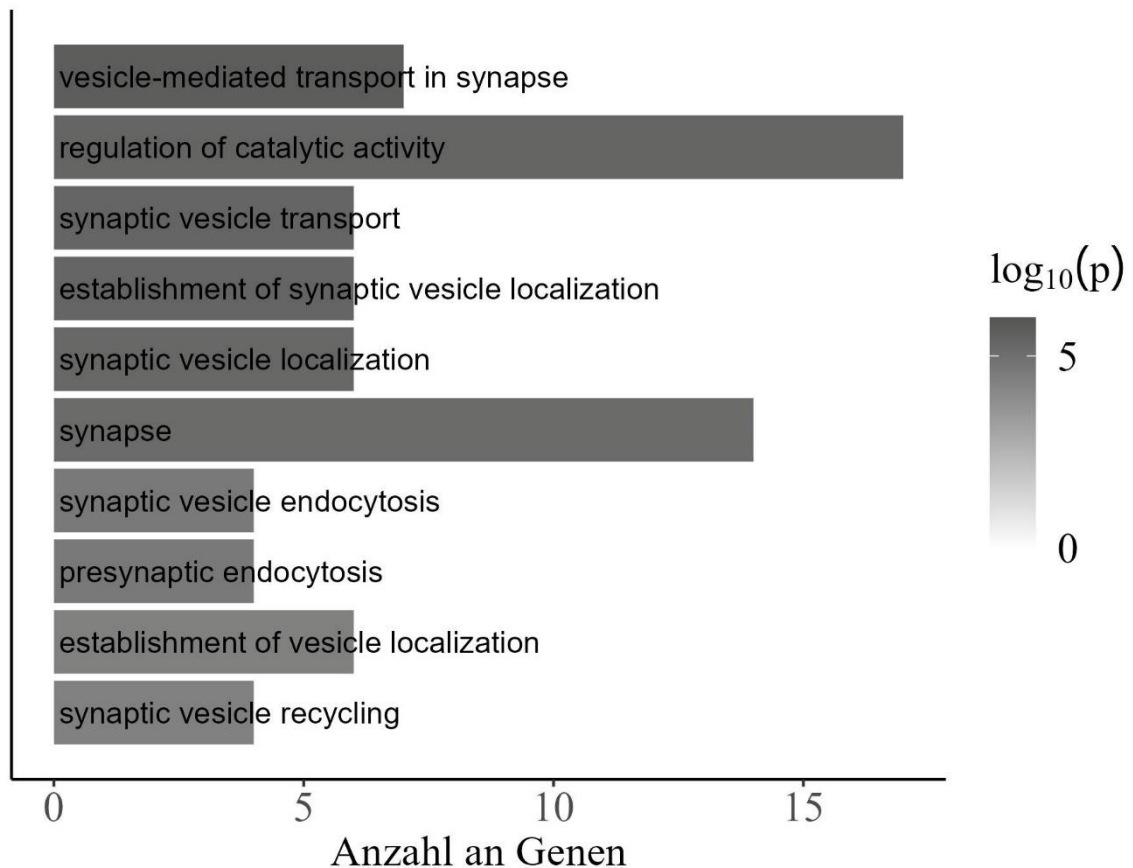


Abbildung 16. Funktionelle Anreicherung der differentiell exprimierten Gene in Modul Purple. Angegeben sind die 10 am stärksten angereicherten Gene Ontology Kategorien, geordnet nach dem jeweiligen p-Wert im Rahmen der Überrepräsentationsanalyse (ORA).

3.4.6 Zwischenergebnis: Striatale Dysregulation durch *mHTT*

Zusammenfassend ließ sich durch den WGCNA-Ansatz das striatale Transkriptom der über zwölf Monate in Standard-Bedingungen gehaltenen Ratten in 98 Koexpressionsmodule einteilen, von denen fünf in ihrer Expression signifikant vom Genotyp der Tiere beeinflusst wurden. Konkret fand sich in allen fünf Modulen eine relative Unterexpression des Moduls und seiner Gene in transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Ratten. Für drei dieser Module zeigte sich über alle übrigen Gruppen des Experimentalaufbaus hinweg eine konservierte Modulstruktur, die eine Analyse dieser Module über die verschiedenen Alters- und Umweltgruppen ermöglicht. Dieselben drei Module zeigten sich auch in striatalen Expressionsproben eines HETHD-Mausmodells konserviert. Beim Vergleich mit humanen HD-Expressionsdaten zeigten zwei dieser Module Anzeichen für Präservierung, namentlich die Module *Cyan* und *Purple*. Diese beiden Module waren daneben mit Genen angereichert, die bereits im Rahmen der DESeq-Voranalyse identifiziert wurden. Somit zeigten die Module *Cyan* und *Purple* eine gute Validierung ihrer Koexpressionsstruktur in internen wie externen murinen und humanen Expressionsdaten sowie bezogen auf ihre Genotyp-abhängige Expression eine zufriedenstellende Konvergenzvalidität mit einem alternativen Analyseansatz; aus diesen Gründen wurden beide Module zur weiteren Untersuchung selektiert.

Modul *Cyan* umfasst 162 Gene, von denen 84 eine differentielle Expression zwischen den Genotypen zeigen. Der funktionelle Fokus dieser DEGs liegt dabei auf glialen Prozessen, insbesondere der Myelinisierung. Modul *Purple* fasst die Koexpression von 224 Genen zusammen, von denen 65 differentiiell exprimiert vorliegen. Diese Gene zeigen einen funktionellen Schwerpunkt auf Zellprozessen der neuronalen Synapse.

Anschließend an die Charakterisierung *mHTT*-induzierter striataler Dysregulation zum Zwölfmonatszeitpunkt wurde eine Vergleichsanalyse mit der sechs Monate alten Kohorte durchgeführt.

3.5 Alterseffekte in Bezug auf striatale Dysregulation

3.5.1 Differentielle Expression in der sechs Monate alten Kohorte

Nach den beschriebenen Analysen kann für die Gene der Module *Cyan* und *Purple* die Koexpression auch in den weiteren Experimentalbedingungen angenommen werden. Das erlaubt die Untersuchung dieser Module auf differentielle Expression zu anderen Alterszeitpunkten und Umwelten. In sechs Monate alten Tieren zeigte sich dabei nur in geringem Ausmaß eine differentielle Expression in den relevanten Modulen (siehe **Abbildung 17**). In Modul *Cyan* lagen in keinem Vergleich DEGs vor, während Modul *Purple* nur wenige

Expressionsunterschiede aufwies. Die größte Anzahl an DEGs zeigte sich im Vergleich von BACHD SE^{6m} und BACHD EE^{6m} Tieren mit 14 differentiell exprimierten Genen.

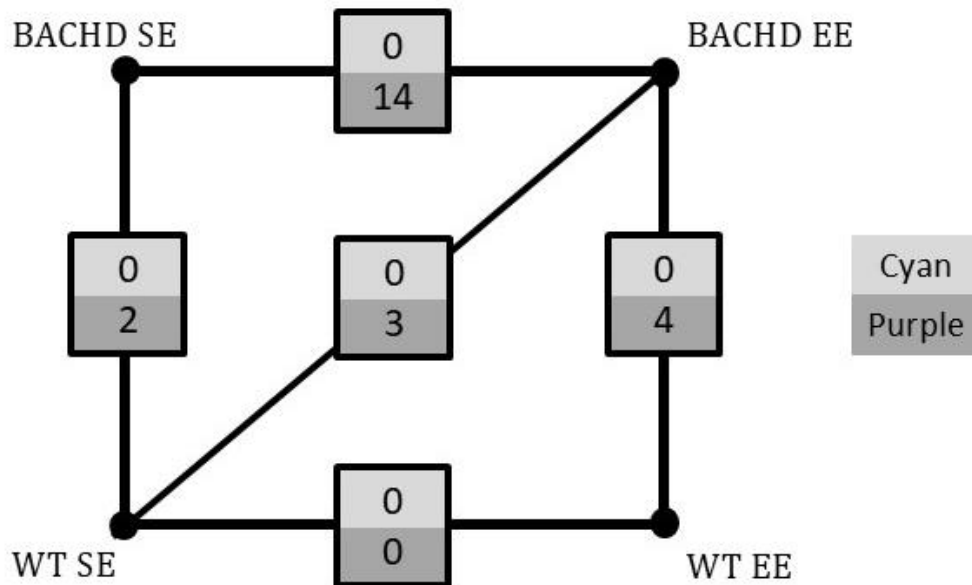


Abbildung 17. Differentielle Genexpression der Module *Cyan* und *Purple* in den Sechsmontatskohorten. Angegeben ist die Anzahl differentiell exprimierter Gene zwischen zwei Versuchsbedingungen.

3.5.2 Alterseffekte in den Pseudotrajektorien

Da zum Vergleich beider Alterszeitpunkte die Gewinnung striataler Expressionsdaten aus demselben Tier nicht möglich ist, wurden Pseudotrajektorien konstruiert, um nach Genotyp und Haltungsbedingung passende Vergleichspaare zur Beurteilung von Alterseffekten heranzuziehen. Für jeden Genotyp ergaben sich dadurch die SE- (durch Vergleich von SE^{6m}- mit SE^{12m}-Tieren), EE_{früh}- (Vergleich EE^{6m}_{früh} mit EE^{12m}_{früh}) und EE_{spät}-Pseudotrajektorien (SE^{6m} und EE^{12m}_{spät}). Es zeigten sich ubiquitär starke Altersunterschiede (siehe **Abbildung 18**).

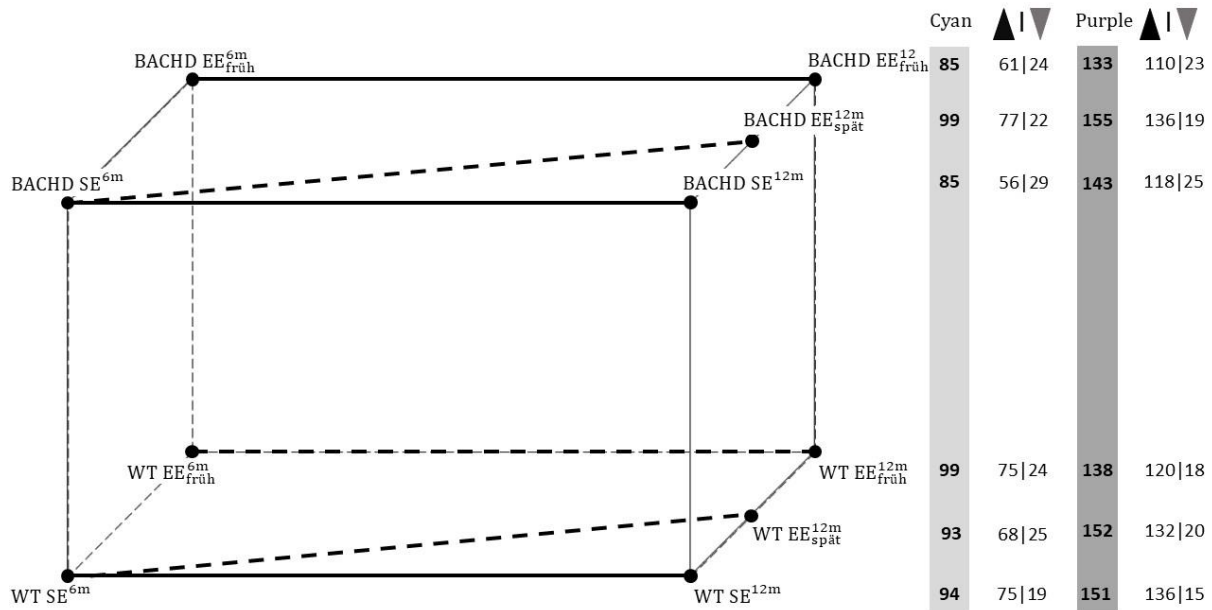


Abbildung 18. Alterseffekte in den betrachteten Pseudotrajektorien. Angegeben ist die Anzahl an differentiell exprimierten Genen zwischen der jeweiligen Sechs- und Zwölfmonatskohorte. Die Gesamtanzahl wird dabei im grau unterlegten Bereich dargestellt sowie nachfolgend aufgeteilt nach relativer Hoch- bzw. Herunterregulation in der älteren im Vergleich zur jüngeren Kohorte.

Die altersabhängige differentielle Expression bestand in Modul *Cyan* je nach Pseudotrajektorie aus 85 bis 99 Genen mit 65 DEGs, deren Genexpression in allen Pseudotrajektorien verändert vorlag. Modul *Purple* wies in den Pseudotrajektorien zwischen 133 und 155 DEGs auf, von denen 113 in allen Altersvergleichen differentiell exprimiert vorlagen. Die Mehrheit aller DEGs in beiden Modulen wurde zum Zwölfmonatszeitpunkt im Vergleich zum Sechsmonatszeitpunkt vermehrt exprimiert.

3.6 Modifikation mHTT-induzierter Dysregulation durch *environmental enrichment*

In der Netzwerkanalyse konnten Modul-DEGs identifiziert werden, die in Abwesenheit besonderer Umwelteinflüsse durch mHTT zu einer veränderten Expression angeregt wurden. In beiden Modulen zeigte sich dabei eine deutliche Verminderung der mHTT-induzierten differentiellen Genexpression in beiden EE Bedingungen. Dieser Effekt war sowohl im Vergleich mit WT Tieren der SE^{12m} Kontrollgruppe als auch mit WT Tieren der korrespondierenden Umweltbedingung zu beobachten.

In Modul *Cyan* lagen unter SE^{12m}-Bedingungen 84 Gene differentiell exprimiert zwischen WT- und BACHD-Tieren vor. Dies entsprach einem Anteil von 51.9% an allen Modul-Genen, der den durchgeführten einseitigen Binomialtests als Standardverhältnis zugrunde gelegt wurde. Im Vergleich mit WT SE^{12m} Tieren zeigte sich eine signifikante Reduktion der DEG-Anteile auf eines in BACHD EE_{früh}^{12m} Ratten ($p_{\text{Bonferroni}} < 0.001$, $OR = 0.006$ mit $KI_{95\%} [0.001 ; 0.042]$) und null in BACHD EE_{spät}^{12m} Tieren ($p_{\text{Bonferroni}} < 0.001$, $OR = 0$ ohne reelles $KI_{95\%}$; siehe **Abbildung 19**). Dieses einzelne Gen, *Chd7*, lag dabei auch in der SE^{12m} Kohorte zwischen den beiden Genotypen differentiell exprimiert vor. Im Vergleich innerhalb beider enriched environment Bedingungen war ebenfalls ein signifikanter niedrigerer Anteil an differentieller Expression in Form von vier (EE_{früh}^{12m}, $p_{\text{Bonferroni}} < 0.001$, $OR = 0.024$ mit $KI_{95\%} [0.0003 ; 0.212]$) beziehungsweise null DEGs (EE_{spät}^{12m}, $p_{\text{Bonferroni}} < 0.001$, $OR = 0$ ohne reelles $KI_{95\%}$) zwischen beiden Genotypen zu beobachten. Alle hier identifizierten Gene (*Tf*, *Mapkapk2*, *Cnp*, *Rhog*) wurden ebenfalls unter SE^{12m} Bedingungen differentiell exprimiert.

Modul *Purple* zeigt ein vergleichbares Muster. Während in der SE^{12m}-Gruppe 65 Gene differentiell exprimiert wurden (29.0% des Moduls), ergab sich zwischen WT SE^{12m}- und BACHD EE_{früh}^{12m} bzw. BACHD EE_{spät}^{12m} Tieren eine signifikant seltenere differentielle Expression mit drei ($p_{\text{Bonferroni}} < 0.001$, $OR = 0.033$ mit $KI_{95\%} [0.010 ; 0.108]$) bzw. einem DEG ($p_{\text{Bonferroni}} < 0.001$, $OR = 0.011$ mit $KI_{95\%} [0.002 ; 0.080]$; siehe **Abbildung 19**). Diese Gene (*Syt10*, *RGD1310587*, *Tril*) liegen dabei auch in SE^{12m} Bedingungen differentiell exprimiert vor. Auch der Vergleich der Genotypen unter gleichen Haltungsbedingungen zeigte eine niedrigere Rate an differentieller Expression mit zwei DEGs in EE_{früh}^{12m} Bedingungen ($p_{\text{Bonferroni}} < 0.001$, $OR = 0.022$ mit $KI_{95\%} [0.005 ; 0.091]$) und einem unter EE_{spät}^{12m} Haltung ($p_{\text{Bonferroni}} < 0.001$, $OR = 0.011$ mit $KI_{95\%} [0.002 ; 0.080]$). Eines dieser Gene (*Syt10*) zeigte dabei auch in der SE^{12m} Gruppe eine differentielle Expression.

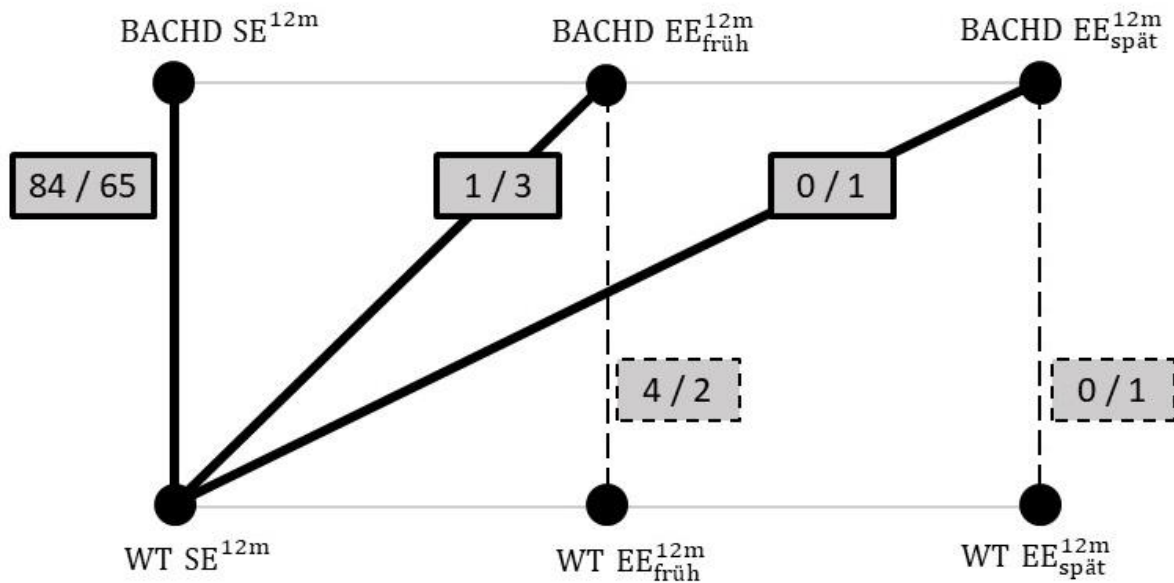


Abbildung 19. Reduktion der differentiellen Genexpression in den Modulen Cyan und Purple. Angegeben ist die Anzahl differentiell exprimierter Gene (DEGs) zwischen den jeweils verbundenen Versuchsgruppen. Die erste Ziffer gibt dabei die jeweilige Anzahl an DEGs in den Genen aus Modul Cyan an, die zweite diejenige in den Genen des Moduls Purple.

Tabelle 17 gibt eine Übersicht über die gefundene differentielle Expression in beiden Vergleichen. Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass die unter Standardbedingungen aufgetretenen Unterschiede in beiden anderen Umweltbedingungen marginalisiert wurden und gleichzeitig mit Ausnahme von *Fam53c* keine weiteren Gene eine differentielle Expression zeigten. Die Effektstärken der Veränderungen sind vergleichbar groß mit *odds ratios* zwischen 0 und 0.033. Die Chance eines Modul-Gens auf differentielle Expression sinkt unter dem jeweiligen *environmental enrichment* um diesen Faktor, was einer hohen Effektstärke entspricht.

