

1. Einleitung

Chorea Huntington oder auch Huntington's Disease, im Folgenden mit HD abgekürzt, ist eine fortschreitend verlaufende, neurodegenerative Erkrankung. Die Krankheit wird autosomal dominant vererbt (Wexler et al., 1987) und ist charakterisiert durch selektiven, neuronalen Zelltod, vorrangig im cerebralen Cortex und Striatum. Im Krankheitsverlauf kommt es zu psychischen Veränderungen, motorischer Beeinträchtigung in Form von unkoordinierten Bewegungen (Chorea), Unruhezuständen und Vergesslichkeit sowie nachfolgend zum vollständigen Verlust der motorischen Kontrolle und aller intellektuellen Fähigkeiten (Harper, 1991). Etwa 10 bis 20 Jahre nach Auftreten der ersten Symptome, die typischerweise in der vierten bis fünften Lebensdekade auftreten, führt HD zum Tod (Reed et al., 1958). Gelegentlich ist HD auch bei Jugendlichen manifestiert; dann sind die Symptome jedoch stärker ausgeprägt, und der Krankheitsverlauf ist schneller. HD tritt mit einer Inzidenz von 4 bis 7 Personen pro 100.000 Personen auf.

Das Huntington-Gen oder auch *IT15* („interesting transcript 15“) umfaßt etwa 210 kb (67 Exons) und enthält am 5' Ende im Exon 1 eine polymorphe CAG-Trinukleotidsequenz, so daß am N-terminalen Ende des ~ 348 kDa großen Huntingtinproteins eine Polyglutaminkette exprimiert wird (HDCRG, 1993). In der normalen Population variiert die Anzahl der CAG-Repeats von 11-34, ist aber bei HD-Patienten auf 37-155 erhöht (Barron et al., 1993). Eine prolinreiche Region trennt die Polyglutaminsequenz von dem nachfolgenden HEAT-Repeat (Andrade and Bork, 1995), das aus zwei hydrophoben α -Helices besteht und möglicherweise für die Interaktion mit anderen Proteinen entscheidend ist. Huntingtin enthält insgesamt 3 Regionen mit je 6 bzw. 8 HEAT-Repeats sowie ein einzelnes Leuzinzippermotiv, das mit einem Leuzinzippermotiv eines zweiten Proteins interagieren kann (Landschulz et al., 1988). Es wurden keine weiteren hydrophoben Proteindomänen in Huntingtin gefunden, so daß das Protein in der Zelle wahrscheinlich nicht als Membranprotein, sondern als lösliches Protein vorliegt.

Bisher sind weder der der Krankheit zugrundeliegende Pathomechanismus noch die normale Funktion des Proteins Huntingtin aufgeklärt. Sowohl die normale Form von Huntingtin mit einer Glutaminkettenlänge von 11 bis 34 Wiederholungen als auch die mutierte Form mit mehr als 37 Glutaminresten werden im Gehirn und in peripheren Geweben exprimiert. Die höchste Expression ist im Gehirn und in den Hoden zu sehen, wobei im Gehirn die Regionen von Cortex und Cerebellum die stärkste Expression zeigen (Trottier et al., 1995). Es kommt zu keiner Anreicherung des mutierten Huntingtins in Striatum und Cortex, den am stärksten

betroffenen Regionen von HD (Stine et al., 1995). Bei der Erkrankung zeigen sich neuropathologische Veränderungen im Striatum, in den Basalganglien, im cerebralen Cortex und Globus Pallidus, jedoch nicht in Hippocampus und Cerebellum (Graveland et al., 1985). Somit gibt es keinen Zusammenhang zwischen der Expression von Huntingtin und den neurodegenerativen Veränderungen in bestimmten Hirnregionen. Andere Gewebe außer dem Gehirn sind bei HD nicht betroffen.

