

1. Einleitung	1
2. Untersuchung der Aggregatbildung von HD Exon 1 Proteinen	
in Säugetierzellen.....	7
2.1 Ergebnisse.....	7
2.1.1 Herstellen von stabilen Zelllinien	7
2.1.2 Bestimmung der optimalen Doxycyclinkonzentration.....	8
2.1.3 Bestimmung der optimalen Induktionszeit	10
2.1.4 Die Expression von HD Exon 1 Proteinen mit langen Polyglutaminketten führt zur Bildung von ubiquitinierten Aggregaten.....	11
2.1.5 Zeitabhängigkeit der Aggregatbildung.....	13
2.1.6 Die Expression von HD Exon 1 Proteinen mit langen Polyglutaminketten führt zur Bildung von perinuklearen Aggregaten.....	14
2.1.7 Cytoplasmatische Aggregate colokalisieren mit dem Centrosom und führen zur zellulären Umverteilung von Vimentin	15
2.1.8 Colokalisation des Proteasoms mit HD Exon 1 Aggregaten.....	17
2.1.9 Die Inhibierung des Proteasoms verstärkt die Aggregationsbildung.....	18
2.1.10 Rekrutierung des ER-Chaperons BiP/Grp78 in die perinuklearen Einschlußkörper.....	20
2.1.11 Colokalisierung von TIA-1, 14-3-3 ϵ und α -Synuclein mit den perinuklearen Einschlußkörpern.....	22
2.1.12 Ultrastruktur der perinuklearen Einschlußkörper.....	24
2.1.13 Die Expression von mutierten Huntingtinproteinen ist toxisch für 293 Tet-Off Zellen.....	27
2.2 Diskussion	27
3. Identifizierung und Charakterisierung von	
HIP1-interagierenden Proteinen	37
3.1 Ergebnisse.....	37
3.1.1 Strukturanalyse von HIP1	37
3.1.2 Affinitätsreinigung von HIP1-interagierenden Proteinen.....	39
3.1.3 Identifizierung der HIP1-interagierenden Proteine durch Massenspektrometrie und Immunblotting.....	39
3.1.4 HIP1 Fragmente, die DxF-Motive enthalten, assoziieren direkt mit der α -Adaptin „Appendage“-Domäne	43

3.1.5 Die coiled-coil-bildende Domäne in HIP1 ist entscheidend für die Bindung an die schwere Kette von Clathrin	45
3.1.6 HIP1 ist mit Clathrin-bedeckten Vesikeln assoziiert	46
3.1.7 Die Überexpression von HIP1 (218-604) in COS-1 Zellen induziert die Bildung von großen vesikelartigen Strukturen.....	48
3.2 Diskussion	51
4. Materialien und Methoden.....	57
4.1 Materialien.....	57
4.1.1 Bakterienstämme	57
4.1.2 Zelllinien	57
4.1.3 Plasmidvektoren.....	58
4.1.4 Medien und Puffer.....	60
4.1.5 Oligonukleotide	61
4.1.6 Antikörper	63
4.1.7 Enzyme, Proteine und DNA.....	64
4.1.8 Chemikalien und Säulenmaterialien.....	65
4.1.9 Kits	67
4.1.10 Laborausstattung, Geräte und Zubehör	67
4.2 Methoden.....	70
4.2.1 Grundlegende molekularbiologische Methoden	70
4.2.1.1 DNA-Plasmidpräparation mit Qiagen-Kits	70
4.2.1.2 DNA-Plasmidpräparation über CsCl-Gradient	71
4.2.1.3 Konzentrationsbestimmung der DNA.....	72
4.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA.....	72
4.2.1.5 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen.....	72
4.2.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	73
4.2.1.7 DNA Agarose-Gelelektrophorese	73
4.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	74
4.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten.....	74
4.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	75
4.2.1.11 DNA-Sequenzierung	75
4.2.1.12 Plasmidkonstruktionen.....	76
4.2.1.12.1 pTet-CMV-Hyg-CAG20, -CAG51 und -CAG83	76
4.2.1.12.2 HIP1-Plasmide	76

4.2.1.12.2.1 pTL1-HIP1 (218-604)	76
4.2.1.12.2.2 pGEX-HIP1 (218-604)	76
4.2.1.12.2.3 pGEX-6P-1-HIP1, pQE32-HIP1 und pTL1-HA3-HIP1 (1-1003), (1-604), (1-333), (1-217), (218-604) und (334-604)	76
4.2.1.12.3 pGEX- α -Adaptin	77
4.2.1.12.4 pSE111 Helferplasmid für Proteinexpression	77
4.2.2 Grundlegende mikrobiologische Methoden.....	78
4.2.2.1 Herstellung elektrokompenter Zellen.....	78
4.2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien mittels Elektroporation	78
4.2.2.3 Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien.....	79
4.2.3 Grundlegende proteinbiochemische Methoden.....	79
4.2.3.1 Expression von rekombinanten GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	79
4.2.3.2 Reinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen.....	80
4.2.3.3 Reinigung von rekombinanten His-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen.....	80
4.2.3.4 Reinigung von rekombinanten His-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen.....	81
4.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	82
4.2.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	82
4.2.3.7 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	83
4.2.3.8 Western Blot.....	84
4.2.3.9 Filtertest.....	85
4.2.3.10 Proteinbindungstest und Peptidkompetitionsstudien	86
4.2.3.11 Protein Overlay-Assay	86
4.2.3.12 Aufreinigung von Clathrin-bedeckten Vesikeln	87
4.2.3.13 Immunmarkierung der Clathrin-bedeckten Vesikel für elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	87
4.2.4 Grundlegende zellbiologische Methoden.....	88
4.2.4.1 Auftauen von kryokonservierten Säugetierzellen.....	88
4.2.4.2 Kultivierung und Lagerung von Säugetierzellen	88
4.2.4.3 Trypsinieren von Säugetierzellen.....	89
4.2.4.4 Bestimmung der Zellkonzentration von kultivierten Säugetierzellen.....	89
4.2.4.5 Transfektion von Säugetierzellen.....	89
4.2.4.6 Herstellung der stabilen, induzierbaren Tet-Off Zellen.....	90
4.2.4.7 Herstellung von Zelllysaten	90

4.2.4.8 Vorbereitung von Zellpräparaten für die Immunfluoreszenzmikroskopie.....	91
4.2.4.9 Vorbereitung von Zellpräparaten für die Elektronenmikroskopie	92
4.2.4.10 Inhibierung des Proteasoms mit Lactacystin.....	93
4.2.4.11 Toxizitätstest	93
4.2.5 Grundlegende immunologische Methoden	93
4.2.5.1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern.....	93
4.2.5.2 Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern.....	94
4.2.5.3 IgG-Präparation aus Antiserum.....	94
4.2.6 Massenspektrometrie.....	95
4.2.6.1 Aufbereitung der Gelprobe.....	95
4.2.6.2 MALDI-TOF-MS Probenvorbereitung und Analyse.....	95
5. Literaturverzeichnis.....	97
6. Eigene Publikationen.....	108
7. Abkürzungen.....	109
8. Danksagung.....	112
9. Zusammenfassung.....	113
10. Abstract.....	115