Tabelle 17. Differentielle Expression in Abhängigkeit von Genotyp und Haltungsbedingung. LFC gibt die \log_2 -transformierte relative Veränderung der Expression von Genen in BACHD Tieren an, die im Vergleich zur Wildtyp Expression unter *standard environment* (SE) oder unter der gleichen *enriched environment* Haltungsbedingung ($EE_{\text{korrespondierend}}$) signifikant verschieden vorlag.

| | | SE | | $EE_{\text{korrespondierend}}$ | |
|--|------------|----------|----------|--------------------------------|--|
| | Gen | LFC | Gen | LFC | |
| Modul <i>Cyan</i> (84 DEGs in SE^{12m}) | | | | | |
| | | | Tf | -0.31* | |
| BACHD $EE_{\text{früh}}^{12m}$ | Chd7 | -0.30** | Mapkapk2 | -0.27* | |
| | | | Cnp | -0.25* | |
| | | | Rhog | -0.25* | |
| BACHD $EE_{\text{spät}}^{12m}$ | - | - | - | - | |
| Modul <i>Purple</i> (65 DEGs in SE^{12m}) | | | | | |
| | Syt10 | -1.36*** | | | |
| BACHD $EE_{\text{früh}}^{12m}$ | RGD1310587 | -0.50* | Syt10 | -1.44*** | |
| | Tril | -0.32* | Fam53c | 0.23* | |
| BACHD $EE_{\text{spät}}^{12m}$ | Syt10 | -1.74*** | Syt10 | 2.00*** | |

Interpretation: 'p<.1, * p<.05, **p<.01, ***p<.001

Zur detaillierteren Analyse der quantitativen Expressionsänderungen wurden die relativen Expressionsänderungen zwischen WT und BACHD Tieren in Abhängigkeit von den Haltungsbedingungen betrachtet. Ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis Test zeigte eine Reduktion der Transgen-bedingten transkriptionellen Abweichungen in beiden Formen des *enriched environment*. \log_2 fold changes (LFC) differentiell exprimierter Gene wurden sowohl in Modul *Cyan* wie auch in Modul *Purple* signifikant von der Umweltbedingung beeinflusst, $H_{\text{Cyan}}(2) = 107.01$, $p < 0.001$, und $H_{\text{Purple}}(2) = 45.943$, $p < .001$ (**Tabelle 18**). *Post-hoc* Rangvergleiche zeigten, dass der mediane LFC in der SE^{12m} -Kohorte höher war als in $EE_{\text{früh}}^{12m}$ (Rangdifferenz_{Cyan} = 64.5, Rangdifferenz_{Purple} = 51.4) und $EE_{\text{spät}}^{12m}$ (Rangdifferenz_{Cyan} = 116.1, Rangdifferenz_{Purple} = 63.1) bei kritischer Differenz von 26.9 für Modul *Cyan* und 23.7 für Modul *Purple* (bezogen auf ein adjustiertes Signifikanzniveau von $\alpha = .05$). Im Vergleich beider *enriched environment* Gruppen zeigte sich für Gene aus Modul *Cyan* eine stärkere Angleichung der transkriptionellen Unterschiede unter $EE_{\text{spät}}^{12m}$ Bedingungen (Rangdifferenz = 51.6), während sich in Modul *Purple* die Effekte beider Umweltinterventionen nicht signifikant

voneinander unterschieden (Rangdifferenz = 11.6 bei oben genannten kritischen Differenzen, siehe **Abbildung 20**).

Tabelle 18. Mittlere Ränge der log₂-transformierten relativen Expressionsveränderungen (LFC) der Modulgene zwischen WT und BACHD Tieren in Abhängigkeit der Haltungsbedingung.

| | Modul <i>Cyan</i> | Modul <i>Purple</i> |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------|
| SE ^{12m} | 186.702 | 136.154 |
| EE _{früh} ^{12m} | 122.202 | 84.739 |
| EE _{spät} ^{12m} | 70.595 | 73.108 |

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass beide Varianten des *environmental enrichment* in vergleichbarer Weise in der Lage waren, die Transgen-bedingte Dysregulation der striatalen Genexpression in BACHD Tieren deutlich zu normalisieren. In Bezug auf die differentielle Expression in Modul *Cyan* zeigte sich dabei ein stärkerer Effekt des später einsetzenden *environmental enrichment*.

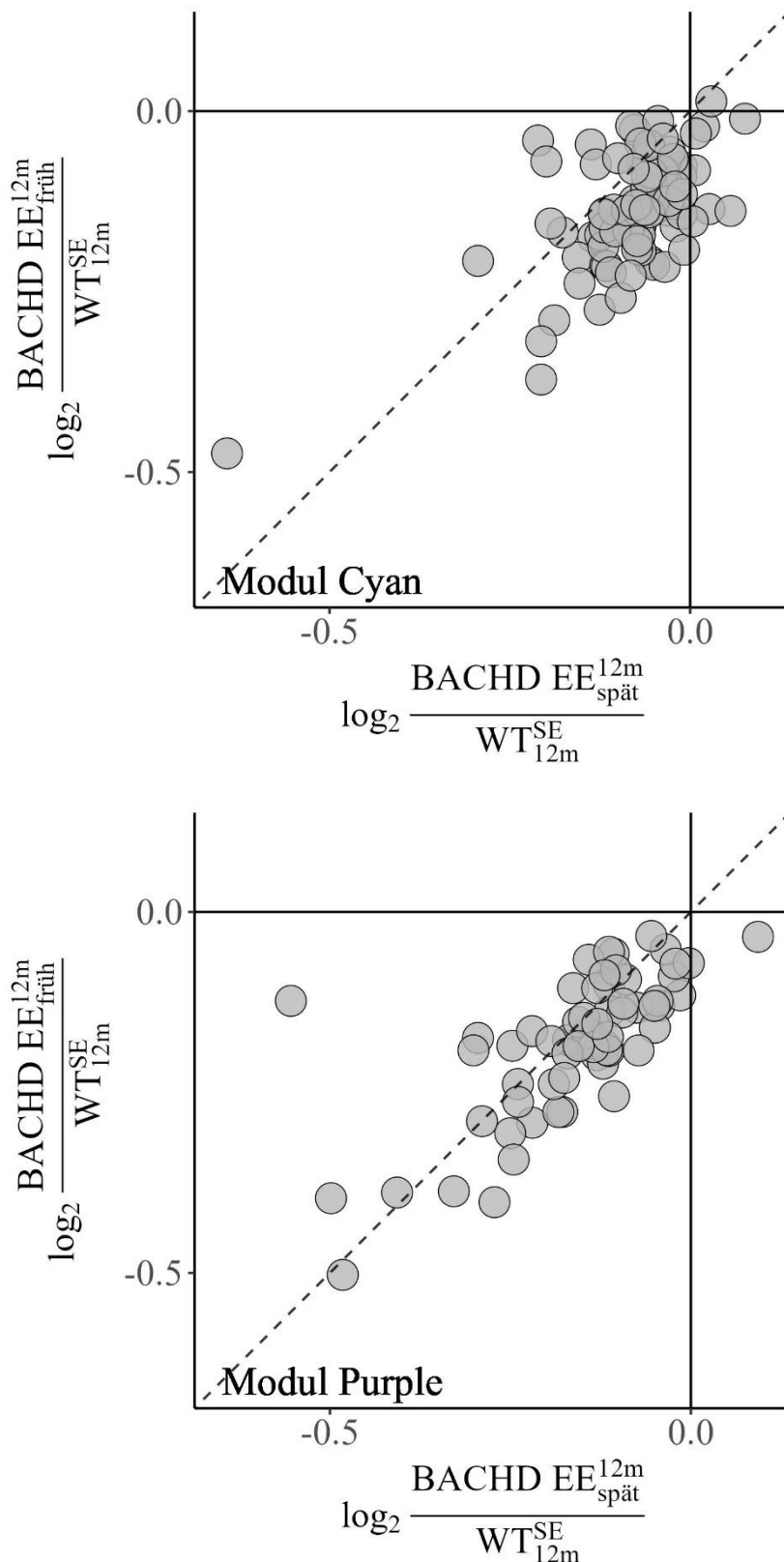


Abbildung 20. Veränderung von SE^{12m} Modul Cyan (oben) und Modul Purple (unten) DEGs in beiden *enriched environment* Bedingungen zum Zwölfmonatszeitpunkt. Abgebildet sind die relativen Expressionsunterschiede als \log_2 fold changes (LFC) beider BACHD EE Kohorten, jeweils im Vergleich zur WT SE Referenzgruppe. Die gestrichelte Linie stellt die Äquivalenzgerade dar, die identische LFCs in beiden Vergleichen anzeigt. Stärkere Abweichungen von dieser Geraden weisen auf zunehmend unterschiedliche LFC hin.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung und Kontextualisierung der Ergebnisse

Zusammenfassend konnten die angenommenen Effekte des Transgens und der Altersentwicklung sowohl phänotypisch als auch molekularbiologisch beobachtet werden. Die Modulierbarkeit *mHTT*-induzierter Veränderungen zeigte sich eindrucksvoll in den Expressionsdaten. In der Verhaltensmessung konnte dies nicht beobachtet werden. Zwischen beiden getesteten Varianten des *environmental enrichment* zeigten sich keine behavioralen und nur partiell transkriptionelle Unterschiede. Die sich hieraus ergebenden Implikationen können zu einem erweiterten Verständnis der Zusammenhänge von Umwelt und Pathologie im Kontext der Chorea Huntington beitragen sowie wissenschaftliche Fragestellungen eröffnen und präzisieren, um sie in zukünftigen Untersuchungen zu bearbeiten.

Der beobachtete Transgen-induzierte progrediente Phänotyp entspricht im Wesentlichen den vorbeschriebenen Charakteristika des BACHD Modells, es zeigten sich jedoch auch einige Abweichungen der hier beschriebenen Ergebnisse mit vorherigen Untersuchungen. Während etwa in der vorliegenden Arbeit eine verstärkte Gewichtszunahme transgener Tiere in den ersten Lebenswochen zu beobachten war, zeigten sich in Yu-Taeger et al. (2012) keine Unterschiede zwischen Wildtyp und BACHD-transgenen Ratten. In derselben Publikation fand sich im *elevated plus maze* Test eine reduzierte Präsentation angstbezogenen Verhaltens in BACHD Tieren, während sich in der hier vorgestellten Studie ein deutlich gegensätzlicher Effekt zeigte. Manfré et al. (2017) schließlich fanden bei Testung im selben Test sowie einem alternativen Verhaltenstest keinen Unterschied zwischen Wildtyp und BACHD-Ratten im gleichen Alter wie die in der vorliegenden Arbeit genutzten Tiere. Variationen in der Erfassung einzelner phänotypischer Aspekte sind allgemein in Tiermodellstudien bis zu einem bestimmten Grad üblich und auch spezifisch für BACHD-Ratten beschrieben (Robinson et al., 2019; Novati et al., 2020). So fand sich etwa die in Yu-Taeger et al. (2012) beschriebene Beeinträchtigung der Lokomotorik trotz analoger Operationalisierung als spontan zurückgelegte Distanz in der Dunkelphase auch in der vorliegenden Arbeit, nicht jedoch in der Replikationsstudie von Manfré et al. (2017). Als mögliche Ursachen dieser Diskrepanzen kommen Unterschiede im konkreten Versuchsaufbau und der Tierhaltung abseits der Testsituationen in Frage. Auch kann ein inkonsistenter Phänotyp des Tiermodells insbesondere in nicht-motorischen Aspekten vorliegen (Manfré et al., 2017).

mHTT-bedingte Veränderungen in der striatalen Transkription fanden sich für Gene, die im Rahmen neuronaler und glialer Funktionen relevant sind. Besondere funktionelle

Schwerpunkte zeigten sich für Myelinisierungs- und synaptische Prozesse. Ähnliche Änderungen fanden Langfelder et al. (2016) in sechs heterozygoten *HTT knock-in* Mauslinien mit CAG repeat Sequenzen zwischen 20 und 175 Wiederholungen, insbesondere auf synaptische Funktionen bezogen, wie auch Yu-Taeger et al. (2017), die zwölf Monate alte BACHD-Ratten aus zwei Linien untersuchten, die sich in der Expressionsrate von humanem *mHTT* unterschieden. Die in Novati et al. (2018) beschriebene transkriptionelle Dysregulation in BACHD-Ratten im Alter von zwei Monaten war ebenfalls mit synaptischen Funktionen assoziiert. Teo et al. (2016) zeigen atrophe Veränderungen und transkriptionelle Dysregulation Myelin-assoziiierter Gene in BACHD-Ratten und YAC128-Mäusen im Alter zwischen sechs Wochen und einem Jahr. Insofern gliedern sich die gefundenen Expressionsänderungen der transgenen Tiere in ihrer Funktion gut in vorbestehende Befunde ein. Auch aktuelle Forschungsergebnisse in HD-PatientInnen zeigen konkordante Veränderungen in synaptischen und Myelinisierungsprozessen (Raymond, 2017; Bardile et al., 2019; Smith-Dijak et al., 2019; Bourbon-Teles et al., 2019; Casella et al., 2020; Barron et al., 2021; Cepeda & Levine, 2022).

Die in BACHD Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren veränderte Expressionsrate eines Gens unter Standard-Haltungsbedingungen kann unterschiedliche Bedeutungen haben. Einerseits kann es Teil der Pathophysiologie der Chorea Huntington und (Mit-)Auslöser von nachfolgenden Störungen sein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die veränderte Transkription des jeweiligen Gens eine biologische Reaktion auf pathologische Veränderungen darstellt mit dem Ziel, diese zu kompensieren und die physiologische Zellfunktion zu stützen. Auch eine letztlich folgenlose Transgen-reaktive Expressionsveränderung des Gens ohne relevanten Beitrag zu Pathophysiologie oder Kompensationsmechanismen ist möglich. Und schließlich kann es sich um einen Typ-I-Fehler im Rahmen der statistischen Analyse handeln, also ein falsch-positives Ergebnis der differentiellen Expressionsanalyse des konkreten Gens. Insbesondere bei Analysen kleiner Versuchsgruppen ist der positiv prädiktive Wert eines statistisch signifikanten Ergebnisses verhältnismäßig niedrig (Button et al., 2013). Von besonderem wissenschaftlichem Interesse sind pathophysiologisch relevante Gene und solche, die im Rahmen der zellulären Kompensationsreaktion eine Rolle spielen. Eine Einordnung auf Basis der hier vorgestellten Ergebnisse kann nur spekulativ sein. Insbesondere bei Genen, über welche in der wissenschaftlichen Literatur in diesem Zusammenhang bislang wenig bekannt ist, sind Validierungsstudien nötig, um ein besseres Verständnis für deren Funktion und Relevanz im Kontext von HD zu gewinnen.

In den identifizierten Modulen lag zum Sechsmonatszeitpunkt nur wenig differentielle Expression vor. Gene dieser Module scheinen damit erst später von Transgen-induzierten Expressionsänderungen betroffen zu sein. Novati et al. (2018) beschreiben im Gegensatz hierzu moderate differentielle Expression in BACHD Ratten bereits im Alter von zwei Monaten. Zusätzlich legen die in der vorliegenden Arbeit bereits zum Sechsmonatszeitpunkt beobachteten phänotypischen Defizite Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene zumindest nahe. Mögliche Erklärungen hierfür sind die konkrete Konstruktion des Koexpressionsnetzwerks, Expressionsänderungen in nicht betrachteten Modulen und eine unzureichende statistische Power.

Aufbau und Datengrundlage des zu konstruierenden Koexpressionsnetzwerks haben erheblichen Einfluss auf die Art des entstehenden Netzwerks und die dadurch am besten zu bearbeitenden Fragestellungen (Zhang & Horvath, 2005; Langfelder & Horvath, 2008). Diese Arbeit nutzte die Daten der unter Standardbedingungen gehaltenen Tiere zum Zwölfmonatszeitpunkt zur Modulkonstruktion. Hieraus ergibt sich notwendigerweise, dass die statistische Power zur Identifikation von Expressionsunterschieden zwischen den Genotypen auf diesen Untersuchungszeitpunkt fokussiert ist. Die resultierende Modulstruktur ließ sich zwar auch in der Sechsmonatskohorte replizieren und behält ihre Validität daher auch in diesen Daten; durch eine Netzwerkkonstruktion, welche die jüngere Altersgruppe bereits in den initialen Aufbau des Netzwerks integriert, könnte der Expressionsraum zwar einerseits derart eingeteilt werden, dass die transkriptionelle Variation über beide Alterszeitpunkte hinweg zur Modulbildung herangezogen werden kann. Andererseits hätte ein Netzwerk auf Basis der unter Standardbedingungen gehaltenen Tiere beider Altersgruppen den deutlichen Nachteil, dass auch nach angemessener Normalisierung der Daten der Alterseffekt die Koexpressionsmatrix so stark prägen würde, dass die im Vergleich hierzu geringer ausgeprägten Effekte von Genotyp und Haltungsbedingung einen deutlich geringeren Einfluss auf die Modulbildung ausüben würde. Da Ziel der vorliegenden Arbeit war, primär Effekte von Genotyp und Haltungsbedingung zu untersuchen, würde ein solches Netzwerk für die interessierende Fragestellung einen geringeren Informationswert liefern als das gewählte, der nur durch eine erhebliche Steigerung der Stichprobengröße zu kompensieren wäre. Der beschriebene *trade-off* in der Betrachtung unterschiedlicher Effekte wäre prinzipiell über eine sogenannte Konsensusanalyse (Langfelder & Horvath, 2008; Langfelder et al., 2013) umgehbar, die beide Alterszeitpunkte getrennt zur Netzwerkkonstruktion heranzieht und übergreifende Konsensusmodule definiert, wodurch eine Moduleinteilung erzeugt wird, die durch beide

voneinander unabhängige Datensätze informiert ist und von ihnen geteilt wird. Von einer Konsensusanalyse des hier verwendeten Datensatzes wurde aus mehreren Gründen abgesehen. Zum einen ist die verfügbare Stichprobengröße für die Erstellung eines Konsensus-Koexpressionsnetzwerks sehr klein und läuft damit Gefahr, dass das entstehende Netzwerk durch unsystematische Messungenauigkeit verzerrt wird (Horvath, 2011). Andererseits steigt mit zunehmender Komplexität der Netzwerkstruktur die Anzahl der Gene, die keinem der entstehenden Module zugeordnet werden können, womit die Informationsdichte der Analyse zunehmend reduziert würde. Zusammenfassend ist die Wahl der sinnvollsten Netzwerkkonstruktion abhängig von der konkret formulierten Fragestellung, wenn auch Kernzusammenhänge des betrachteten Expressionsraums bei ausreichender Stichprobengröße und Validität der Daten erhalten bleiben sollten.

Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in weiteren als den zwei identifizierten Modulen relevante differentielle Expression der Modulgene anzunehmen ist. Das konstruierte Netzwerk beinhaltete beispielsweise bereits insgesamt fünf Module, deren Koexpression vom Genotyp der Tiere beeinflusst wurde, die jedoch nicht alle ausreichend in anderen Experimentalgruppen und externen Datensätzen validiert werden konnten. Weitere Module zeigten deutliche Eigengen-Genotyp-Korrelationen, die in der relativ kleinen Versuchsgruppe keine statistische Signifikanz erreichen konnten. Eine Erhöhung der Stichprobengröße würde erlauben, weitere Module mit weniger starker transgen-abhängiger Veränderung zu identifizieren. Die Reevaluation des Netzwerks in einer größeren Kohorte könnte diese Module als ebenfalls vom Transgen beeinflusst vorfinden. Langfelder et al. (2016) beispielsweise beschreiben in transgenen HD-Mäusen neben Modulen, die funktional mit den hier beschriebenen übereinstimmen, weitere striatale Module, deren Gene unter anderem mit Transkriptionsfaktoren, DNA-Reparaturmechanismen, Chromatin-Regulation, Zellteilung und mitochondrialen Funktionen assoziiert sind. Die hier identifizierten Module sind – die Validität des *mHTT*-Effekts vorausgesetzt – als Spitze der differentiellen Expression zu verstehen, die voraussichtlich von hier nicht detektierten, weniger deutlichen Veränderungen in weiteren Modulen begleitet wird. Die Untersuchung an einem größeren Kollektiv würde darüber hinaus auch innerhalb der identifizierten Module über die Minimierung von Typ-II-Fehlern eine verbesserte Analyse der differentiellen Genexpression ermöglichen.

Beide Varianten des *environmental enrichment* waren in der Lage, die veränderte striatale Genexpression transgener Tiere wieder nahezu vollständig zu normalisieren. Es fand sich zusätzlich im Vergleich beider Umweltinterventionen Evidenz dafür, dass ein später

einsetzendes EE teilweise einen noch stärkeren normalisierenden Effekt aufweist. Auf Ebene des Phänotyps konnte keine der beiden Umweltmodifikationen die beobachtete behaviorale Dysfunktion relevant beeinflussen. Es zeigte sich hier eine Gleichwertigkeit beider EE-Ansätze. Die spätere Anwendung eines EE nach Ausprägung eines bereits deutlich gestörten Phänotyps transgener Tiere stand damit in keinem der betrachteten Parameter der längeren und früheren Intervention nach. Motiviert wurde der Vergleich beider EE-Varianten durch translationale Überlegungen. Sollten sich diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen, ergäben sich daraus möglicherweise Hinweise, dass förderliche Lebensstiländerungen auch reaktiv nach Symptommanifestation noch sinnvoll und verlaufsmodifizierend wirken können.

Die Effektivität von *environmental enrichment* in der Normalisierung Transgen-vermittelter Veränderungen unterschied sich deutlich zwischen den transkriptionellen und behavioralen Parametern. Inkonsistente Effekte zwischen verschiedenen biologischen Ebenen und moderate Reliabilität von Verhaltenstestverfahren im BACHD Rattenmodell wie in Tiermodellen im Allgemeinen sind zwar nicht unüblich (Novati et al., 2020). Dennoch sollten auch Aspekte, die für diese konkrete Untersuchung spezifisch sind, als mögliche Ursachen erwähnt werden. So könnte der beobachtete Altersbereich von der Geburt bis maximal knapp einem Jahr zu früh sein, um phänotypische Effekte des *environmental enrichment* erfassen zu können. Ein längerer Untersuchungszeitraum könnte ratsam sein, um möglicherweise später einsetzende Umwelteffekte auf den Phänotyp beobachten zu können. HD ist eine Erkrankung, die sich üblicherweise im mittleren Erwachsenenalter manifestiert. Die mittlere Lebenserwartung von *rattus norvegicus* unter Laborbedingungen beträgt etwa 30 bis 36 Monate, wobei weibliche Tiere tendenziell ein höheres Alter erreichen als männliche (Haines, 2010; Carter et al., 2020). Die korrekte Entsprechung von Lebensabschnitten und Lebensspanne im Menschen auf die Ratte als Modellorganismus ist nicht eindeutig geklärt (Quinn, 2005; Andreollo et al., 2012; Sengupta, 2013, 2015). Basierend auf Schätzungen von Sengupta (2013) entspricht eine sechs Monate alte Ratte in etwa einem 18-jährigen Menschen, während 12 bzw. 18 Rattenmonate mit circa 30 bzw. 45 Menschenjahren korrespondieren. Das BACHD-Rattenmodell zeichnet sich durch einen früh einsetzenden progressiven Phänotyp aus (Yu-Taeger et al., 2012) wie er auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Prozesse, die den Einfluss der Umwelt auf behaviorale Eigenschaften vermitteln, könnten davon losgelöst von altersspezifischen Einflüssen abhängen, die im ersten Lebensjahr nicht ausreichend ausgeprägt sind. Eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums um einige Monate könnte helfen, potenzielle altersabhängige Drittvariablen zu identifizieren, die den Effekt von *environmental enrichment*

beeinflussen. Ebenso möglich ist, dass die EE-bedingte Normalisierung des Transkriptom durch Mediatoren auf zwischengeschalteten Ebenen nicht zu phänotypischen Veränderungen führte. (Post-)Translationale Modifikationen von Genprodukten treten bei HD auf und tragen relevant zur Pathophysiologie bei (Ehrnhoefer et al., 2011; Martin et al., 2018; Lontay et al., 2020). Eine Untersuchung des striatalen Proteoms könnte Aufschluss darüber geben, wie sich die beobachtete transkriptionelle Normalisierung *mHTT*-bedingter Veränderungen auf die Verfügbarkeit und Zusammensetzung zugehöriger Proteine auswirkt.