Perutz (1996) hat ein Modell vorgeschlagen, bei dem Polyglutaminketten, die eine kritische Länge von 41 Resten überschreiten, antiparallele β -Stränge bilden, die über Wasserstoffbrückenbindungen („polar zippers“) zusammengehalten werden. Diese Hypothese wurde mit *in vitro* Experimenten bestätigt. So zeigten Scherzinger et al. (1999), daß rekombinante HD Exon 1 Proteine mit einer Polyglutaminkette im pathologischen Bereich (> 37 Glutaminreste), aber nicht im normalen Bereich (20-32 Glutaminreste), SDS-unlösliche Proteinaggregate mit fibrillärer Morphologie bilden. In anderen Arbeitsgruppen wurden ähnliche Resultate erzielt (Cooper et al., 1998), (Lunkes and Mandel, 1998), (Martindale et al., 1998), (Kazantsev et al., 1999). Demnach ist eine Polyglutaminwiederholung im pathologischen Bereich (> 37 Glutaminreste) ähnlich wie in den *in vivo* Beobachtungen auch *in vitro* und in Zellkulturmodellen für die Bildung von Huntingtin Proteinaggregaten entscheidend.

Die Anhäufung von unlöslichen, Polyglutamin-enthaltenden Proteinaggregaten in intranuklearen und perinuklearen Einschlusskörpern wurde ebenso in Gehirnen von HD transgenen Mäusen (Davies et al., 1997) und HD Patienten (DiFiglia et al., 1997) nachgewiesen. Diese Befunde haben zu der Hypothese geführt, daß HD sowie die verwandten Polyglutaminkrankheiten Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA), Dentatorubropallidolusiane Atrophie (DRPLA) und die spinocerebellaren Ataxien Typ 1, 2, 3, 6 und 7 (Paulson, 1999) durch die Anhäufung von unlöslichen Proteinaggregaten in neuronalen Einschlusskörpern verursacht werden; bis heute ist jedoch noch immer nicht geklärt, ob die Bildung der Einschlusskörper Fehlfunktionen und Neurodegeneration verursacht, oder ob sie lediglich ein Verteidigungsmechanismus ist, um neuronale Zellen vor der Toxizität falsch gefalteter Proteine zu schützen. Als Untermauerung der zweiten Theorie lieferten Saudou et al. (1998) und Klement et al. (1998) Hinweise, daß die Bildung von Einschlusskörpern mit aggregiertem Polyglutamin-enthaltenden Protein nicht giftig oder sogar nützlich für neuronale Zellen ist. Im Gegensatz zu diesen Befunden haben andere Wissenschaftler gezeigt, daß die Bildung von Proteinaggregaten mit dem Fortschreiten der Krankheit und der Entwicklung von neuronalen Symptomen korreliert (Davies et al., 1997), (Ona et al., 1999), (Yamamoto et al.,