Möglicherweise genügt Anzahl und Ausmaß der EE-bedingten Expressionsnormalisierung auch nicht, um behaviorale Eigenschaften ausreichend stark beeinflussen zu können.

Die beobachteten transkriptionellen Änderungen könnten mit der Leistung der Tiere in der Verhaltensmessung auch schlicht in keinem Kausalzusammenhang stehen. Der genutzte Experimentalaufbau ermöglicht kausale Aussagen nur in Bezug auf die Effekte von Transgen und Haltungsbedingung. Über Zusammenhänge zwischen der Genexpression exklusive des Transgens und dem Phänotyp können nur korrelative Aussagen getroffen werden, die in entsprechenden Folgestudien auf Kausalität geprüft werden müssten.

Zuletzt ist könnte die verfügbare statistische Power nicht ausreichend hoch für die verlässliche Detektion eines moderierenden Umwelteffekts gewesen sein. Trotz relativer Verbreitung der Praxis sollte eine *post hoc* Anwendung von Poweranalysen zur Beurteilung des gefundenen (Nicht-)Effekts unterbleiben (Goodman & Berlin, 1994; Hoenig & Heisey, 2001; Althouse, 2021). Werden stattdessen allgemeine Empfehlungen für die Planung der Stichprobengröße zur Etablierung ausreichender statistischer power herangezogen, zeigt sich angesichts der realistisch erwartbaren Effektstärke eine zu geringe Besetzung der einzelnen Zellen der Verhaltenstestung (Jones et al., 2003; Van Voorhis & Morgan, 2007; Button et al., 2013).

Die als niedrig angenommene statistische Power weist auf eine generelle Limitation der vorliegenden Arbeit hin, die auch die Einordnung der Ergebnisse der Koexpressionsanalyse betrifft. Die dort beobachteten starken Effekte basieren auf kleinen Gruppen von in der Regel sechs Tieren pro Genotyp in der jeweiligen Experimentalbedingung. Power-assoziierte Risiken solch kleiner Versuchsgruppen beinhalten – neben der definitorisch reduzierten Wahrscheinlichkeit wahre Effekte in der Analyse auch zu entdecken – die Überschätzung von Effektgrößen sowie einen geringeren positiven Prädiktionswert, gleichbedeutend mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit, dass statistisch signifikante Ergebnisse wahre Effekte reflektieren anstelle von falsch-positiven Befunden (Button et al., 2013). Niedrige statistische Power ist ein insbesondere in der Grundlagenforschung weit verbreitetes Problem mit daraus

resultierenden niedrigen Replikationsraten, das Tierversuchsstudien in besonderem Maße betrifft (Prinz et al., 2011; Begley & Ellis, 2012; Button et al., 2013; Singh et al., 2016; Munafò et al., 2017; Frommlet, 2020; Voelkl et al., 2020; Gosselin, 2021). So konnten Begley und Ellis (2012) die Ergebnisse von nur sechs der 53 untersuchten *landmark studies* im Gebiet der präklinischen Krebsforschung reproduzieren. Ähnliche Probleme zeigten großangelegte Replikationsstudien anderer Felder, etwa der Psychologie (Aarts et al., 2015). Auch und insbesondere Publikationen in hochrangigen Wissenschaftsjournalen sind hiervon betroffen (Camerer et al., 2018). Eine durch das *Nature* Journal initiierte Befragung von etwa 1600 Forschenden insbesondere aus den Naturwissenschaften und *life sciences* ergab, dass über 70% bzw. über 50% der Teilnehmenden erfolglos versuchten, fremde bzw. eigene Ergebnisse zu reproduzieren (Baker, 2016). Im vielbeachteten Artikel „*Why most published research findings are false*“ beschreibt (Ioannidis, 2005) unzureichende statistische Power als eines der zentralen Risiken für die Generierung falsch-positiver Effekte. Eine hierauf aufbauende Analyse von Tierversuchen in den Neurowissenschaften fand exemplarisch bei Studien, die Geschlechtseffekte in *Morris water maze* Experimenten untersuchten, bei durchschnittlich 22 Versuchstieren eine Power von 18%, um Effekte in der berichteten Größenordnung zu detektieren (Button et al., 2013). Insofern wird eine für die erwarteten Effektgrößen nicht optimale Stichprobengröße eine wesentliche Limitation der vorliegenden Arbeit dar, die von einem großen Teil der grundlagenwissenschaftlichen Studien geteilt wird, aber nichtsdestotrotz hervorzuheben ist und von Folgestudien angemessen zu adressieren wäre; eine Reihe hierfür zur Verfügung stehender potentieller Maßnahmen findet sich etwa in Cobo et al. (2007), McNutt (2014), Reed (2018), Macleod & Mohan (2019), Frommlet (2020), von Kortzfleisch und KollegInnen (2020) sowie Bonapersona et al. (2021).

4.2 Identifikation potenzieller Kandidatengene

Durch den verwendeten Netzwerkansatz konnte eine Vielzahl von Genen in ihrer Koexpression erfasst und mit dem Genotyp-Status als interessierende unabhängige Variable assoziiert werden. Die Untersuchung auf Modulierbarkeit dieses Zusammenhangs durch Haltungsbedingungen ermöglichte eine Filterung nach Genen, deren Expression sowohl von *mHTT*-bezogenen Effekten verändert wurde als auch durch Einflüsse aus der Umwelt der Tiere normalisiert werden konnte. Hieraus rekrutieren sich Kandidatengene für kausale Validierungsstudien, die als Ausgangspunkt dienen können, um relevante zelluläre Mechanismen zu identifizieren, über die pathophysiologische Prozesse im Rahmen der *mHTT*-Expression beeinflusst werden können. Aus dieser Gruppe von Kandidatengenen hervorzuheben sind *MBP* (*myelin basic*

protein, siehe **Abbildung 21**) und *MAG* (*myelin associated glycoprotein*, siehe **Abbildung 22**) aus dem Modul *Cyan* sowie *CRYAB* (*alpha-crystallin B chain*, siehe **Abbildung 23**) und *DNM2* (*dynamain 2*, siehe **Abbildung 24**) aus dem Modul *Purple*.

MBP ist eines der in den Myelinscheiden des zentralen Nervensystems am häufigsten vorkommenden Proteine und entscheidend am Myelinisierungsprozess beteiligt (Boggs, 2006; Raasakka et al., 2017). Eine erniedrigte *MBP*-Expression in HD-Tiermodellen war mit der Ausdünnung von Myelinscheiden noch vor der Manifestation erster Symptome assoziiert (Xiang et al., 2011). Im Kontext demyelinisierender Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose wird für das Ausmaß der *MBP*-Expression ein ursächlicher Zusammenhang mit dem Untergang von Myelinstrukturen angenommen (Raasakka et al., 2017).

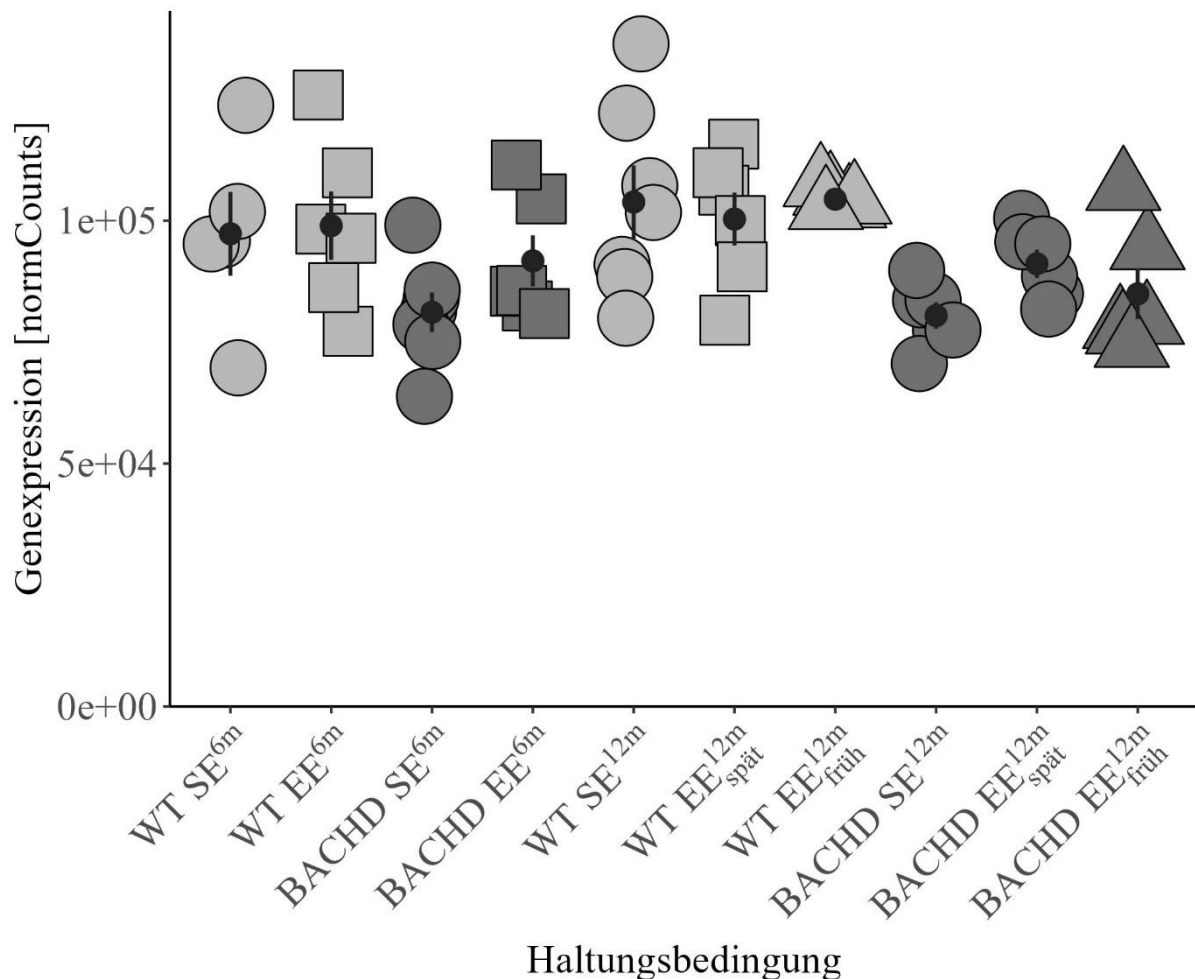


Abbildung 21. Expressionsprofil *myelin basic protein* (*Mbp*) in den verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Expression wird in *normalized read counts* (*normCounts*) quantifiziert, Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

MAG macht unter den Proteinen der Myelinscheide sowohl des zentralen wie auch des peripheren Nervensystems einen relativen Anteil von unter 1% aus (Trapp, 1990). Für die Axon-Myelin-Interaktion sowie den Erhalt myelinisierter Axone und Differenzierung von Oligodendrocyten ist es von entscheidender Bedeutung (Bjartmar et al., 1999; Quarles, 2007; Kinter et al., 2013). Loss-of-function-Mutationen im *MAG* Gen führen im Menschen wie im experimentellen Tiermodell zur Degeneration myelinisierter Axone (Fruttiger et al., 1995; Yin et al., 1998; Pan et al., 2005; Lossos et al., 2015).

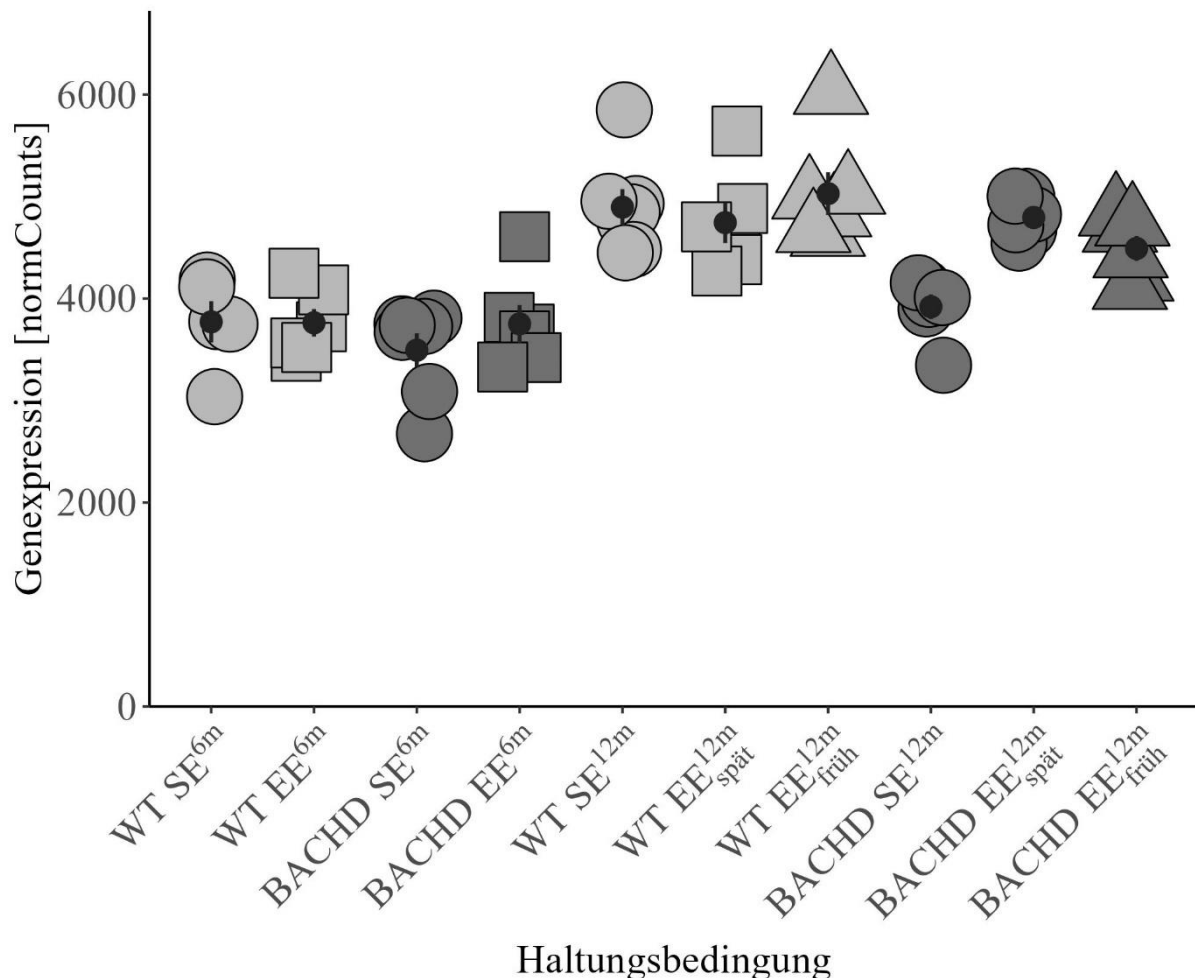


Abbildung 22. Expressionsprofil *myelin associated glycoprotein* (*Mag*) in den verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Expression wird in *normalized read counts* (*normCounts*) quantifiziert, Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

CRYAB kodiert als Genprodukt das Hitzeschock-Protein α B-Kristallin, welches unter anderem an fehlgefaltete Proteinstrukturen bindet und so deren Aggregation verhindert (Yamamoto et al., 2014). In Tiermodellen zeigte α B-Kristallin neuroprotektive Effekte im Kontext einer Vielzahl neurodegenerativer Proteinopathien (Wang et al., 2005; Hagemann et al., 2009; Waudby et al., 2010; Tue et al., 2012; Hochberg et al., 2014; Lu et al., 2019). Speziell auf die

Huntington-Erkrankung bezogen stellten Oliveira et al. (2016) in BACHD Mäusen ein progredientes Defizit von α B-Kristallin fest und konnten nach Induktion einer verstärkten astrocytären *CRYAB*-Expression phänotypische Verbesserungen beobachten.

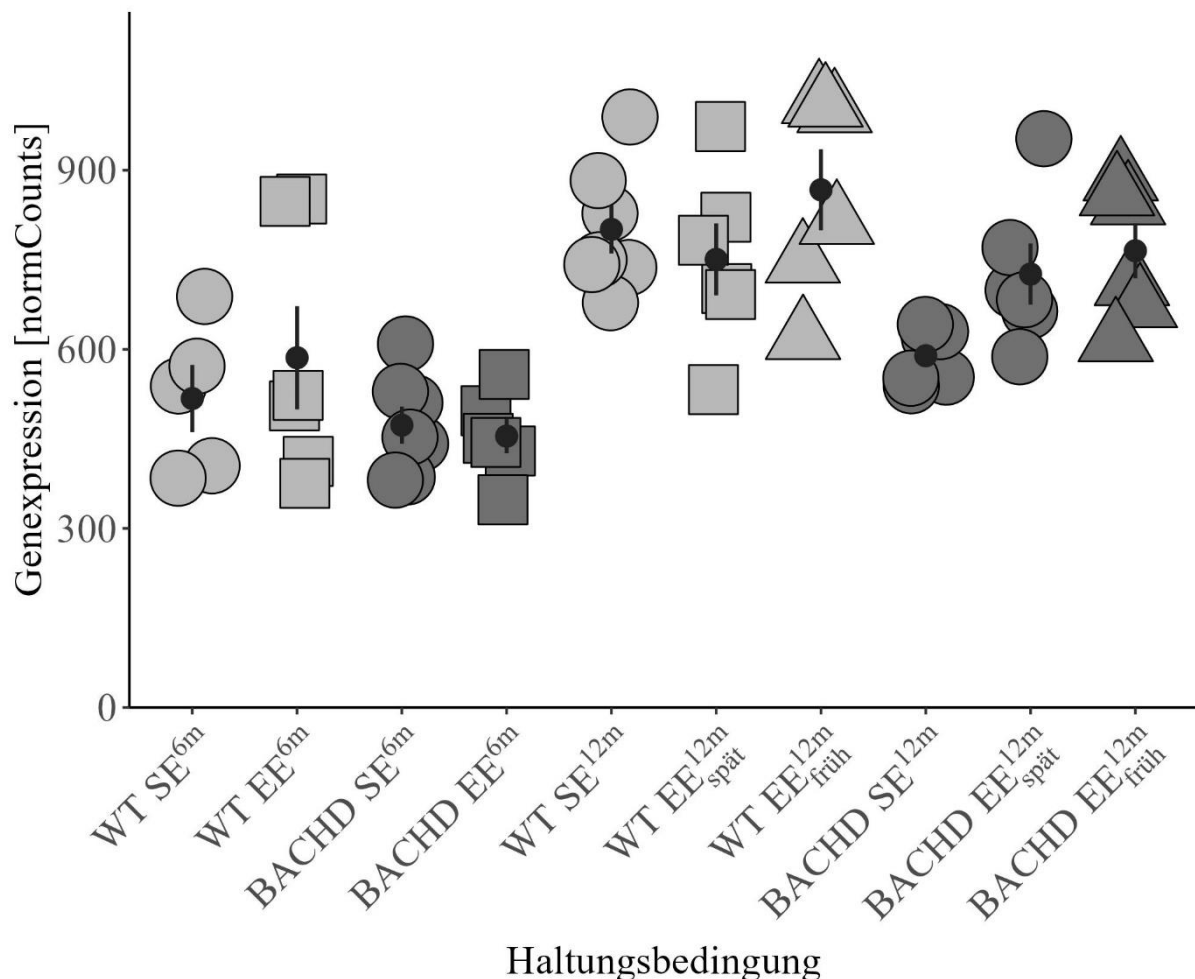


Abbildung 23. Expressionsprofil *alpha-crystallin B chain* (*Cryab*) in den verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Expression wird in *normalized read counts* (*normCounts*) quantifiziert, Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

DNM2 spielt eine wichtige Rolle für die Fusion und Abschnürung von Membranen und agiert damit als wichtiger Mediator in der Teilung und Verschmelzung von Organellen sowie bei endocytotischen Prozessen (Laiman et al., 2023). Es wird als (Ko-)Kausalfaktor für eine Reihe neuromuskulärer Erkrankungen angenommen (Zhao et al., 2018). In seiner Interaktion mit Mitochondrien und Endosomen ist es für den zellulären Energiehaushalt und autophagale Prozesse relevant und scheint diese in HD in direkter Protein-Protein Interaktion mit HTT zu modifizieren (Tourette et al., 2014; Kraus & Ryan, 2017; Puri et al., 2020; Jurcau, 2022).

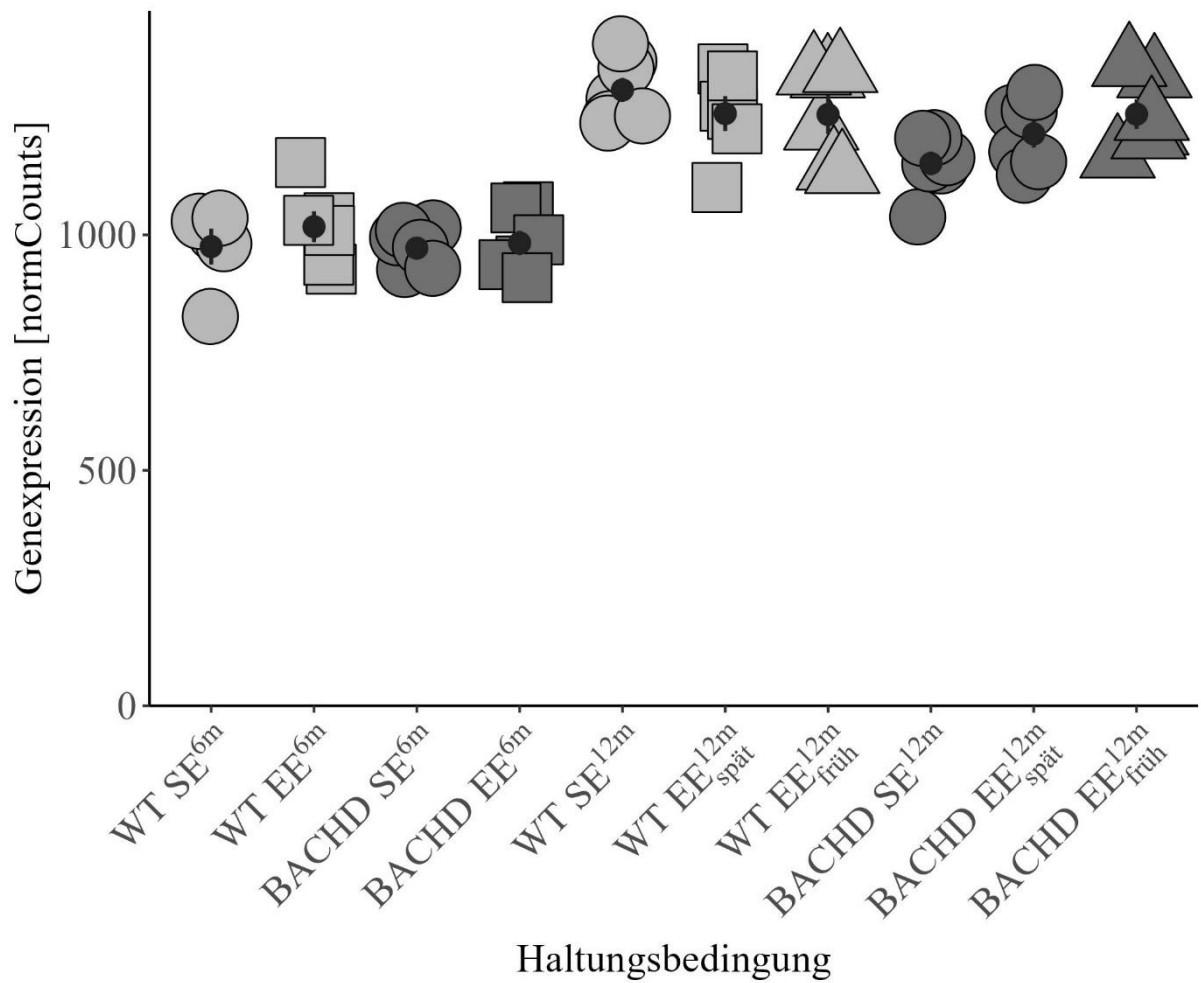


Abbildung 24. Expressionsprofil *dynamin 2* (*Dnm2*) in den verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Expression wird in *normalized read counts* (*normCounts*) quantifiziert, Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, in einem transgenen Tiermodell die transkriptionellen und Phänotyp-bezogenen Auswirkungen der Huntington-Erkrankung zu untersuchen und das Verständnis zu vertiefen, inwieweit diese durch Verhaltens- und Umweltfaktoren verhindert bzw. modifiziert werden können. Die generierten Daten wurden einem integrativen Netzwerkansatz zugeführt, der nach sorgfältiger Literaturrecherche hier erstmals zur Analyse der Genexpression im Kontext von *environmental enrichment* und Chorea Huntington eingesetzt wurde. Die Ergebnisse lassen sich im Kontext der vorangestellten Hypothesen folgend zusammenfassen.

Hypothese 1.a: BACHD Tiere der Kontrollgruppe zeigen in Verhaltenstests insgesamt eine schlechtere Leistung als WT Tiere

Transgene Tiere präsentierten einen im Vergleich zum Wildtyp deutlich betroffenen Phänotyp, der nicht relevant durch die unterschiedlichen Haltungsbedingungen beeinflusst wurde. Die am stärksten beeinträchtigte Domäne fand sich im lokomotorischen Verhalten der Tiere während der Dunkelphase des Tageszyklus. BACHD Ratten zeigten zu beiden Alterszeitpunkten ein stark reduziertes Ausmaß lokomotorischer Aktivität. Deutliche *mHTT*-induzierte kognitive Defizite zeigten sich ebenfalls sowohl in der jüngeren als auch der älteren Kohorte. Eine moderate Steigerung Angst-bezogenen Verhaltens in BACHD-Ratten konnte zum Zwölfmonatszeitpunkt beobachtet werden. Zusätzlich zeigten transgene Tiere eine verstärkte Gewichtszunahme während der ersten Lebenswochen. In Gesamtschau stehen die erhobenen Verhaltensdaten in Einklang mit der zugehörigen Hypothese.

Hypothese 1.b: BACHD Tiere der Kontrollgruppe weisen eine partiell differentielle striatale Genexpression im Vergleich zu SE WT Tieren auf

Das auf den Tieren der SE^{12m} Kontrollgruppe basierende Netzwerk der striatalen Koexpression enthielt fünf in ihrer Expression signifikant vom Genotyp der Tiere beeinflusste Module. Die Validierung des Netzwerks an internen wie externen murinen Expressionsdaten sowie an HD-PatientInnen führte zur Selektion von zwei Modulen, die über alle betrachteten Datensätze als konserviert angesehen werden konnten. Zusätzliche Evidenz für diese Auswahl ergab sich aus einer Konvergenzvalidierung mit der einfachen differentiellen Genexpressionsanalyse. Die differentielle Genexpression der Module betraf Gene, die insbesondere für gliale bzw. neuronale Funktionen von Bedeutung sind. Für diese Gene zeigte sich ausnahmslos eine

geringere Expression in transgenen relativ zu Wildtyp Tieren. Diese Befunde stützen die in der zugehörigen Hypothese angenommenen Zusammenhänge.

Hypothese 2.a: Die in 1.a angenommenen phänotypischen Unterschiede sind zum Zwölfmonatszeitpunkt ausgeprägter als zum Sechsmonatszeitpunkt

Die beobachteten phänotypischen Defizite transgener Ratten präsentierten sich zwischen den betrachteten Alterszeitpunkten partiell progredient. Angst-bezogenes Verhalten lag zum Zwölf-, nicht aber zum Sechsmonatszeitpunkt zwischen den Genotypen verändert vor. Kognitive Defizite zeigten eine Tendenz zur Verschlechterung in der älteren Kohorte. Lokomotorische Defizite schließlich waren in beiden Altersgruppen ähnlich stark ausgeprägt. Zusammengenommen lag bei älteren BACHD Ratten – wie in der aufgestellten Hypothese angenommen – ein im Mittel stärker beeinträchtigter Phänotyp vor.

Hypothese 2.b: In 1.b angenommene transkriptionelle Unterschiede zwischen den Genotypen sind zum Zwölfmonatszeitpunkt ausgeprägter als zum Sechsmonatszeitpunkt

Zum Sechsmonatszeitpunkt fand in den betrachteten Modulen in nur sehr geringem Maße differentielle Expression statt. Die in der älteren Tierkohorte festgestellten deutlichen transkriptionellen Unterschiede zwischen den Genotypen stehen hierzu in Kontrast. Im Allgemeinen zeigte die Mehrheit der Modulgene eine altersassoziierte Änderung ihrer Expressionsrate. Die betrachteten Pseudo-Trajektorien in den jeweiligen Modulen umfassten im Wesentlichen dieselben Gene. BACHD Tiere konnten dabei tendenziell das Ausmaß der in WT Tieren gezeigten Expressionsänderung nicht gleichermaßen nachvollziehen. Passend hierzu deutete sich bei BACHD Tieren in Genen, die nur in Pseudotrajektorien eines der beiden Genotypen enthalten waren, ein Nichtnachvollziehen von im Wildtyp beobachteten Expressionsveränderungen an. Damit entsprechen die beobachteten den in der Hypothese formulierten Änderungen.

Hypothese 3.a: Im Vergleich der SE Tiere mit beiden EE Gruppen zeigt sich in den Verhaltensdaten eine Interaktion von Genotyp mit Umwelt zugunsten eines geringeren Transgen-Effekts unter beiden EE-Bedingungen.

Der Genotyp der Tiere hatte einen deutlichen Einfluss auf den beobachteten Phänotyp. Ein diese Unterschiede modulierender Interaktionseffekt zwischen Genotyp und Haltungsbedingung wurde in den Verhaltensmessungen nicht beobachtet. Vereinzelt zeigten sich milde bis moderate Umwelteffekte, die dann stets beide Genotypen betrafen. Einzig in den PhenoMaster-Daten zur Dunkelphase-Aktivität zeigte sich eine Interaktion beider experimentell manipulierter Variablen. Diese ist allerdings auf Unterschiede zwischen den Wildtyp-Subgruppen zurückzuführen und nicht auf eine veränderte Aktivität von transgenen Tieren in unterschiedlichen Haltungsbedingungen. Insofern unterstützen die erhobenen Daten die formulierte Hypothese nicht.

Hypothese 3.b: Die in 1.b angenommene differentielle Expression zwischen den Genotypen liegt in beiden EE-Gruppen reduziert vor.

Die unter Standardbedingungen aufgetretene ausgeprägte differentielle Expression von Modulgenen betraf unter beiden *enriched environment* Bedingungen nur vereinzelte Gene. In Modul *Cyan* wurde Anzahl an differentiell exprimierten Genen je nach betrachtetem Vergleich auf maximal vier und in Modul *Purple* auf maximal drei Gene begrenzt. Unter Standardbedingungen wurden kontrastierend hierzu jeweils 84 (Modul *Cyan*) bzw. 65 Gene (Modul *Purple*) in Abhängigkeit vom Genotyp unterschiedlich exprimiert. Dieser Ergebnisse entsprechen damit dem in der Hypothese antizipierten Effekt.

Hypothese 4.a: Der in 3.a angenommene Interaktionseffekt unterscheidet sich zwischen früherer und späterer EE-Exposition.

Beide *enriched environments* unterschieden sich insgesamt nicht in ihrer Auswirkung auf den Phänotyp transgener Tiere. Der angenommene modulierende Effekt der Haltungsbedingung fand sich weder für frühes noch für spätes *environmental enrichment*. Die Hypothese kann durch diese Ergebnisse daher nicht unterstützt werden.

Hypothese 4.b: Die in 1.b angenommene differentielle Expression wird durch EE_{früh} und EE_{spät} unterschiedlich stark reduziert.

Sowohl frühes als auch spätes *environmental enrichment* konnte die unter Standardbedingungen beobachteten *mHTT*-induzierten Expressionsänderungen stark reduzieren. Ein substanzieller Einfluss auf weitere Modulgene, die unter Standardhaltung keine differentielle Expression aufwiesen, wurde nicht beobachtet. In Modul *Purple* wurde die relative Änderung der Genexpression in transgenen Tieren in beiden *enriched environments* in vergleichbarem Umfang reduziert. Beide Umweltinterventionen schienen damit den gleichen normalisierenden Effekt auf die striatale Transkription gehabt zu haben. Für die Expression der Gene in Modul *Cyan* zeigte sich ebenfalls für beide EE-Varianten ein entsprechender angleichender Effekt, der unter später einsetzendem *environmental enrichment* stärker ausgeprägt zu sein schien. Die beiden Umweltinterventionen scheinen daher im Sinne der Hypothese zumindest partiell unterschiedlichen Einfluss auf die striatale Genexpression ausgeübt zu haben.

Appendix

Appendix 1. Übersicht über die Module der durchgeführten Netzwerk-Analyse. Angegeben sind alle 98 identifizierten Module mit der Anzahl der zugeordneten Gene (n) sowie dem jeweiligen Eigengen-Genotyp Korrelationskoeffizienten (r) mit zugehörigem p-Wert (p) und Bayes-Faktor (BF).

| Modul | n | r (p) | | BF |
|-----------------|----|-------|---------|-------|
| lightslateblue | 36 | -.29 | (.34) | 0.33 |
| mediumpurple1 | 36 | .08 | (.81) | 0.21 |
| orangered1 | 38 | -.36 | (.22) | 0.43 |
| pink4 | 39 | -.19 | (.53) | 0.25 |
| mediumpurple4 | 40 | .07 | (.81) | 0.21 |
| sienna4 | 40 | -.02 | (.95) | 0.21 |
| skyblue4 | 40 | -.12 | (.69) | 0.22 |
| yellow3 | 40 | .01 | (.97) | 0.21 |
| coral3 | 42 | .36 | (.23) | 0.43 |
| antiquewhite2 | 43 | -.14 | (.64) | 0.23 |
| coral | 44 | -.14 | (.66) | 0.23 |
| darkseagreen3 | 45 | .27 | (.36) | 0.31 |
| honeydew | 45 | .47 | (.11) | 0.77 |
| lavenderblush2 | 46 | .012 | (.97) | 0.21 |
| lightpink3 | 46 | -.22 | (.47) | 0.27 |
| magenta4 | 46 | .24 | (.43) | 0.28 |
| navajowhite1 | 47 | .48 | (.1) | 0.83 |
| palevioletred2 | 48 | -.19 | (.54) | 0.25 |
| salmon2 | 49 | -.61 | (.03) | 2.40 |
| thistle | 50 | -.07 | (.82) | 0.21 |
| thistle3 | 50 | -.4 | (.18) | 0.52 |
| plum3 | 52 | .49 | (.09) | 0.88 |
| blue2 | 55 | -.32 | (.29) | 0.37 |
| brown2 | 55 | -.78 | (.0017) | 27.12 |
| darkolivegreen4 | 55 | -.23 | (.44) | 0.28 |
| darkviolet | 55 | -.15 | (.63) | 0.23 |
| firebrick4 | 55 | .04 | (.9) | 0.21 |
| indianred4 | 57 | -.45 | (.13) | 0.69 |
| lightcoral | 57 | .31 | (.3) | 0.35 |
| lightsteelblue | 57 | .15 | (.63) | 0.23 |
| mediumpurple2 | 59 | -.72 | (.0058) | 9.06 |
| orangered3 | 59 | -.32 | (.29) | 0.37 |
| plum | 61 | -.15 | (.62) | 0.23 |
| skyblue1 | 62 | -.29 | (.34) | 0.33 |
| skyblue2 | 62 | -.61 | (.027) | 2.40 |
| yellow4 | 62 | .02 | (.96) | 0.21 |
| coral2 | 64 | -.16 | (.6) | 0.24 |
| mediumorchid | 64 | -.29 | (0.34) | 0.33 |
| antiquewhite4 | 65 | -.23 | (0.45) | 0.28 |
| coral1 | 66 | 0.16 | (0.61) | 0.24 |
| darkseagreen4 | 66 | 0.26 | (0.39) | 0.3 |
| honeydew1 | 67 | -0.21 | (0.49) | 0.26 |

| | | | | |
|-----------------|-----|--------|----------|-------|
| lavenderblush3 | 68 | 0.16 | (0.59) | 0.24 |
| lightpink4 | 68 | -0.07 | (0.82) | 0.21 |
| maroon | 69 | -0.44 | (0.13) | 0.65 |
| navajowhite2 | 70 | 0.69 | (0.0088) | 6.14 |
| palevioletred3 | 70 | -0.72 | (0.0057) | 9.21 |
| salmon4 | 71 | -0.21 | (0.48) | 0.26 |
| thistle1 | 71 | -0.17 | (0.57) | 0.24 |
| plum2 | 72 | -0.23 | (0.46) | 0.28 |
| thistle2 | 72 | 0.07 | (0.82) | 0.21 |
| darkslateblue | 74 | 0.11 | (0.71) | 0.22 |
| bisque4 | 75 | 0.25 | (0.41) | 0.29 |
| brown4 | 76 | -0.013 | (0.97) | 0.21 |
| darkorange2 | 76 | 0.52 | (0.071) | 1.09 |
| floralwhite | 79 | -0.48 | (0.097) | 0.83 |
| ivory | 79 | 0.06 | (0.85) | 0.21 |
| lightcyan1 | 80 | 0.006 | (0.98) | 0.21 |
| lightsteelblue1 | 80 | 0.46 | (0.12) | 0.73 |
| mediumpurple3 | 81 | 0.33 | (0.27) | 0.38 |
| orangered4 | 82 | 0.16 | (0.6) | 0.24 |
| plum1 | 83 | 0.09 | (0.77) | 0.22 |
| skyblue3 | 83 | 0.19 | (0.53) | 0.25 |
| yellowgreen | 84 | -0.04 | (0.9) | 0.21 |
| sienna3 | 86 | -0.6 | (0.03) | 2.17 |
| darkmagenta | 87 | -0.18 | (0.56) | 0.25 |
| darkolivegreen | 88 | 0.58 | (0.036) | 1.80 |
| violet | 88 | 0.08 | (0.8) | 0.21 |
| paleturquoise | 90 | -0.41 | (0.16) | 0.55 |
| steelblue | 91 | -0.36 | (0.22) | 0.43 |
| saddlebrown | 92 | -0.13 | (0.68) | 0.23 |
| skyblue | 97 | -0.12 | (0.7) | 0.22 |
| darkorange | 98 | 0.31 | (0.3) | 0.35 |
| white | 98 | -0.12 | (0.7) | 0.22 |
| orange | 99 | -0.61 | (0.027) | 2.40 |
| darkgrey | 107 | -0.07 | (0.82) | 0.21 |
| darkturquoise | 107 | -0.39 | (0.19) | 0.50 |
| darkgreen | 112 | -0.22 | (0.48) | 0.27 |
| darkred | 120 | -0.5 | (0.079) | 0.95 |
| royalblue | 124 | -0.15 | (0.63) | 0.23 |
| lightyellow | 125 | -0.09 | (0.77) | 0.22 |
| lightgreen | 132 | -0.14 | (0.65) | 0.23 |
| midnightblue | 146 | 0.16 | (0.61) | 0.24 |
| cyan | 162 | -0.73 | (0.0047) | 10.98 |
| salmon | 171 | -0.49 | (0.091) | 0.88 |
| tan | 175 | -0.05 | (0.87) | 0.21 |
| greenyellow | 218 | -0.03 | (0.92) | 0.21 |
| purple | 224 | -0.71 | (0.0061) | 8.67 |
| magenta | 260 | -0.51 | (0.075) | 1.02 |
| pink | 276 | 0.08 | (0.8) | 0.21 |
| grey60 | 277 | 0.41 | (0.16) | 0.55 |

| | | | | |
|-----------|-----|-------|---------|------|
| black | 304 | 0.53 | (0.064) | 1.18 |
| red | 317 | -0.37 | (0.21) | 0.45 |
| green | 341 | 0.22 | (0.48) | 0.27 |
| yellow | 409 | 0.32 | (0.28) | 0.37 |
| brown | 606 | -0.53 | (0.06) | 1.18 |
| blue | 751 | 0.44 | (0.13) | 0.65 |
| turquoise | 853 | 0.61 | (0.028) | 2.34 |

Appendix 2. Funktionelle Anreicherung in Modul *Cynn*. Angegeben sind die 10 am stärksten angereicherten Gene Ontology (GO) Kategorien, geordnet nach dem jeweiligen p-Wert (p-Value) im Rahmen der Überrepräsentationsanalyse (ORA). Daneben angegeben sind die entsprechende GO-Identifizier mit zugehörigem Terminus, die Anzahl der zu dieser Kategorie annotierten Gene (size), die Anzahl an Modulgengen, welche mit der jeweiligen GO-Kategorie annotiert sind (overlap), die Anzahl des erwarteten overlap bei Zufallsziehung (expect) und das relative Ausmaß an Anreicherung über diesen erwarteten Wert hinaus (Enrichment Ratio); neben dem unkorrigierten p-Wert (pValue und log10p) ist auch die *false discovery rate* (FDR) als korrigiertes Signifikanzmaß angegeben; daneben sind die konkreten Modul-Gene angegeben, welche mit der jeweiligen GO-Kategorie assoziiert sind (userid).