2000). Kürzlich zeigten Yamamoto et al. (2000) mit einem konditionalen Mausmodell von HD, daß die Expression von mutiertem HD Exon 1 Protein zur Bildung von Einschußkörpern und zu fortschreitender motorischer Fehlfunktion führt. Blockierung der HD Exon 1 Expression in symptomatischen Mäusen führte zum Verschwinden der Einschußkörper und der Verhaltensauffälligkeiten. Daher scheinen die Bildung der Einschußkörper und das Fortschreiten der Krankheit eindeutig miteinander verbunden zu sein. Weiterhin ist die Entwicklung einer HD-ähnlichen Pathologie von der kontinuierlichen Expression eines verkürzten Huntingtinproteins mit einer Glutaminkette im pathologischen Bereich abhängig. Immunhistochemische und ultrastrukturelle Studien haben gezeigt, daß das aggregierte Huntingtinprotein in neuronalen Einschußkörpern von HD transgenen Mäusen und Patienten ubiquitiniert ist (Davies et al., 1997), (DiFiglia et al., 1997). Diese Befunde legen nahe, daß das mutierte Huntingtinprotein für den Abbau durch die Ubiquitinierungsmaschinerie markiert worden ist, aber offensichtlich gegen den Abbau resistent ist. Der Abbau der meisten Proteine durch das Proteasom erfordert die Konjugation mit mehreren Ubiquitinmolekülen (Bonifacino and Weissman, 1998). Ubiquitinierte Proteine werden dann von dem 26S Proteasom erkannt und hydrolysiert (Voges et al., 1999). Das 26S Proteasom besteht aus zwei Hauptuntereinheiten: dem 20S Proteasom, eine faßförmige, multikatalytische Protease, und dem 19S (PA700) Regulatorkomplex, der mit dem 20S Proteasom assoziiert ist. Der 19S Regulatorkomplex ist für die Erkennung der ubiquitinierten Proteine notwendig. Zusätzlich zu dem 19S Regulatorkomplex wurde noch ein zweiter Regulator des 20S Proteasoms beschrieben. Diese ringförmige Struktur wurde 11S oder PA28 genannt und bindet an das 20S Proteasom in einer ähnlichen Orientierung wie 19S. Der 11S Regulatorkomplex wird eher für den Abbau von kurzen Peptiden als von großen, ubiquitinierten Proteinen benötigt. Cummings et al. (1998) haben gezeigt, daß Ubiquitin-positive Kerneinschußkörper in Neuronen von Patienten und transgenen Mäusen mit spinocerebellarer Ataxie Typ 1 auch immunpositiv für das 20S Proteasom und die molekularen Chaperone HDJ-2/HSDJ sind, was darauf hinweist, daß Untereinheiten des 26S Proteasoms sowie Hitzeschockproteine zu den Orten der Ataxin-1 Proteinaggregation hingezogen werden. Diese Resultate wurden in der Zellkultur, transgenen Mäusen und Fliegenmodellssystemen mit verschiedenen Polyglutamin-enthaltenden Proteinen bestätigt (Chai et al., 1999), (Stenoien et al., 1999), (Warrick et al., 1999). Zusammen deuten diese Befunde an, daß die Umverteilung der proteasomalen Maschinerie und der molekularen Chaperone zu den Polyglutamin-enthaltenden Proteinaggregaten eine natürliche Antwort der Zellen darstellt, um falsch gefaltete, für die Aggregation bestimmte Proteine zu entfernen.

Eine generelle Wichtigkeit des Ubiquitin-Proteasomweges in Bezug auf den Abbau von falsch gefalteten Proteinen wurde vorgeschlagen. Ward et al. (1995) haben gezeigt, daß der Abbau von Wildtyp und mutiertem Cystische Fibrose Transmembran Conductor Regulator (CFTR) durch spezifische Proteasominhibitoren blockiert wird, was in der Anhäufung von polyubiquitinierten Formen von CFTR resultiert. Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie brachten auch zum Vorschein, daß CFTR Moleküle in abgegrenzten perinuklearen Einschlußkörpern aggregieren (Johnston et al., 1998). Die Bildung dieser Strukturen, die „Aggresom“ genannt wurden, könnte eine allgemeine Antwort der Zellen sein, die immer dann auftritt, wenn die Kapazität des Proteasoms für den Abbau überschritten ist. Kürzlich haben Wigley et al. (1999) entdeckt, daß unter normalen Bedingungen die Komponenten des 26S Proteasoms sowie auch Ubiquitin und Hitzeschockproteine am Centrosom konzentriert sind. Interessanterweise vergrößert sich diese Struktur in Antwort auf Inhibitoren der proteasomalen Aktivität, und zusätzliche Mengen von Chaperonen, Ubiquitin und proteasomalen Untereinheiten werden in die Einschlußkörper rekrutiert. Zusammengenommen regen diese Befunde die Theorie an, daß Säugetierzellen ein am Centrosom lokalisiertes spezifisches Organell enthalten, das auf den Abbau von falsch gefalteten Proteinen spezialisiert ist. Krankheitsproteine, die eine Polyglutaminkette im pathologischen Bereich besitzen, können dem natürlichen Abbau in diesem Organell widerstehen oder stören das Ubiquitin-Proteasom-System, oder beides.