| GO-Identifizier | GO Terminus | size | overlap | expect | Enrichment Ratio | pValue | FDR | log10p |
|-----------------|--|------|---------|--------|------------------|------------|-----------|-----------|
| GO:0042552 | myelination | 98 | 15 | 0.798 | 18.81 | 1.998e-15 | 2.477e-12 | 14.699317 |
| GO:0007272 | ensheathment of neurons | 100 | 15 | 0.814 | 18.43 | 2.665e-15 | 2.477e-12 | 14.574379 |
| GO:0008366 | axon ensheathment | 100 | 15 | 0.814 | 18.43 | 2.665e-15 | 2.477e-12 | 14.574379 |
| GO:0043209 | myelin sheath | 125 | 14 | 1.017 | 13.76 | 1.487e-12 | 1.036e-09 | 11.827809 |
| GO:0021782 | glial cell development | 67 | 10 | 0.545 | 18.34 | 1.4654e-10 | 8.173e-08 | 9.834105 |
| GO:0048709 | oligodendrocyte differentiation | 78 | 10 | 0.635 | 15.76 | 6.897e-10 | 3.206e-07 | 9.161314 |
| GO:0042063 | gliogenesis | 225 | 13 | 1.831 | 7.101 | 3.579e-08 | 1.426e-05 | 7.446288 |
| GO:0010001 | glial cell differentiation | 153 | 11 | 1.245 | 8.835 | 4.611e-08 | 1.608-05 | 7.336189 |
| GO:0022008 | neurogenesis | 1188 | 29 | 9.667 | 2.999 | 5.915e-08 | 1.833e-05 | 7.228072 |
| GO:0120036 | plasma membrane bounded cell projection organization | 1017 | 26 | 8.276 | 3.142 | 1.358e-07 | 3.788e-05 | 6.867084 |

Appendix 3. Funktionelle Anreicherung in Modul *Purple*. Angegeben sind die 10 am stärksten angereicherten Gene Ontology (GO) Kategorien, geordnet nach dem jeweiligen p-Wert (p-Value) im Rahmen der Überrepräsentationsanalyse (ORA). Daneben angegeben sind die entsprechende GO-Identifizier mit zugehörigen Terminus, die Anzahl der zu dieser Kategorie annotierten Gene (size), die Anzahl an Modulgenen, welche mit der jeweiligen GO-Kategorie annotiert sind (overlap), die Anzahl des erwarteten overlap bei Zufallsziehung (expect) und das relative Ausmaß an Anreicherung über diesen erwarteten Wert hinaus (Enrichment Ratio); neben dem unkorrigierten p-Wert (pValue und log10p) ist auch die *false discovery rate* (FDR) als korrigiertes Signifikanzmaß angegeben; daneben sind die konkreten Modul-Gene angegeben, welche mit der jeweiligen GO-Kategorie assoziiert sind (userid).

| geneSet | description | size | overlap | expect | Enrichment Ratio | pValue | FDR | log10p |
|------------|--|------|---------|--------|------------------|----------|-----------|----------|
| GO:0009150 | purine ribonucleotide metabolic process | 331 | 13 | 3.829 | 3.396 | 1.265e-5 | 0.1079572 | 3.897858 |
| GO:0009259 | ribonucleotide metabolic process | 344 | 13 | 3.979 | 3.267 | 1.850e-5 | 0.1079572 | 3.732734 |
| GO:0006119 | oxidative phosphorylation | 75 | 6 | 0.868 | 6.916 | 2.284e-5 | 0.1079572 | 3.641305 |
| GO:0006163 | purine nucleotide metabolic process | 353 | 13 | 4.083 | 3.184 | 2.38e-5 | 0.1079572 | 3.623344 |
| GO:0019693 | ribose phosphate metabolic process | 360 | 13 | 4.164 | 3.122 | 2.878e-5 | 0.1079572 | 3.540895 |
| GO:0042775 | mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport | 51 | 5 | 0.590 | 8.476 | 2.984e-5 | 0.1079572 | 3.525171 |
| GO:0015980 | energy derivation by oxidation of organic compounds | 187 | 9 | 2.163 | 4.161 | 3.281e-5 | 0.1079572 | 3.483949 |
| GO:0042274 | ribosomal small subunit biogenesis | 53 | 5 | 0.613 | 8.156 | 3.578e-5 | 0.1079572 | 3.446315 |
| GO:0051656 | establishment of organelle localization | 325 | 12 | 3.759 | 3.192 | 4.043e-5 | 0.1079572 | 3.393266 |
| GO:0010629 | negative regulation of gene expression | 1108 | 26 | 12.830 | 2.029 | 4.207e-5 | 0.1079572 | 3.376063 |

Literaturverzeichnis

- Aarts, A. A., Anderson, J. E., Anderson, C. J., Attridge, P. R., Attwood, A., Axt, J., Babel, M., Bahník, Š., Baranski, E., Barnett-Cowan, M., Bartmess, E., Beer, J., Bell, R., Bentley, H., Beyan, L., Binion, G., Borsboom, D., Bosch, A., Bosco, F. A., ... Zuni, K. (2015). Estimating the reproducibility of psychological science. *Science*, 349(6251). <https://doi.org/10.1126/science.aac4716>
- Agus, F., Crespo, D., Myers, R. H., & Labadorf, A. (2019). The caudate nucleus undergoes dramatic and unique transcriptional changes in human prodromal Huntington's disease brain. *BMC Medical Genomics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0581-9>
- Althouse, A. D. (2021). Post Hoc Power: Not Empowering, Just Misleading. In *Journal of Surgical Research* (Vol. 259, pp. A3–A6). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.10.049>
- Ament, S. A., Pearl, J. R., Cantle, J. P., Bragg, R. M., Skene, P. J., Coffey, S. R., Bergey, D. E., Wheeler, V. C., MacDonald, M. E., Baliga, N. S., Rosinski, J., Hood, L. E., Carroll, J. B., & Price, N. D. (2018). Transcriptional regulatory networks underlying gene expression changes in Huntington's disease. *Molecular Systems Biology*, 14(3). <https://doi.org/10.15252/msb.20167435>
- Andreollo, N. A., Santos, E. F. dos, Araújo, M. R., & Lopes, L. R. (2012). Rat's age versus human's age: what is the relationship? In *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery* (Vol. 25, Issue 1, pp. 49–51). Arq Bras Cir Dig. <https://doi.org/10.1590/s0102-67202012000100011>
- Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M. A., Graham, R. K., & Hayden, M. R. (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genetics*, 4(4), 398–403. <https://doi.org/10.1038/ng0893-398>
- Arning, L., Monté, D., Hansen, W., Wieczorek, S., Jagiello, P., Akkad, D. A., Andrich, J., Kraus, P. H., Saft, C., & Epplen, J. T. (2008). ASK1 and MAP2K6 as modifiers of age at onset in Huntington's disease. *Journal of Molecular Medicine*, 86(4), 485–490. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0299-6>
- Arrasate, M., & Finkbeiner, S. (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. In *Experimental Neurology* (Vol. 238, Issue 1, pp. 1–11). Exp Neurol. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.12.013>
- Aziz, N. A., Jurgens, C. K., Landwehrmeyer, G. B., Van Roon-Mom, W. M. C., Van Ommen, G. J. B., Stijnen, T., & Roos, R. A. C. (2009). Normal and mutant HTT interact to affect clinical severity and progression in Huntington disease. *Neurology*, 73(16), 1280–1285. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181bd1121>
- Aziz, N. Ahmad, Van Belzen, M. J., Coops, I. D., Belfroid, R. D. M., & Roos, R. A. C. (2011). Parent-of-origin differences of mutant HTT CAG repeat instability in Huntington's disease. *European Journal of Medical Genetics*, 54(4). <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2011.04.002>
- Baker, M. (2016). 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature*, 533(7604), 452–454. <https://doi.org/10.1038/533452a>
- Bardile, C. F., Garcia-Miralles, M., Caron, N. S., Rayan, N. A., Langley, S. R., Harmston, N., Rondelli, A. M., Yi Teo, R. T., Walzl, S., Anderson, L. M., Bae, H. G., Jung, S., Williams, A., Prabhakar, S., Petretto, E., Hayden, M. R., & Pouladi, M. A. (2019). Intrinsic mutant HTT-mediated defects in oligodendroglia cause myelination deficits and behavioral abnormalities in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(19), 9622–9627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818042116>

- Barnat, M., Capizzi, M., Aparicio, E., Boluda, S., Wennagel, D., Kacher, R., Kassem, R., Lenoir, S., Agasse, F., Bra, B. Y., Liu, J. P., Ighil, J., Tessier, A., Zeitli, S. O., Duyckaerts, C., Dommergues, M., Durr, A., & Humbert, S. (2020). Huntington's disease alters human neurodevelopment. *Science*, *369*(6505), 787–793. <https://doi.org/10.1126/science.aax3338>
- Barron, J. C., Hurley, E. P., & Parsons, M. P. (2021). Huntingtin and the Synapse. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 15, p. 689332). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.689332>
- Bartlett, D. M., Dominguez D, J. F., Lazar, A. S., Kordsachia, C. C., Rankin, T. J., Lo, J., Govus, A. D., Power, B. D., Lampit, A., Eastwood, P. R., Ziman, M. R., & Cruickshank, T. M. (2020). Multidisciplinary rehabilitation reduces hypothalamic grey matter volume loss in individuals with preclinical Huntington's disease: A nine-month pilot study. *Journal of the Neurological Sciences*, *408*. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.116522>
- Huntington disease, 1 *Nature Reviews Disease Primers* 15005 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>
- Becher, M. W., Kotzok, J. A., Sharp, A. H., Davies, S. W., Bates, G. P., Price, D. L., & Ross, C. A. (1998). Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: Correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. *Neurobiology of Disease*, *4*(6), 387–397. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1998.0168>
- Begley, C. G., & Ellis, L. M. (2012). Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature*, *483*(7391), 531–533. <https://doi.org/10.1038/483531a>
- Bjartmar, C., Yin, X., & Trapp, B. D. (1999). Axonal pathology in myelin disorders. *Journal of Neurocytology*, *28*(4–5), 383–395. <https://doi.org/10.1023/a:1007010205037>
- Boggs, J. M. (2006). Myelin basic protein: A multifunctional protein. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 63, Issue 17, pp. 1945–1961). Cell Mol Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6094-7>
- Bonapersona, V., Hoijsink, H., Abbinck, M., Baram, T. Z., Bolton, J. L., Bordes, J., Knop, J., Korosi, A., Krugers, H. J., Li, J. T., Naninck, E. F. G., Reemst, K., Ruigrok, S. R., Schmidt, M. V., Umeoka, E. H. L., Walker, C. D., Wang, X. D., Yam, K. Y., Sarabdjitsingh, R. A., & Joëls, M. (2021). Increasing the statistical power of animal experiments with historical control data. *Nature Neuroscience*, *24*(4), 470–477. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00792-3>
- Bonner-Jackson, A., Long, J. D., Westervelt, H., Tremont, G., Aylward, E., & Paulsen, J. S. (2013). Cognitive reserve and brain reserve in prodromal Huntington's disease. *Journal of the International Neuropsychological Society*, *19*(7), 739–750. <https://doi.org/10.1017/S1355617713000507>
- Bourbon-Teles, J., Bells, S., Jones, D. K., Coulthard, E., Rosser, A., & Metzler-Baddeley, C. (2019). Myelin Breakdown in Human Huntington's Disease: Multi-Modal Evidence from Diffusion MRI and Quantitative Magnetization Transfer. *Neuroscience*, *403*, 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.042>
- Buruma, O. J. S., Van der Kamp, W., Barendswaard, E. C., Roos, R. A. C., Kromhout, D., & Van der Velde, E. A. (1987). Which factors influence age at onset and rate of progression in Huntington's disease? *Journal of the Neurological Sciences*, *80*(2–3), 299–306. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(87\)90164-X](https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90164-X)
- Button, K. S., Ioannidis, J. P. A., Mokrysz, C., Nosek, B. A., Flint, J., Robinson, E. S. J., & Munafò, M. R. (2013). Power failure: Why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(5), 365–376. <https://doi.org/10.1038/nrn3475>
- Caldwell, C. C., Petzinger, G. M., Jakowec, M. W., & Cadenas, E. (2020). Treadmill exercise rescues mitochondrial function and motor behavior in the CAG140 knock-in mouse model

- of Huntington's disease. *Chemico-Biological Interactions*, 315. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108907>
- Camerer, C. F., Dreber, A., Holzmeister, F., Ho, T. H., Huber, J., Johannesson, M., Kirchler, M., Nave, G., Nosek, B. A., Pfeiffer, T., Altmejd, A., Buttrick, N., Chan, T., Chen, Y., Forsell, E., Gampa, A., Heikensten, E., Hummer, L., Imai, T., ... Wu, H. (2018). Evaluating the replicability of social science experiments in Nature and Science between 2010 and 2015. *Nature Human Behaviour*, 2(9), 637–644. <https://doi.org/10.1038/s41562-018-0399-z>
- Carter, C. S., Richardson, A., Huffman, D. M., & Austad, S. (2020). Bring Back the Rat! In *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* (Vol. 75, Issue 3, pp. 405–415). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz298>
- Casella, C., Lipp, I., Rosser, A., Jones, D. K., & Metzler-Baddeley, C. (2020). A Critical Review of White Matter Changes in Huntington's Disease. In *Movement Disorders* (Vol. 35, Issue 8, pp. 1302–1311). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mds.28109>
- Cepeda, C., Cummings, D. M., Hickey, M. A., Kleiman-Weiner, M., Chen, J., Watson, J. B., & Levine, M. S. (2010). Rescuing the corticostriatal synaptic disconnection in the R6/2 mouse model of Huntington's Disease: Exercise, adenosine receptors and ampakines. *PLoS Currents*, 2(SEP), RRN1182. <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1182>
- Cepeda, C., & Levine, M. S. (2022). Synaptic Dysfunction in Huntington's Disease: Lessons from Genetic Animal Models. In *Neuroscientist* (Vol. 28, Issue 1, pp. 20–40). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1073858420972662>
- Cha, J. H. J. (2007). Transcriptional signatures in Huntington's disease. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 83, Issue 4, pp. 228–248). Prog Neurobiol. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.03.004>
- Chao, T. K., Hu, J., & Pringsheim, T. (2017). Risk factors for the onset and progression of Huntington disease. *NeuroToxicology*, 61, 79–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.01.005>
- Chattopadhyay, B., Baksi, K., Mukhopadhyay, S., & Bhattacharyya, N. P. (2005). Modulation of age at onset of Huntington disease patients by variations in TP53 and human caspase activated DNase (hCAD) genes. *Neuroscience Letters*, 374(2), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.10.018>
- Cobo, E., Selva-O'Callaghan, A., Ribera, J.-M., Cardellach, F., Dominguez, R., & Vilardell, M. (2007). Statistical Reviewers Improve Reporting in Biomedical Articles: A Randomized Trial. *PLoS ONE*, 2(3), e332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000332>
- Craufurd, D., Thompson, J. C., & Snowden, J. S. (2001). Behavioral changes in Huntington disease. *Neuropsychiatry, Neuropsychology and Behavioral Neurology*, 14(4), 219–226. <https://europepmc.org/article/med/11725215>
- Cubo, E., Rivadeneyra, J., Armesto, D., Mariscal, N., Martinez, A., Camara, R. J., Martínez, D., Ramos, M. A., Pastor, B. V., Pérez, R., Burguera, J. A., Casterá, F., Robert, M. F., Ruiz, J. M., Pérez, J., Martínez-Horta, S., Muñoz, E., Durán, C., García, J. M., ... Gonzalez, K. B. (2015). Relationship between Nutritional Status and the Severity of Huntington's Disease. A Spanish Multicenter Dietary Intake Study. *Journal of Huntington's Disease*, 4(1), 75–85. <https://doi.org/10.3233/JHD-140139>
- Cuesta, M., Aungier, J., & Morton, A. J. (2014). Behavioral therapy reverses circadian deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 63, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.11.008>
- Curtin, P. C. P., Farrar, A. M., Oakeshott, S., Sutphen, J., Berger, J., Mazzella, M., Cox, K., He, D., Alosio, W., Park, L. C., Howland, D., & Brunner, D. (2016). Cognitive Training at a Young Age Attenuates Deficits in the zQ175 Mouse Model of HD. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 171627. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00361>
- Dauwan, M., Begemann, M. J. H., Slot, M. I. E., Lee, E. H. M., Scheltens, P., & Sommer, I. E.

- C. (2021). Physical exercise improves quality of life, depressive symptoms, and cognition across chronic brain disorders: a transdiagnostic systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. In *Journal of Neurology* (Vol. 268, Issue 4, pp. 1222–1246). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09493-9>
- Del Re, A. (2013). *compute.es: Compute Effect Sizes. R package version 0.2-2*.
- 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. *Science*, 277(5334), 1990–1993. <https://doi.org/10.1126/science.277.5334.1990>
- Djousse, L., Knowlton, B., Hayden, M. R., Almqvist, E. W., Brinkman, R. R., Ross, C. A., Margolis, R. L., Rosenblatt, A., Durr, A., Dode, C., Morrison, P. J., Novelletto, A., Frontali, M., Trent, R. J. A., McCusker, E., Gómez-Tortosa, E., Cabrero, D. M., Jones, R., Zanko, A., ... Myers, R. H. (2004). Evidence for a modifier of onset age in Huntington disease linked to the HD gene in 4p16. *Neurogenetics*, 5(2), 109–114. <https://doi.org/10.1007/s10048-004-0175-2>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Durinck, S., Moreau, Y., Kasprzyk, A., Davis, S., De Moor, B., Brazma, A., & Huber, W. (2005). BioMart and Bioconductor: A powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics*, 21(16), 3439–3440. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti525>
- Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E., & Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/ Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols*, 4(8), 1184–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97>
- Durrenberger, P. F., Fernando, F. S., Kashefi, S. N., Bonnert, T. P., Seilhean, D., Nait-Oumesmar, B., Schmitt, A., Gebicke-Haerter, P. J., Falkai, P., Grünblatt, E., Palkovits, M., Arzberger, T., Kretschmar, H., Dexter, D. T., & Reynolds, R. (2015). Common mechanisms in neurodegeneration and neuroinflammation: a BrainNet Europe gene expression microarray study. *Journal of Neural Transmission*, 122(7), 1055–1068. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1293-0>
- Ehrlich, M. E. (2012). Huntington's Disease and the Striatal Medium Spiny Neuron: Cell-Autonomous and Non-Cell-Autonomous Mechanisms of Disease. In *Neurotherapeutics* (Vol. 9, Issue 2, pp. 270–284). Neurotherapeutics. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0112-2>
- Ehrnhoefer, D. E., Sutton, L., & Hayden, M. R. (2011). Small changes, big impact: Posttranslational modifications and function of huntingtin in huntington disease. *Neuroscientist*, 17(5), 475–492. <https://doi.org/10.1177/1073858410390378>
- El-Daher, M., Hangen, E., Bruyère, J., Poizat, G., Al-Ramahi, I., Pardo, R., Bourg, N., Souquere, S., Mayet, C., Pierron, G., Lévêque-Fort, S., Botas, J., Humbert, S., & Saudou, F. (2015). Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation. *The EMBO Journal*, 34(17), 2255–2271. <https://doi.org/10.15252/emboj.201490808>
- Elias, S., Thion, M. S., Yu, H., Sousa, C. M., Lasgi, C., Morin, X., & Humbert, S. (2014). Huntingtin regulates mammary stem cell division and differentiation. *Stem Cell Reports*, 2(4), 491–506. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.02.011>
- Fisher, E. R., & Hayden, M. R. (2014). Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: Prevalence and population at risk. *Movement Disorders*, 29(1), 105–114. <https://doi.org/10.1002/mds.25717>
- Fisher, R. A. (1933). Statistical Methods for Research Workers. *Nature*, 131(3307), 383–383.

<https://doi.org/10.1038/131383b0>

- Folger, A., & Wang, Y. (2021). The cytotoxicity and clearance of mutant huntingtin and other misfolded proteins. In *Cells* (Vol. 10, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10112835>
- Fritz, N. E., Rao, A. K., Kegelmeyer, D., Kloos, A., Busse, M., Hartel, L., Carrier, J., & Quinn, L. (2017). Physical Therapy and Exercise Interventions in Huntington's Disease: A Mixed Methods Systematic Review. *Journal of Huntington's Disease*, 6(3), 217–235. <https://doi.org/10.3233/JHD-170260>
- Frommlet, F. (2020). Improving reproducibility in animal research. In *Scientific Reports* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–2). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76398-3>
- Fruttiger, M., Montag, D., Schachner, M., & Martini, R. (1995). Crucial Role for the Myelin-associated Glycoprotein in the Maintenance of Axon-Myelin Integrity. *European Journal of Neuroscience*, 7(3), 511–515. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00347.x>
- Fusilli, C., Migliore, S., Mazza, T., Consoli, F., De Luca, A., Barbagallo, G., Ciammola, A., Gatto, E. M., Cesarini, M., Etcheverry, J. L., Parisi, V., Al-Oraimi, M., Al-Harrasi, S., Al-Salmi, Q., Marano, M., Vonsattel, J. P. G., Sabatini, U., Landwehrmeyer, G. B., & Squitieri, F. (2018). Biological and clinical manifestations of juvenile Huntington's disease: a retrospective analysis. *The Lancet Neurology*, 17(11), 986–993. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30294-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30294-1)
- Garcia-Gorro, C., Garau-Rolandi, M., Escrichs, A., Rodriguez-Dechicha, N., Vaquer, I., Subira, S., Calopa, M., Martinez-Horta, S., Perez-Perez, J., Kulisevsky, J., Muñoz, E., Santacruz, P., Ruiz-Idiago, J., Mareca, C., de Diego-Balaguer, R., & Camara, E. (2019). An active cognitive lifestyle as a potential neuroprotective factor in Huntington's disease. *Neuropsychologia*, 122, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2018.10.017>
- Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelières, F. P., De Mey, J., MacDonald, M. E., Leßmann, V., Humbert, S., & Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 118(1), 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.018>
- Godin, J. D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B. E. C., Dietrich, P., Volvert, M. L., Guillemot, F., Dragatsis, I., Bellaïche, Y., Saudou, F., Nguyen, L., & Humbert, S. (2010). Huntingtin Is Required for Mitotic Spindle Orientation and Mammalian Neurogenesis. *Neuron*, 67(3), 392–406. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.027>
- Goodman, S. N., & Berlin, J. A. (1994). The use of predicted confidence intervals when planning experiments and the misuse of power when interpreting results. *Annals of Internal Medicine*, 121(3), 200–206. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-121-3-199408010-00008>
- Gosselin, R. D. (2021). Insufficient transparency of statistical reporting in preclinical research: a scoping review. *Scientific Reports*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83006-5>
- Gray, M., Shirasaki, D. I., Cepeda, C., André, V. M., Wilburn, B., Lu, X. H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S. H., Sun, Y. E., Li, X. J., Levine, M. S., & Yang, X. W. (2008). Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *Journal of Neuroscience*, 28(24), 6182–6195. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0857-08.2008>
- Grosjean, P ; Ibanez, F. (2018). *pastecs: Package for Analysis of Space-Time Ecological Series. R package version 1.3.21.*
- Gusella, J. F., Macdonald, M. E., & Lee, J. M. (2014). Genetic modifiers of Huntington's disease. In *Movement Disorders* (Vol. 29, Issue 11, pp. 1359–1365). John Wiley and Sons

- Inc. <https://doi.org/10.1002/mds.26001>
- Hagemann, T. L., Boelens, W. C., Wawrousek, E. F., & Messing, A. (2009). Suppression of GFAP toxicity by α B-crystallin in mouse models of Alexander disease. *Human Molecular Genetics*, *18*(7), 1190–1199. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp013>
- Haines, V. L. (2010). The Ancient Rat. In *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice* (Vol. 13, Issue 1, pp. 95–105). Vet Clin North Am Exot Anim Pract. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2009.09.001>
- Halliday, G. M., McRitchie, D. A., Macdonald, V., Double, K. L., Trent, R. J., & McCusker, E. (1998). Regional specificity of brain atrophy in Huntington's disease. *Experimental Neurology*, *154*(2), 663–672. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6919>
- Han, Y., Yuan, M., Guo, Y. S., Shen, X. Y., Gao, Z. K., & Bi, X. (2022). The role of enriched environment in neural development and repair. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 16, p. 890666). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.890666>
- Haremake, T., Deglincerti, A., & Brivanlou, A. H. (2015). Huntingtin is required for ciliogenesis and neurogenesis during early *Xenopus* development. *Developmental Biology*, *408*(2), 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.07.013>
- Harrison, D. J., Busse, M., Openshaw, R., Rosser, A. E., Dunnett, S. B., & Brooks, S. P. (2013). Exercise attenuates neuropathology and has greater benefit on cognitive than motor deficits in the R6/1 Huntington's disease mouse model. *Experimental Neurology*, *248*, 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.07.014>
- Hayden, M. R., MacGregor, J. M., & Beighton, P. H. (1980). The prevalence of Huntington's chorea in South Africa. *South African Medical Journal*, *58*(5), 193–196. <https://europepmc.org/article/med/6447364>
- Hentrich, T., Koch, A., Weber, N., Kilzheimer, A., Maia, A., Burkhardt, S., Rall, K., Casadei, N., Kohlbacher, O., Riess, O., Schulze-Hentrich, J. M., & Brucker, S. Y. (2020). The Endometrial Transcription Landscape of MRKH Syndrome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.572281>
- Herbst, E. A. F., & Holloway, G. P. (2015). Exercise training normalizes mitochondrial respiratory capacity within the striatum of the R6/1 model of Huntington's disease. *Neuroscience*, *303*, 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.025>
- Hervás-Corpión, I., Guiretti, D., Alcaraz-Iborra, M., Olivares, R., Campos-Caro, A., Barco, Á., & Valor, L. M. (2018). Early alteration of epigenetic-related transcription in Huntington's disease mouse models. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28185-4>
- Hochberg, G. K. A., Ecroyd, H., Liu, C., Cox, D., Cascio, D., Sawaya, M. R., Collier, M. P., Stroud, J., Carver, J. A., Baldwin, A. J., Robinson, C. V., Eisenberg, D. S., Benesch, J. L. P., & Laganowsky, A. (2014). The structured core domain of α B-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(16), E1562-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322673111>
- Hockly, E., Cordery, P. M., Woodman, B., Mahal, A., Van Dellen, A., Blakemore, C., Lewis, C. M., Hannan, A. J., & Bates, G. P. (2002). Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. *Annals of Neurology*, *51*(2), 235–242. <https://doi.org/10.1002/ana.10094>
- Hodges, A., Strand, A. D., Aragaki, A. K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., Elliston, L. A., Hartog, C., Goldstein, D. R., Thu, D., Hollingsworth, Z. R., Collin, F., Synek, B., Holmans, P. A., Young, A. B., Wexler, N. S., Delorenzi, M., Kooperberg, C., Augood, S. J., ... Luthi-Carter, R. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Human Molecular Genetics*, *15*(6), 965–977. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl013>
- Hodgson, J. G., Agopyan, N., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Lepiane, F., Singaraja, R., Smith,

- D. J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., Jamot, L., Xiao-Jiang, L., Stevens, M. E., Rosemond, E., Roder, J. C., Phillips, A. G., Rubin, E. M., Hersch, S. M., & Hayden, M. R. (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*, *23*(1), 181–192. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80764-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80764-3)
- Hoening, J. M., & Heisey, D. M. (2001). The abuse of power: The pervasive fallacy of power calculations for data analysis. *American Statistician*, *55*(1), 19–24. <https://doi.org/10.1198/000313001300339897>
- Honrath, P., Dogan, I., Wudarczyk, O., Görlich, K. S., Votinov, M., Werner, C. J., Schumann, B., Overbeck, R. T., Schulz, J. B., Landwehrmeyer, B. G., Gur, R. E., Habel, U., & Retz, K. (2018). Risk factors of suicidal ideation in Huntington's disease: literature review and data from Enroll-HD. *Journal of Neurology*, *265*(11), 2548–2561. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9013-6>
- Horvath, S. (2011). Weighted Network Analysis. In *Weighted Network Analysis*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8819-5>
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. In *Biometrical Journal* (Vol. 50, Issue 3, pp. 346–363). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Howland, D., Ellederova, Z., Aronin, N., Fernau, D., Gallagher, J., Taylor, A., Hennebold, J., Weiss, A. R., Gray-Edwards, H., & McBride, J. (2020). Large animal models of huntington's disease: What we have learned and where we need to go next. In *Journal of Huntington's Disease* (Vol. 9, Issue 3, pp. 201–216). IOS Press BV. <https://doi.org/10.3233/JHD-200425>
- Huntington, G. (1872). On chorea. *Medical and Surgical Reporter of Philadelphia*, *26*, 317–321. <http://hdsa.org/wp-content/uploads/2017/08/On-Chorea.pdf>
- Ioannidis, J. P. A. (2005). Why Most Published Research Findings Are False. *PLoS Medicine*, *2*(8), e124. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020124>
- Jacobsen, J. C., Bawden, C. S., Rudiger, S. R., McLaughlan, C. J., Reid, S. J., Waldvogel, H. J., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., Walker, S. K., Kelly, J. M., Webb, G. C., Faull, R. L. M., Rees, M. I., & Snell, R. G. (2010). An ovine transgenic Huntington's disease model. *Human Molecular Genetics*, *19*(10), 1873–1882. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq063>
- Jeffreys, H. (1961). *Theory of Probability* (3rd ed.). Clarendon Press.
- Johnson, E. B., & Gregory, S. (2019). Huntington's disease: Brain imaging in Huntington's disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 165, pp. 321–369). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.04.004>
- Jones, S. R., Carley, S., & Harrison, M. (2003). An introduction to power and sample size estimation. In *Emergency Medicine Journal* (Vol. 20, Issue 5, pp. 453–458). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/emj.20.5.453>
- Jurcau, A. (2022). Molecular Pathophysiological Mechanisms in Huntington's Disease. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061432>
- Keryer, G., Pineda, J. R., Liot, G., Kim, J., Dietrich, P., Benstaali, C., Smith, K., Cordelières, F. P., Spassky, N., Ferrante, R. J., Dragatsis, I., & Saudou, F. (2011). Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCM1 pathway and is altered in Huntington disease. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(11), 4372–4382. <https://doi.org/10.1172/JCI57552>
- Kiebertz, K. (1996). Unified Huntington's disease rating scale: Reliability and consistency. *Movement Disorders*, *11*(2), 136–142. <https://doi.org/10.1002/mds.870110204>
- Killoran, A., Biglan, K. M., Jankovic, J., Eberly, S., Kayson, E., Oakes, D., Young, A. B., & Shoulson, I. (2013). Characterization of the Huntington intermediate CAG repeat expansion phenotype in PHAROS. *Neurology*, *80*(22), 2022–2027. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318294b304>
- Kilzheimer, A., Hentrich, T., Burkhardt, S., & Schulze-Hentrich, J. M. (2019). The Challenge

- and Opportunity to Diagnose Parkinson's Disease in Midlife. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01328>
- Kilzheimer, A., Hentrich, T., Rotermund, C., Kahle, P. J., & Schulze-Hentrich, J. M. (2023). Failure of diet-induced transcriptional adaptations in alpha-synuclein transgenic mice. *Human Molecular Genetics*, 32(3), 450–461. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac205>
- Kilzheimer, A., & Schulze-Hentrich, J. (2018). Schutzmechanismen der Gen-Umwelt-Achse in Morbus Parkinson. *BioSpektrum*, 24(6), 604–607. <https://doi.org/10.1007/s12268-018-0965-y>
- Kim, A., Lalonde, K., Truesdell, A., Welter, P. G., Brocardo, P. S., Rosenstock, T. R., & Gil-mohapel, J. (2021). New avenues for the treatment of huntington's disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22168363>
- Kim, Y.-M., Ji, E.-S., Kim, S.-H., Kim, T.-W., Ko, I.-G., Jin, J.-J., Kim, C.-J., Kim, T.-W., & Kim, D.-H. (2015). Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing hippocampal cell proliferation in quinolinic acid-induced Huntington's disease rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 11(1), 5–11. <https://doi.org/10.12965/jer.150182>
- Kinter, J., Lazzati, T., Schmid, D., Zeis, T., Erne, B., Lützelschwab, R., Steck, A. J., Pareyson, D., Peles, E., & Schaeren-Wiemers, N. (2013). An essential role of MAG in mediating axon-myelin attachment in Charcot-Marie-Tooth 1A disease. *Neurobiology of Disease*, 49(1), 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.08.009>
- Kraus, F., & Ryan, M. T. (2017). The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. In *Journal of Cell Science* (Vol. 130, Issue 18, pp. 2953–2960). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.199562>
- Kumar, A., Vaish, M., & Ratan, R. R. (2014). Transcriptional dysregulation in Huntington's disease: A failure of adaptive transcriptional homeostasis. In *Drug Discovery Today* (Vol. 19, Issue 7, pp. 956–962). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.016>
- Laiman, J., Lin, S. S., & Liu, Y. W. (2023). Dynamins in human diseases: differential requirement of dynamin activity in distinct tissues. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 81). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102174>
- Landwehrmeyer, G. B., McNeil, S. M., Dure, L. S., Ge, P., Aizawa, H., Huang, Q., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Bird, E. D., Bonilla, E., de Young, M., Avila-Gonzales, A. J., Wexler, N. S., DiFiglia, M., Gusella, J. F., MacDonald, M. E., Penney, J. B., Young, A. B., & Vonsattel, J. -P. (1995). Huntington's disease gene: Regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals. *Annals of Neurology*, 37(2), 218–230. <https://doi.org/10.1002/ana.410370213>
- Langfelder, P., Cantle, J. P., Chatzopoulou, D., Wang, N., Gao, F., Al-Ramahi, I., Lu, X. H., Ramos, E. M., El-Zein, K., Zhao, Y., Deverasetty, S., Tebbe, A., Schaab, C., Lavery, D. J., Howland, D., Kwak, S., Botas, J., Aaronson, J. S., Rosinski, J., ... Yang, X. W. (2016). Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nature Neuroscience*, 19(4), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nn.4256>
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 559. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2012). Fast R functions for robust correlations and hierarchical clustering. *Journal of Statistical Software*, 46(11), 1–17. <https://doi.org/10.18637/jss.v046.i11>
- Langfelder, P., Luo, R., Oldham, M. C., & Horvath, S. (2011). Is My Network Module Preserved and Reproducible? *PLoS Computational Biology*, 7(1), e1001057. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001057>
- Langfelder, P., Mischel, P. S., & Horvath, S. (2013). When Is Hub Gene Selection Better than Standard Meta-Analysis? *PLoS ONE*, 8(4), e61505.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061505>
- Langfelder, P., Zhang, B., & Horvath, S. (2008). Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R. *Bioinformatics*, *24*(5), 719–720. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm563>
- Lazic, S. E., Grote, H. E., Blakemore, C., Hannan, A. J., Van Dellen, A., Phillips, W., & Barker, R. A. (2006). Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington’s disease: Effects of environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, *23*(7), 1829–1838. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04715.x>
- Lee, J. M., Ramos, E. M., Lee, J. H., Gillis, T., Mysore, J. S., Hayden, M. R., Warby, S. C., Morrison, P., Nance, M., Ross, C. A., Margolis, R. L., Squitieri, F., Orobello, S., Di Donato, S., Gomez-Tortosa, E., Ayuso, C., Suchowersky, O., Trent, R. J. A., McCusker, E., ... Gusella, J. F. (2012). CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology*, *78*(10), 690–695. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318249f683>
- Lee, Jong Min, Wheeler, V. C., Chao, M. J., Vonsattel, J. P. G., Pinto, R. M., Lucente, D., Abu-Elneel, K., Ramos, E. M., Mysore, J. S., Gillis, T., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., Harold, D., Stone, T. C., Escott-Price, V., Han, J., Vedernikov, A., Holmans, P., Jones, L., ... Myers, R. H. (2015). Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington’s Disease. *Cell*, *162*(3), 516–526. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.003>
- Leek, J.T.; Johnson, W. E.; Parker, H.S.; Fertig, E.J.; Jaffe, A.E.; Storey, J.D.; Zhang, Y.; Torres, L. C. (2019). *sva: Surrogate Variable Analysis. R package version 3.30.1*.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, J. Y., Popovic, N., & Brundin, P. (2005). The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington’s disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx*, *2*(3), 447–464. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.3.447>
- Li, S. H., Schilling, G., Young, W. S., Li, X., Margolis, R. L., Stine, O. C., Wagster, M. V., Abbott, M. H., Franz, M. L., Ranen, N. G., Folstein, S. E., Hedreen, J. C., & Ross, C. A. (1993). Huntington’s disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron*, *11*(5), 985–993. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90127-D](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90127-D)
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E. J., Shi, Z., & Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W199–W205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz401>
- Lin, C. H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W. M., Cearley, J. A., Jackson, W. S., Crouse, A. B., Ren, S., Li, X. J., Albin, R. L., & Detloff, P. J. (2001). Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington’s disease. *Human Molecular Genetics*, *10*(2), 137–144. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.2.137>
- Lontay, B., Kiss, A., Virág, L., & Tar, K. (2020). How do post-translational modifications influence the pathomechanistic landscape of Huntington’s disease? A comprehensive review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 12, pp. 1–34). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21124282>
- López-Sendón, J. L., Royuela, A., Trigo, P., Orth, M., Lange, H., Reilmann, R., Keylock, J., Rickards, H., Piacentini, S., Squitieri, F., Landwehrmeyer, B., Witjes-Ane, M. N., Jurgens, C. K., Roos, R. A. C., Abraira, V., & de Yébenes, J. G. (2011). What is the impact of education on Huntington’s disease? *Movement Disorders*, *26*(8), 1489–1495. <https://doi.org/10.1002/mds.23385>
- Lossos, A., Elazar, N., Lerer, I., Schueler-Furman, O., Fellig, Y., Glick, B., Zimmerman, B. El, Azulay, H., Dotan, S., Goldberg, S., Gomori, J. M., Ponger, P., Newman, J. P., Marreed, H., Steck, A. J., Schaeren-Wiemers, N., Mor, N., Harel, M., Geiger, T., ... Peles, E. (2015). Myelin-associated glycoprotein gene mutation causes Pelizaeus-Merzbacher disease-like

- disorder. *Brain*, 138(9), 2521–2536. <https://doi.org/10.1093/brain/awv204>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, S. Z., Guo, Y. S., Liang, P. Z., Zhang, S. Z., Yin, S., Yin, Y. Q., Wang, X. M., Ding, F., Gu, X. S., & Zhou, J. W. (2019). Suppression of astrocytic autophagy by α -crystallin contributes to α -synuclein inclusion formation. *Translational Neurodegeneration*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40035-018-0143-7>
- MacDonald, M. E., Vonsattel, J. P., Shrinidhi, J., Couropmitree, N. N., Cupples, L. A., Bird, E. D., Gusella, J. F., & Myers, R. H. (1999). Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology*, 53(6), 1330–1332. <https://doi.org/10.1212/wnl.53.6.1330>
- MacDonald, Marcy E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes, G., Taylor, S. A., James, M., Groot, N., MacFarlane, H., Jenkins, B., Anderson, M. A., Wexler, N. S., Gusella, J. F., Bates, G. P., Baxendale, S., Hummerich, H., Kirby, S., ... Harper, P. S. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 72(6), 971–983. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90585-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-e)
- Macleod, M., & Mohan, S. (2019). Reproducibility and Rigor in Animal-Based Research. *ILAR Journal*, 60(1), 17–23. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilz015>
- Maiuri, T., Mocle, A. J., Hung, C. L., Xia, J., van Roon-Mom, W. M. C., & Truant, R. (2017). Huntingtin is a scaffolding protein in the ATM oxidative DNA damage response complex. *Human Molecular Genetics*, 26(2), 395–406. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw395>
- Manfré, G., Clemensson, E. K. H., Kyriakou, E. I., Clemensson, L. E., Van Der Harst, J. E., Homberg, J. R., & Nguyen, H. P. (2017). The BACHD rat model of huntington disease shows specific deficits in a test battery of motor function. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00218>
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S. W., & Bates, G. P. (1996). Exon I of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87(3), 493–506. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81369-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81369-0)
- Manor, Y., Oestreicher-Kedem, Y., Gad, A., Zitser, J., Faust-Socher, A., Shpant, D., Naor, S., Inbar, N., Kestenbaum, M., Giladi, N., & Gurevich, T. (2019). Dysphagia characteristics in Huntington's disease patients: Insights from the Fiberoptic Endoscopic Evaluation of Swallowing and the Swallowing Disturbances Questionnaire. *CNS Spectrums*, 24(4), 413–418. <https://doi.org/10.1017/S1092852918001037>
- Marder, K., Zhao, H., Eberly, S., Tanner, C. M., Oakes, D., & Shoulson, I. (2009). Dietary intake in adults at risk for Huntington disease: Analysis of PHAROS Research Participants. *Neurology*, 73(5), 385–392. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b04aa2>
- Marder, Karen, Gu, Y., Eberly, S., Tanner, C. M., Scarmeas, N., Oakes, D., & Shoulson, I. (2013). Relationship of Mediterranean diet and caloric intake to phenoconversion in Huntington disease. *JAMA Neurology*, 70(11), 1382–1388. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.3487>
- Marques Sousa, C., & Humbert, S. (2013). Huntingtin: Here, there, everywhere! *Journal of Huntington's Disease*, 2(4), 395–403. <https://doi.org/10.3233/JHD-130082>
- Martin, D. D. O., Kay, C., Collins, J. A., Nguyen, Y. T., Slama, R. A., & Hayden, M. R. (2018). A human huntingtin SNP alters post-Translational modification and pathogenic proteolysis of the protein causing Huntington disease. *Scientific Reports*, 8(1), 1–8.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25903-w>

- Martínez-Horta, S., Moreu, A., Perez-Perez, J., Sampredo, F., Horta-Barba, A., Pagonabarraga, J., Gomez-Anson, B., Lozano-Martinez, G. A., Lopez-Mora, D. A., Camacho, V., Fernández-León, A., Carrió, I., & Kulisevsky, J. (2019). The impact of bilingualism on brain structure and function in Huntington's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, *60*, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.09.017>
- Mazarakis, N. K., Mo, C., Renoir, T., Van Dellen, A., Deacon, R., Blakemore, C., & Hannan, A. J. (2014). “Super-Enrichment” reveals dose-dependent therapeutic effects of environmental stimulation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Journal of Huntington's Disease*, *3*(3), 299–309. <https://doi.org/10.3233/JHD-140118>
- Huntington's disease: a clinical review, 25 *European Journal of Neurology* 24 (2018). <https://doi.org/10.1111/ene.13413>
- McLaren, B., Drummond, S. P. A., Glikmann-Johnston, Y., Loy, C., Bellgrove, M. A., Stout, J. C., & Andrews, S. C. (2021). Greater Time in Bed and Less Physical Activity Associate With Poorer Cognitive Functioning Performance in Huntington's Disease. *Neuropsychology*, *35*(6), 656–667. <https://doi.org/10.1037/neu0000757>
- McNutt, M. (2014). Journals unite for reproducibility. *Science*, *346*(6210), 679–679. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1724>
- Mo, C., Hannan, A. J., & Renoir, T. (2015). Environmental factors as modulators of neurodegeneration: Insights from gene-environment interactions in Huntington's disease. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 52, pp. 178–192). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.03.003>
- Mochel, F., & Haller, R. G. (2011). Energy deficit in Huntington disease: Why it matters. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 121, Issue 2, pp. 493–499). J Clin Invest. <https://doi.org/10.1172/JCI45691>
- Moss, D. J. H., Tabrizi, S. J., Mead, S., Lo, K., Pardiñas, A. F., Holmans, P., Jones, L., Langbehn, D., Coleman, A., Santos, R. D., Decolongo, J., Sturrock, A., Bardinet, E., Ret, C. J., Justo, D., Lehericy, S., Marelli, C., Nigaud, K., Valabrègue, R., ... Tan, L. (2017). Identification of genetic variants associated with Huntington's disease progression: a genome-wide association study. *The Lancet Neurology*, *16*(9), 701–711. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30161-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30161-8)
- Mueller, S. M., Petersen, J. A., & Jung, H. H. (2019). Exercise in Huntington's Disease: Current State and Clinical Significance. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements (New York, N.Y.)*, *9*, 601. <https://doi.org/10.7916/tm9j-f874>
- Munafò, M. R., Nosek, B. A., Bishop, D. V. M., Button, K. S., Chambers, C. D., Percie Du Sert, N., Simonsohn, U., Wagenmakers, E. J., Ware, J. J., & Ioannidis, J. P. A. (2017). A manifesto for reproducible science. In *Nature Human Behaviour* (Vol. 1, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41562-016-0021>
- Nguyen, H. H. P., & Weydt, P. (2018). Huntington disease. In *Medizinische Genetik* (Vol. 30, Issue 2, pp. 246–251). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11825-018-0190-6>
- Nithianantharajah, J., Barkus, C., Murphy, M., & Hannan, A. J. (2008). Gene-environment interactions modulating cognitive function and molecular correlates of synaptic plasticity in Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, *29*(3), 490–504. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.11.006>
- Nithianantharajah, J., Barkus, C., Vijjaratnam, N., Clement, O., & Hannan, A. J. (2009). Modeling brain reserve: Experience-dependent neuronal plasticity in healthy and huntington^{tg} mice transgenic mice. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, *17*(3), 196–209. <https://doi.org/10.1097/JGP.0b013e318196a632>
- Novati, A., Hentrich, T., Wassouf, Z., Weber, J. J., Yu-Taeger, L., Déglon, N., Nguyen, H. P., & Schulze-Hentrich, J. M. (2018). Environment-dependent striatal gene expression in the BACHD rat model for Huntington disease. *Scientific Reports*, *8*(1).

- <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24243-z>
- Novati, A., Manfré, G., Flunkert, S., Van der Harst, J. E., Homberg, J. R., Wronski, R., & Nguyen, H. P. (2020). Validation of behavioral phenotypes in the BACHD rat model. *Behavioural Brain Research*, 393. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112783>
- Novati, A., Nguyen, H. P., & Schulze-Hentrich, J. (2022). Environmental stimulation in Huntington disease patients and animal models. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 171). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105725>
- Oliveira, A. O., Osmand, A., Outeiro, T. F., Muchowski, P. J., & Finkbeiner, S. (2016). α B-Crystallin overexpression in astrocytes modulates the phenotype of the BACHD mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 25(9), 1677–1689. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw028>
- P.leeflang, E., Zhang, L., Tavare, S., Hubert, R., Srinidhi, J., E.Macdonald, M., H.Myers, R., Young, M. De, S.Wexler, N., F.Gusella, J., & Arnheim, N. (1995). Single sperm analysis of the trinucleotide repeats in the huntington's disease gene: Quantification of the mutation frequency spectrum. *Human Molecular Genetics*, 4(9), 1519–1526. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.9.1519>
- Paine, H. (2015). Does loss of the normal protein function contribute to the pathogenesis of Huntington's disease? *Bioscience Horizons*, 8, hzv005. <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzv005>
- Pan, B., Fromholt, S. E., Hess, E. J., Crawford, T. O., Griffin, J. W., Sheikh, K. A., & Schnaar, R. L. (2005). Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: Neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Experimental Neurology*, 195(1), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.04.017>
- Panegyres, P. K., Shu, C. C., Chen, H. Y., & Paulsen, J. S. (2015). Factors influencing the clinical expression of intermediate CAG repeat length mutations of the Huntington's disease gene. *Journal of Neurology*, 262(2), 277–284. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7559-5>
- Pang, T. Y.C., Stam, N. C., Nithianantharajah, J., Howard, M. L., & Hannan, A. J. (2006). Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience*, 141(2), 569–584. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.013>
- Pang, Terence Y.C., Du, X., Zajac, M. S., Howard, M. L., & Hannan, A. J. (2009). Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 18(4), 753–766. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn385>
- Papoutsis, M., Flower, M., Hensman Moss, D. J., Holmans, P., Estevez-Fraga, C., Johnson, E. B., Scahill, R. I., Rees, G., Langbehn, D., Tabrizi, S. J., Kraus, P., Hoffman, R., Tobin, A., Borowsky, B., Keenan, S., Whitlock, K. B., Queller, S., Campbell, C., Wang, C., ... Landwehrmeyer, B. (2022). Intellectual enrichment and genetic modifiers of cognition and brain volume in Huntington's disease. *Brain Communications*, 4(6). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac279>
- Papoutsis, M., Labuschagne, I., Tabrizi, S. J., & Stout, J. C. (2014). The cognitive burden in Huntington's disease: Pathology, phenotype, and mechanisms of compensation. In *Movement Disorders* (Vol. 29, Issue 5, pp. 673–683). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mds.25864>
- Paulsen, J. S., Long, J. D., Ross, C. A., Harrington, D. L., Erwin, C. J., Williams, J. K., Westervelt, H. J., Johnson, H. J., Aylward, E. H., Zhang, Y., Bockholt, H. J., & Barker, R. A. (2014). Prediction of manifest huntington's disease with clinical and imaging measures: A prospective observational study. *The Lancet Neurology*, 13(12), 1193–1201. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70238-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70238-8)

- Persichetti, F., Ambrose, C. M., Ge, P., McNeil, S. M., Srinidhi, J., Anderson, M. A., Jenkins, B., Barnes, G. T., Duyao, M. P., Kanaley, L., Wexler, N. S., Myers, R. H., Bird, E. D., Vonsattel, J. P., MacDonald, M. E., & Gusella, J. F. (1995). Normal and Expanded Huntington's Disease Gene Alleles Produce Distinguishable Proteins Due to Translation Across the CAG Repeat. *Molecular Medicine*, *1*(4), 374–383. <https://doi.org/10.1007/BF03401575>
- Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M., & Finch, J. T. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: Their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(12), 5355–5358. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5355>
- Piira, A., van Walsem, M. R., Mikalsen, G., Nilsen, K. H., Knutsen, S., & Frich, J. C. (2013). Effects of a One Year Intensive Multidisciplinary Rehabilitation Program for Patients with Huntington's Disease: A Prospective Intervention Study. *PLoS Currents*, *5*(SEP), ecurrents.hd.9504af71e0d1f87830c25c394be47027. <https://doi.org/10.1371/currents.hd.9504af71e0d1f87830c25c394be47027>
- Pizzorni, N., Pirola, F., Ciammola, A., & Schindler, A. (2020). Management of dysphagia in Huntington's disease: a descriptive review. In *Neurological Sciences* (Vol. 41, Issue 6, pp. 1405–1417). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04265-0>
- Plotkin, J. L., & Surmeier, D. J. (2015). Corticostriatal synaptic adaptations in Huntington's disease. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 33, pp. 53–62). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.020>
- Prinz, F., Schlange, T., & Asadullah, K. (2011). Believe it or not: How much can we rely on published data on potential drug targets? In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 10, Issue 9, pp. 712–713). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd3439-c1>
- Puri, C., Manni, M. M., Vicinanza, M., Hilcenko, C., Zhu, Y., Runwal, G., Stamatakou, E., Menzies, F. M., Mamchaoui, K., Bitoun, M., & Rubinsztein, D. C. (2020). A DNMT2 Centronuclear Myopathy Mutation Reveals a Link between Recycling Endosome Scission and Autophagy. *Developmental Cell*, *53*(2), 154–168.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.03.018>
- Quarles, R. H. (2007). Myelin-associated glycoprotein (MAG): Past, present and beyond. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 100, Issue 6, pp. 1431–1448). J Neurochem. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04319.x>
- Quinn, L., Playle, R., Drew, C. J. G., Taiyari, K., Williams-Thomas, R., Muratori, L. M., Hamana, K., Griffin, B. A., Kelson, M., Schubert, R., Friel, C., Morgan-Jones, P., Rosser, A., Busse, M., Montojo, T., Ruiz Idiago, J. M., Hershberg, J., Marder, K., Bordelon, Y., ... Landwehrmeyer, B. (2022). Physical activity and exercise outcomes in Huntington's disease (PACE-HD): results of a 12-month trial-within-cohort feasibility study of a physical activity intervention in people with Huntington's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, *101*, 75–89. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2022.06.013>
- Quinn, R. (2005). Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? In *Nutrition* (Vol. 21, Issue 6, pp. 775–777). Nutrition. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.04.002>
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Article 3.5.1. <https://www.r-project.org/>
- Raasakka, A., Ruskamo, S., Kowal, J., Barker, R., Baumann, A., Martel, A., Tuusa, J., Myllykoski, M., Bürck, J., Ulrich, A. S., Stahlberg, H., & Kursula, P. (2017). Membrane Association Landscape of Myelin Basic Protein Portrays Formation of the Myelin Major Dense Line. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05364-3>
- Ranen, N. G., Stine, O. C., Abbott, M. H., Sherr, M., Codori, A. M., Franz, M. L., Chao, N. I., Chung, A. S., Pleasant, N., Callahan, C., Kasch, L. M., Ghaffari, M., Chase, G. A., Kazazian, H. H., Brandt, J., Folstein, S. E., & Ross, C. A. (1995). Anticipation and

- instability of IT-15 (CAG)_N repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *American Journal of Human Genetics*, 57(3), 593–602. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1801258/>
- Ransome, M. I., & Hannan, A. J. (2013). Impaired basal and running-induced hippocampal neurogenesis coincides with reduced Akt signaling in adult R6/1 HD mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 54, 93–107. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.01.005>
- Ransome, M. I., Renoir, T., & Hannan, A. J. (2012). Hippocampal Neurogenesis, Cognitive Deficits and Affective Disorder in Huntington's Disease. *Neural Plasticity*, 2012(1), 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/874387>
- Raymond, L. A. (2017). Striatal synaptic dysfunction and altered calcium regulation in Huntington disease. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 483, Issue 4, pp. 1051–1062). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.058>
- Reed, W. R. (2018). A Primer on the 'Reproducibility Crisis' and Ways to Fix It. *Australian Economic Review*, 51(2), 286–300. <https://doi.org/10.1111/1467-8462.12262>
- Reimand, J; Kolde, R; Arak, T. (2019). *gProfileR: Interface to the "g:Profiler" Toolkit. R package version 0.7.0*. <https://cran.r-project.org/package=gProfileR>
- Renoir, T., Pang, T. Y. C., Mo, C., Chan, G., Chevarin, C., Lanfumey, L., & Hannan, A. J. (2013). Differential effects of early environmental enrichment on emotionality related behaviours in Huntington's disease transgenic mice. *Journal of Physiology*, 591(1), 41–55. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.239798>
- Renoir, T., Pang, T. Y. C., Zajac, M. S., Chan, G., Du, X., Leang, L., Chevarin, C., Lanfumey, L., & Hannan, A. J. (2012). Treatment of depressive-like behaviour in Huntington's disease mice by chronic sertraline and exercise. *British Journal of Pharmacology*, 165(5), 1375–1389. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01567.x>
- Ridley, R. M., Frith, C. D., Crow, T. J., & Conneally, P. M. (1988). Anticipation in Huntington's disease is inherited through the male line but may originate in the female. *Journal of Medical Genetics*, 25(9), 589–595. <https://doi.org/10.1136/jmg.25.9.589>
- Rivadeneira, J., Cubo, E., Gil, C., Calvo, S., Mariscal, N., & Martínez, A. (2016). Factors associated with Mediterranean diet adherence in Huntington's disease. *Clinical Nutrition ESPEN*, 12, e7–e13. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2016.01.001>
- Robinson, N. B., Krieger, K., Khan, F., Huffman, W., Chang, M., Naik, A., Yongle, R., Hameed, I., Krieger, K., Girardi, L. N., & Gaudino, M. (2019). The current state of animal models in research: A review. *International Journal of Surgery*, 72, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2019.10.015>
- Robison, L. S., Francis, N., Popescu, D. L., Anderson, M. E., Hatfield, J., Xu, F., Anderson, B. J., Van Nostrand, W. E., & Robinson, J. K. (2020). Environmental enrichment: Disentangling the influence of novelty, social, and physical activity on cerebral amyloid angiopathy in a transgenic mouse model. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030843>
- Rodrigues, F. B., Abreu, D., Damásio, J., Goncalves, N., Correia-Guedes, L., Coelho, M., & Ferreira, J. J. (2017). Survival, Mortality, Causes and Places of Death in a European Huntington's Disease Prospective Cohort. *Movement Disorders Clinical Practice*, 4(5), 737–742. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12502>
- Ross, C. A., Aylward, E. H., Wild, E. J., Langbehn, D. R., Long, J. D., Warner, J. H., Scahill, R. I., Leavitt, B. R., Stout, J. C., Paulsen, J. S., Reilmann, R., Unschuld, P. G., Wexler, A., Margolis, R. L., & Tabrizi, S. J. (2014). Huntington disease: Natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 10, Issue 4, pp. 204–216). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.24>
- Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. In *The Lancet Neurology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 83–98). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70245-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3)

- Rüb, U., Seidel, K., Heinsen, H., Vonsattel, J. P., den Dunnen, W. F., & Korf, H. W. (2016). Huntington's disease (HD): the neuropathology of a multisystem neurodegenerative disorder of the human brain. *Brain Pathology*, 26(6), 726–740. <https://doi.org/10.1111/bpa.12426>
- Rubinsztein, D. C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J. J., Chotai, K., Connarty, M., Crauford, D., Curtis, A., Curtis, D., Davidson, M. J., Differ, A. M., Dode, C., Dodge, A., Frontali, M., Ranen, N. G., Stine, O. C., Sherr, M. R. (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 - PubMed. *American Journal of Human Genetics*, 59(1), 16–22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8659522/>
- Saft, C. [et al.]. (2022). *S2k-Leitlinie Chorea/Morbus Huntington*. <https://dgn.org/leitlinie/chorea-morbus-huntington>
- Sanberg, P. R., Calderon, S. F., Giordano, M., Tew, J. M., & Norman, A. B. (1989). The quinolinic acid model of Huntington's disease: Locomotor abnormalities. *Experimental Neurology*, 105(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(89\)90170-2](https://doi.org/10.1016/0014-4886(89)90170-2)
- Sapp, E., Schwarz, C., Chase, K., Bhide, P. G., Young, A. B., Penney, J., Vonsattel, J. P., Aronin, N., & DiFiglia, M. (1997). Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Annals of Neurology*, 42(4), 604–612. <https://doi.org/10.1002/ana.410420411>
- Sathasivam, K., Neueder, A., Gipson, T. A., Landles, C., Benjamin, A. C., Bondulich, M. K., Smith, D. L., Faull, R. L. M., Roos, R. A. C., Howland, D., Detloff, P. J., Housman, D. E., & Bates, G. P. (2013). Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), 2366–2370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221891110>
- Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. In *Neuron* (Vol. 89, Issue 5, pp. 910–926). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>
- Savitt, D., & Jankovic, J. (2019). Clinical phenotype in carriers of intermediate alleles in the huntingtin gene. *Journal of the Neurological Sciences*, 402, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.05.010>
- Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G. P., Lehrach, H., & Wanker, E. E. (1999). Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: Implications for Huntington's disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4604–4609. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4604>
- Schultz, J. L., Kamholz, J. A., Moser, D. J., Feely, S. M. E., Paulsen, J. S., & Nopoulos, P. C. (2017). Substance abuse may hasten motor onset of Huntington disease: Evaluating the Enroll-HD database. *Neurology*, 88(9), 909–915. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003661>
- Schwarz, M. (2020). *Chorea* (pp. 1371–1380). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-60676-6_135
- Seefelder, M., Klein, F. A. C., Landwehrmeyer, B., Fernández-Busnadiego, R., & Kochanek, S. (2022). Huntingtin and Its Partner Huntingtin-Associated Protein 40: Structural and Functional Considerations in Health and Disease. In *Journal of Huntington's Disease* (Vol. 11, Issue 3, pp. 227–242). IOS Press BV. <https://doi.org/10.3233/JHD-220543>
- Semaka, A., Collins, J. A., & Hayden, M. R. (2010). Unstable familial transmissions of huntington disease alleles with 27-35 CAG repeats (intermediate alleles). *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 153(1), 314–320. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30970>
- Semaka, A., & Hayden, M. R. (2014). Evidence-based genetic counselling implications for Huntington disease intermediate allele predictive test results. *Clinical Genetics*, 85(4),

- 303–311. <https://doi.org/10.1111/cge.12324>
- Sengupta, P. (2015). *A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age?*
- Sengupta, Pallav. (2013). The laboratory rat: Relating its age with human's. In *International Journal of Preventive Medicine* (Vol. 4, Issue 6, pp. 624–630). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3733029/>
- Seredenina, T., & Luthi-Carter, R. (2012). What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? In *Neurobiology of Disease* (Vol. 45, Issue 1, pp. 83–98). *Neurobiol Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.07.001>
- Simonin, C., Duru, C., Salleron, J., Hincker, P., Charles, P., Delval, A., Youssov, K., Burnouf, S., Azulay, J. P., Verny, C., Scherer, C., Tranchant, C., Goizet, C., Debruxelles, S., Defebvre, L., Sablonnière, B., Romon-Rousseaux, M., Buée, L., Destée, A., ... Krystkowiak, P. (2013). Association between caffeine intake and age at onset in huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 58, 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.05.013>
- Singh, V. P., Pratap, K., Sinha, J., Desiraju, K., Bahal, D., & Kukreti, R. (2016). Critical evaluation of challenges and future use of animals in experimentation for biomedical research. In *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* (Vol. 29, Issue 4, pp. 551–561). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/0394632016671728>
- Skillings, E. A., Wood, N. I., & Morton, A. J. (2014). Beneficial effects of environmental enrichment and food entrainment in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain and Behavior*, 4(5), 675–686. <https://doi.org/10.1002/brb3.235>
- Smith-Dijak, A. I., Sepers, M. D., & Raymond, L. A. (2019). Alterations in synaptic function and plasticity in Huntington disease. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 150, Issue 4, pp. 346–365). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.14723>
- Snowden, J. S. (2017). The Neuropsychology of Huntington's Disease. In *Archives of Clinical Neuropsychology* (Vol. 32, Issue 7, pp. 876–887). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/arclin/acx086>
- Soares, T. R., Reis, S. D., Pinho, B. R., Duchen, M. R., & Oliveira, J. M. A. (2019). Targeting the proteostasis network in Huntington's disease. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 49, pp. 92–103). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.11.006>
- Stefanko, D. P., Shah, V. D., Yamasaki, W. K., Petzinger, G. M., & Jakowec, M. W. (2017). Treadmill exercise delays the onset of non-motor behaviors and striatal pathology in the CAG140 knock-in mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 105, 15–32. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.05.004>
- Steventon, J. J., Harrison, D. J., Trueman, R. C., Rosser, A. E., Jones, D. K., & Brooks, S. P. (2015). In Vivo MRI Evidence that Neuropathology is Attenuated by Cognitive Enrichment in the Yac128 Huntington's Disease Mouse Model. *Journal of Huntington's Disease*, 4(2), 149–160. <https://doi.org/10.3233/JHD-150147>
- Stoker, T. B., Holden, S. T., & Barker, R. A. (2021). Late-onset Huntington's disease associated with CAG repeat lengths of 30 and 31. In *Journal of Neurology* (Vol. 268, Issue 10, pp. 3916–3919). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00415-021-10633-3>
- Stoker, T. B., Mason, S. L., Greenland, J. C., Holden, S. T., Santini, H., & Barker, R. A. (2022). Huntington's disease: diagnosis and management. In *Practical Neurology* (Vol. 22, Issue 1, pp. 32–41). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2021-003074>
- Stouffer, S. A., Suchman, E. A., Devinney, L. C., Star, S. A., & Williams Jr., R. M. (1949). The American soldier: Adjustment during army life. (Studies in social psychology in World War II), Vol. 1. In *The American soldier: Adjustment during army life. (Studies in social psychology in World War II), Vol. 1.* Scientific Research Publishing; NJ Princeton University Press. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=474181>

- Stout, J. C., Jones, R., Labuschagne, I., O'Regan, A. M., Say, M. J., Dumas, E. M., Queller, S., Justo, D., Dar Santos, R., Coleman, A., Hart, E. P., Dürr, A., Leavitt, B. R., Roos, R. A., Langbehn, D. R., Tabrizi, S. J., & Frost, C. (2012). Evaluation of longitudinal 12 and 24 month cognitive outcomes in premanifest and early Huntington's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *83*(7), 687–694. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2011-301940>
- Stricker-Shaver, J., Novati, A., Yu-Taeger, L., & Nguyen, H. P. (2018). Genetic rodent models of huntington disease. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1049, pp. 29–57). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_2
- Strong, T. V., Tagle, D. A., Valdes, J. M., Elmer, L. W., Boehm, K., Swaroop, M., Kaatz, K. W., Collins, F. S., & Albin, R. L. (1993). Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nature Genetics*, *5*(3), 259–265. <https://doi.org/10.1038/ng1193-259>
- Tabrizi, S. J., Ghosh, R., & Leavitt, B. R. (2019). Huntingtin Lowering Strategies for Disease Modification in Huntington's Disease. In *Neuron* (Vol. 101, Issue 5, pp. 801–819). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.039>
- Tabrizi, S. J., Langbehn, D. R., Leavitt, B. R., Roos, R. A., Durr, A., Craufurd, D., Kennard, C., Hicks, S. L., Fox, N. C., Scahill, R. I., Borowsky, B., Tobin, A. J., Rosas, H. D., Johnson, H., Reilmann, R., Landwehrmeyer, B., & Stout, J. C. (2009). Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *The Lancet Neurology*, *8*(9), 791–801. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70170-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70170-X)
- Tabrizi, S. J., Scahill, R. I., Durr, A., Roos, R. A. C., Leavitt, B. R., Jones, R., Landwehrmeyer, G. B., Fox, N. C., Johnson, H., Hicks, S. L., Kennard, C., Craufurd, D., Frost, C., Langbehn, D. R., Reilmann, R., & Stout, J. C. (2011). Biological and clinical changes in premanifest and early stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: The 12-month longitudinal analysis. *The Lancet Neurology*, *10*(1), 31–42. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70276-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70276-3)
- Tabrizi, S. J., Scahill, R. I., Owen, G., Durr, A., Leavitt, B. R., Roos, R. A., Borowsky, B., Landwehrmeyer, B., Frost, C., Johnson, H., Craufurd, D., Reilmann, R., Stout, J. C., & Langbehn, D. R. (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. *The Lancet Neurology*, *12*(7), 637–649. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70088-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70088-7)
- Taherzadeh-Fard, E., Saft, C., Andrich, J., Wiczorek, S., & Arning, L. (2009). PGC-1alpha as modifier of onset age in Huntington disease. *Molecular Neurodegeneration*, *4*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-10>
- Talukder, P., Jana, A., Dhar, S., & Ghosh, S. (2021). Huntington's Chorea—a Rare Neurodegenerative Autosomal Dominant Disease: Insight into Molecular Genetics, Prognosis and Diagnosis. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 193, Issue 8, pp. 2634–2648). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03523-x>
- Telenius, H., Kremer, B., Goldberg, Y. P., Theilmann, J., Andrew, S. E., Zeisler, J., Adam, S., Greenberg, C., Ives, E. J., Clarke, L. A., & Hayden, M. R. (1994). Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nature Genetics*, *6*(4), 409–414. <https://doi.org/10.1038/ng0494-409>
- Thion, M. S., Tézenas Du Montcel, S., Golmard, J. L., Vacher, S., Barjhoux, L., Sornin, V., Cazeneuve, C., Bièche, I., Sinilnikova, O., Stoppa-Lyonnet, D., Durr, A., Humbert, S., Sinilnikova, O., Mazoyer, S., Damiola, F., Barjhoux, L., Verny-Pierre, C., Calender, A., Giraud, S., ... Snyder, C. L. (2016). CAG repeat size in Huntingtin alleles is associated with cancer prognosis. *European Journal of Human Genetics*, *24*(9), 1310–1315. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.13>

- Thompson, J. A., Cruickshank, T. M., Penailillo, L. E., Lee, J. W., Newton, R. U., Barker, R. A., & Ziman, M. R. (2013). The effects of multidisciplinary rehabilitation in patients with early-to-middle-stage Huntington's disease: A pilot study. *European Journal of Neurology*, *20*(9), 1325–1329. <https://doi.org/10.1111/ene.12053>
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, *14*(2), 178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Tourette, C., Li, B., Bell, R., O'Hare, S., Kaltenbach, L. S., Mooney, S. D., & Hughes, R. E. (2014). A large scale huntingtin protein interaction network implicates RHO GTPase signaling pathways in huntington disease. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(10), 6709–6726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523696>
- Tovar, A., Garí Soler, A., Ruiz-Idiago, J., Mareca Viladrich, C., Pomarol-Clotet, E., Rosselló, J., & Hinzen, W. (2020). Language disintegration in spontaneous speech in Huntington's disease: a more fine-grained analysis. *Journal of Communication Disorders*, *83*. <https://doi.org/10.1016/j.jcomdis.2019.105970>
- Trapp, B. D. (1990). Myelin-Associated Glycoprotein Location and Potential Functions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *605*(1), 29–43. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb42378.x>
- Trembath, M. K., Horton, Z. A., Tippett, L., Hogg, V., Collins, V. R., Churchyard, A., Velakoulis, D., Roxburgh, R., & Delatycki, M. B. (2010). A retrospective study of the impact of lifestyle on age at onset of huntington disease. *Movement Disorders*, *25*(10), 1444–1450. <https://doi.org/10.1002/mds.23108>
- Trovato, B., Magri, B., Castorina, A., Maugeri, G., D'agata, V., & Musumeci, G. (2022). Effects of Exercise on Skeletal Muscle Pathophysiology in Huntington's Disease. In *Journal of Functional Morphology and Kinesiology* (Vol. 7, Issue 2, p. 40). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jfmk7020040>
- Tue, N. T., Shimaji, K., Tanaka, N., & Yamaguchi, M. (2012). Effect of ab-crystallin on protein aggregation in drosophila. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/252049>
- Van Dellen, A., Blakemore, C., Deacon, R., York, D., & Hannan, A. J. (2000). Delaying the onset of Huntington's in mice. *Nature*, *404*(6779), 721–722. <https://doi.org/10.1038/35008142>
- Van Dellen, A., Cordery, P. M., Spires, T. L., Blakemore, C., & Hannan, A. J. (2008). Wheel running from a juvenile age delays onset of specific motor deficits but does not alter protein aggregate density in a mouse model of Huntington's disease. *BMC Neuroscience*, *9*(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-34>
- Van Duijn, E., Craufurd, D., Hubers, A. A. M., Giltay, E. J., Bonelli, R., Rickards, H., Anderson, K. E., Van Walsem, M. R., Van Der Mast, R. C., Orth, M., & Landwehrmeyer, G. B. (2014). Neuropsychiatric symptoms in a European Huntington's disease cohort (REGISTRY). *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *85*(12), 1411–1418. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-307343>
- van Wamelen, D. J., & Aziz, N. A. (2021). Hypothalamic pathology in Huntington disease. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 182, pp. 245–255). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819973-2.00017-4>
- Velier, J., Kim, M., Schwarz, C., Kim, T. W., Sapp, E., Chase, K., Aronin, N., & DiFiglia, M. (1998). Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Experimental Neurology*, *152*(1), 34–40. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6832>
- Vitet, H., Brandt, V., & Saudou, F. (2020). Traffic signaling: new functions of huntingtin and axonal transport in neurological disease. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 63, pp. 122–130). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.04.001>

- Voelkl, B., Altman, N. S., Forsman, A., Forstmeier, W., Gurevitch, J., Jaric, I., Karp, N. A., Kas, M. J., Schielzeth, H., Van de Castele, T., & Würbel, H. (2020). Reproducibility of animal research in light of biological variation. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 21, Issue 7, pp. 384–393). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0313-3>
- von Kortzfleisch, V. T., Karp, N. A., Palme, R., Kaiser, S., Sachser, N., & Richter, S. H. (2020). Improving reproducibility in animal research by splitting the study population into several ‘mini-experiments.’ *Scientific Reports*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73503-4>
- Vonsattel, J. P. G., & DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *57*(5), 369–384. <https://doi.org/10.1097/00005072-199805000-00001>
- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P. (1985). Neuropathological classification of huntington’s disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *44*(6), 559–577. <https://doi.org/10.1097/00005072-198511000-00003>
- Waldvogel, H. J., Kim, E. H., Tippett, L. J., Vonsattel, J. P. G., & Faull, R. L. M. (2014). The neuropathology of Huntington’s disease. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *22*, 33–80. https://doi.org/10.1007/7854_2014_354
- Wallace, M., Downing, N., Lourens, S., Mills, J., Kim, J. I., Long, J., & Paulsen, J. (2016). Is there an association of physical activity with brain volume, behavior, and day-to-day functioning? A cross sectional design in prodromal and early huntington disease. *PLoS Currents*, *8*(HuntingtonDisease), ecurrents.hd.cba6ea74972cf8412a73ce52eb018c1e. <https://doi.org/10.1371/currents.hd.cba6ea74972cf8412a73ce52eb018c1e>
- Wang, J; Liao, Y. (2020). *WebGestaltR: Gene Set Analysis Toolkit WebGestaltR. R package version 0.4.3*. <https://cran.r-project.org/package=WebGestaltR>
- Wang, J., Xu, G., Li, H., Gonzales, V., Fromholt, D., Karch, C., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Borchelt, D. R. (2005). Somatodendritic accumulation of misfolded SOD1-L126Z in motor neurons mediates degeneration: α B-crystallin modulates aggregation. *Human Molecular Genetics*, *14*(16), 2335–2347. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi236>
- Wang, M., Liu, D., Yang, S., Li, Y., & Lian, X. (2022). Smoking, alcohol consumption, and age at onset of Huntington’s disease: a Mendelian randomization study. *Parkinsonism and Related Disorders*, *97*, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2022.02.013>
- Waudby, C. A., Knowles, T. P. J., Devlin, G. L., Skepper, J. N., Ecroyd, H., Carver, J. A., Welland, M. E., Christodoulou, J., Dobson, C. M., & Meehan, S. (2010). The interaction of α B-crystallin with mature α -synuclein amyloid fibrils inhibits their elongation. *Biophysical Journal*, *98*(5), 843–851. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.10.056>
- Wetzels, R., & Wagenmakers, E. J. (2012). A default Bayesian hypothesis test for correlations and partial correlations. *Psychonomic Bulletin and Review*, *19*(6), 1057–1064. <https://doi.org/10.3758/s13423-012-0295-x>
- Wexler, N. S., Lorimer, J., Porter, J., Gomez, F., Moskowitz, C., Shackell, E., Marder, K., Penchaszadeh, G., Roberts, S. A., Gayán, J., Brocklebank, D., Cherny, S. S., Cardon, L. R., Gray, J., Dlouhy, S. R., Wiktorski, S., Hodes, M. E., Conneally, P. M., Penney, J. B., ... Landwehrmeyer, B. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington’s disease age of onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(10), 3498–3503. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308679101>
- Wheeler, V. C., Persichetti, F., McNeil, S. M., Mysore, J. S., Mysore, S. S., MacDonald, M. E., Myers, R. H., Gusella, J. F., & Wexler, N. S. (2007). Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington disease. *Journal of Medical Genetics*, *44*(11), 695–701. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.050930>
- Whitlock, M. C. (2005). Combining probability from independent tests: The weighted Z-

- method is superior to Fisher's approach. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(5), 1368–1373. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00917.x>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., & Müller, K. (2020). *A Grammar of Data Manipulation [R package dplyr version 1.0.2]*.
- Wickham, Hadley. (2007). Reshaping data with the reshape package. *Journal of Statistical Software*, 21(12), 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v021.i12>
- Wickham, Hadley. (2016). *ggplot2*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wilcox, R. (2011). Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing, Third Edition. In *Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing, Third Edition*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-67044-1>
- Wilson Van Voorhis, C. R., & Morgan, B. L. (2007). Understanding Power and Rules of Thumb for Determining Sample Sizes. *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology*, 3(2), 43–50. <https://doi.org/10.20982/tqmp.03.2.p043>
- Wong, Y. C., & Holzbaur, E. L. F. (2014). The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *Journal of Neuroscience*, 34(4), 1293–1305. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1870-13.2014>
- Wood, N. I., Carta, V., Milde, S., Skillings, E. A., McAllister, C. J., Ang, Y. L. M., Duguid, A., Wijesuriya, N., Afzal, S. M., Fernandes, J. X., Leong, T. W., & Morton, J. (2010). Responses to Environmental Enrichment Differ with Sex and Genotype in a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS ONE*, 5(2), e9077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009077>
- Wood, N. I., Glynn, D., & Morton, A. J. (2011). "Brain training" improves cognitive performance and survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 42(3), 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.02.005>
- Xiang, Z., Valenza, M., Cui, L., Leoni, V., Jeong, H. K., Brilli, E., Zhang, J., Peng, Q., Duan, W., Reeves, S. A., Cattaneo, E., & Krainc, D. (2011). Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α contributes to dysmyelination in experimental models of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*, 31(26), 9544–9553. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1291-11.2011>
- Yamamoto, S., Yamashita, A., Arakaki, N., Nemoto, H., & Yamazaki, T. (2014). Prevention of aberrant protein aggregation by anchoring the molecular chaperone α -crystallin to the endoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 455(3–4), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.151>
- Yang, X., & Gray, M. (2010). *Mouse Models for Validating Preclinical Candidates for Huntington's Disease* (pp. 165–195). CRC Press/Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/ebk0849390005-c7>
- Yhnell, E., Lelos, M. J., Dunnett, S. B., & Brooks, S. P. (2016). Cognitive training modifies disease symptoms in a mouse model of Huntington's disease. *Experimental Neurology*, 282, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.008>
- Yi Teo, R. T., Hong, X., Yu-Taeger, L., Huang, Y., Tan, L. J., Xie, Y., To, X. V., Guo, L., Rajendran, R., Novati, A., Calaminus, C., Riess, O., Hayden, M. R., Nguyen, H. P., Chuang, K. H., & Pouladi, M. A. (2016). Structural and molecular myelination deficits occur prior to neuronal loss in the YAC128 and BACHD models of Huntington disease. *Human Molecular Genetics*, 25(13), 2621–2632. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw122>
- Yin, X., Crawford, T. O., Griffin, J. W., Tu, P. H., Lee, V. M. Y., Li, C., Roder, J., & Trapp, B. D. (1998). Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *Journal of Neuroscience*, 18(6), 1953–1962. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-06-01953.1998>
- Yu-Taeger, L., Bonin, M., Stricker-Shaver, J., Riess, O., & Nguyen, H. H. P. (2017).

- Dysregulation of gene expression in the striatum of BACHD rats expressing full-length mutant huntingtin and associated abnormalities on molecular and protein levels. *Neuropharmacology*, *117*, 260–272. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.01.029>
- Yu-Taeger, L., Petrasch-Parwez, E., Osmand, A. P., Redensek, A., Metzger, S., Clemens, L. E., Park, L., Howland, D., Calaminus, C., Gu, X., Pichler, B., William Yang, X., Riess, O., & Nguyen, H. P. (2012). A novel BACHD transgenic rat exhibits characteristic neuropathological features of Huntington disease. *Journal of Neuroscience*, *32*(44), 15426–15438. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1148-12.2012>
- Zappacosta, B., Monza, D., Meoni, C., Austoni, L., Soliveri, P., Gellera, C., Alberti, R., Mantero, M., Penati, G., Caraceni, T., & Girotti, F. (1996). Psychiatric symptoms do not correlate with cognitive decline, motor symptoms, or CAG repeat length in Huntington's disease. *Archives of Neurology*, *53*(6), 493–497. <https://doi.org/10.1001/archneur.1996.00550060035012>
- Zhang, B., & Horvath, S. (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, *4*(1), Article17. <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1128>
- Zhang, S., Shen, L., & Jiao, B. (2022). Cognitive Dysfunction in Repeat Expansion Diseases: A Review. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 14, p. 841711). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.841711>
- Zhao, M., Maani, N., & Dowling, J. J. (2018). Dynamin 2 (DNM2) as Cause of, and Modifier for, Human Neuromuscular Disease. In *Neurotherapeutics* (Vol. 15, Issue 4, pp. 966–975). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00686-0>
- Zhunina, O. A., Yabbarov, N. G., Orekhov, A. N., & Deykin, A. V. (2019). Modern approaches for modelling dystonia and Huntington's disease in vitro and in vivo. In *International Journal of Experimental Pathology* (Vol. 100, Issue 2, pp. 64–71). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/iep.12320>
- Zinzi, P., Salmaso, D., De Grandis, R., Graziani, G., Maceroni, S., Bentivoglio, A., Zappata, P., Frontali, M., & Jacopini, G. (2007). Effects of an intensive rehabilitation programme on patients with Huntington's disease: A pilot study. *Clinical Rehabilitation*, *21*(7), 603–613. <https://doi.org/10.1177/0269215507075495>
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., Friedlander, R. M., Silani, V., Hayden, M. R., Timmusk, T., Sipione, S., & Cattaneo, E. (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*, *293*(5529), 493–498. <https://doi.org/10.1126/science.1059581>

Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde am Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik unter Betreuung von Professor Dr. med. Olaf Rieß durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Julia Schulze-Hentrich (Leiterin der Arbeitsgruppe Epigenetik) in Zusammenarbeit mit Zinah Wassouf (wissenschaftliche Mitarbeiterin) und Huu Phuc Nguyen (leitender wissenschaftlicher Mitarbeiter).

Die den Daten zugrundeliegenden Tierversuche und biochemischen Untersuchungen wurden von Zinah Wassouf und Arianna Novati (wissenschaftliche Mitarbeiterin) durchgeführt.

Die Erzeugung der Sequenzierungsdaten erfolgte durch die NCCT (NGS Competence Center Tübingen). Thomas Hentrich (wissenschaftlicher Mitarbeiter) hat diese Daten prozessiert und für die weitere Analyse vorbereitet.

Die statistische Auswertung der Expressions- und Verhaltensdaten, die Koexpressions-Netzwerkanalyse und alle weiteren im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit dargestellten Analysen erfolgten eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Heidelberg, den

Unterschrift

Veröffentlichungen

Kilzheimer, A., Hentrich, T., Novati, A., Nguyen, H., Wassouf, Z., Schulze-Hentrich, J.M. (im Einreichungsprozess). Amelioration of transcriptional disturbances in BACHD rats by environmental enrichment.

Kilzheimer, A., Hentrich, T., Rotermund, C., Kahle, P. J., & Schulze-Hentrich, J. M. (2023). Failure of diet-induced transcriptional adaptations in alpha-synuclein transgenic mice. *Human molecular genetics*, 32(3), 450–461.

Hentrich, T., Koch, A., Weber, N., **Kilzheimer, A.**, Maia, A., Burkhardt, S., Rall, K., Casadei, N., Kohlbacher, O., Riess, O., Schulze-Hentrich, J. M., & Brucker, S. Y. (2020). The Endometrial Transcription Landscape of MRKH Syndrome. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 572281.

Kilzheimer, A., Hentrich, T., Burkhardt, S., & Schulze-Hentrich, J. M. (2019). The Challenge and Opportunity to Diagnose Parkinson's Disease in Midlife. *Frontiers in neurology*, 10, 1328.

Kilzheimer, A., & Schulze-Hentrich, J. (2018). Schutzmechanismen der Gen-Umwelt-Achse in Morbus Parkinson. *BIOspektrum*, 24, 604-607.

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Olaf Rieß und meiner Arbeitsgruppenleiterin Prof. Dr. Julia Schulze-Hentrich für ihre hervorragende, motivierende Betreuung und Unterstützung meiner Promotion. Ich möchte Ihnen auch für die Möglichkeiten danken, an mehreren weiteren Forschungsprojekten mitzuwirken und mich an mehreren wissenschaftlichen Publikationen zu beteiligen. Besonders dankbar bin ich ihnen auch für das offene, nahbare Miteinander und die familiäre Arbeitsatmosphäre, in der ich mich stets sehr gefördert fühlen durfte.

Auch danke ich Thomas Hentrich für seine Unterstützung bei technischen, informatischen und vielen weiterführenden Fragen sowie seine zwischenmenschliche Herzlichkeit.

Zudem gilt mein Dank dem IZKF-Promotionskolleg der medizinischen Fakultät Tübingen und der Studienstiftung des deutschen Volkes für deren ideelle und finanzielle Unterstützung, die zu dieser Arbeit erheblich beigetragen hat.

Ich danke Zinah Wassouf und Simone Burkhardt für ihre Unterstützung und Zusammenarbeit im Rahmen der entstandenen wissenschaftlichen Veröffentlichungen.

Ein besonderer Dank gilt Christine, die mir immer unermüdlich zur Seite stand. Ich danke auch Magdalena, Ewald und Melanie für alles – insbesondere für ihre Geduld. Danke euch allen, dass ihr diesen Weg mit mir gegangen seid und immer für mich da wart!

Ich danke meinen Freunden und meiner weiteren Familie für die unzähligen großen und kleinen Dinge, mit denen sie mich die vergangenen Jahre unterstützt haben.

Zuletzt bin ich den genutzten Versuchstieren dankbar, deren unwillentliches Opfer diese Promotion ermöglicht hat und auch in vielen weiteren Untersuchungen zum Fortschritt der Wissenschaft beiträgt.