In dieser Arbeit wurde die zelluläre Antwort auf die Bildung von Polyglutamin-enthaltenden Huntingtinaggregaten in 293 Tet-Off Zellen untersucht. Dazu wurden stabile, induzierbare 293 Tet-Off Zelllinien hergestellt, die das erste Exon des Huntingtinproteins mit 20, 51 oder 83 Glutaminen exprimieren sowie eine Zelllinie, die kein Huntingtinprotein exprimiert (Kontrolle). Während der Kultivierung der Zellen kann die Expression des Huntingtinproteins durch Zugabe von Doxycyclin ausgeschaltet werden („Tet-Off“), wohingegen das Entfernen von Doxycyclin die Expression induziert. In diesem System wird gezeigt, daß die Aggregation des Huntingtinproteins in Säugetierzellen außer von der Polyglutaminlänge auch von der proteasomalen Aktivität abhängt. Die Inhibierung der Aktivität des 26S Proteasoms verstärkt signifikant die Anhäufung von mutierten HD Exon 1 Proteinaggregaten. Die Daten zeigen auch, daß Huntingtinaggregation zu abgegrenzten perinuklearen Einschlußkörpern führt, die den CFTR Aggresomen strukturell sehr ähneln (Johnston et al., 1998). Die Anhäufung von unlöslichen Huntingtinaggregaten ist toxisch für Säugetierzellen und führt zur Umverteilung von einigen zellulären Faktoren wie Streßproteinen und Komponenten des 26S Proteasoms in die Einschlußkörper. Zusammengefaßt unterstützen diese Daten die Hypothese,

daß sich Einschußkörper mit aggregiertem Huntingtinprotein hauptsächlich deshalb in Säugetierzellen anhäufen, weil das natürliche Proteasomsystem nicht in der Lage ist, das exprimierte mutierte Huntingtinprotein abzubauen.

Neben den Aggregationsprozessen von Huntingtin ist auch die Funktion des Proteins für das Verständnis des Pathomechanismus von Huntington`s Disease von Interesse. Bisher ist weder die Funktion des normalen noch die des mutierten Huntingtinproteins bekannt.

Für die subzelluläre Lokalisation von Huntingtin wurde in früheren Studien gezeigt, daß es sich um ein cytoplasmatisches Protein handelt, von dem ein Teil mit synaptischen und Clathrin-bedeckten Vesikeln und Mikrotubuli assoziiert ist, was auf eine funktionelle Rolle von Huntingtin bei den Zellfilamentnetzwerken oder beim Transport von Vesikeln schließen läßt (DiFiglia et al., 1995), (Gutekunst et al., 1995), (Sharp et al., 1995). Weiterhin wurde gezeigt, daß Huntingtin mit Membranen des trans-Golgi Apparates sowie mit Clathrin-bedeckten Vesikeln oder auch clathrin-coated vesicles, im Folgenden mit CCV abgekürzt, im Cytoplasma kolokalisiert, was auf eine funktionelle Rolle in der Sekretion oder Endocytose schließen läßt (Velier et al., 1998).

Da die Aminosäuresequenz von Huntingtin außer für die Glutamin- und Prolin-reichen Abschnitte in der Nähe des N-Terminus keine Ähnlichkeit zu schon bekannten Proteinen aufweist (HDCRG, 1993), wurde versucht, die normale Funktion von Huntingtin mit Hilfe von Huntingtin-interagierenden Proteinen näher zu charakterisieren. So wurden mit dem Hefe Two-Hybrid System in den letzten Jahren mehrere interagierende Proteine entdeckt. Das erste „huntingtin associated protein“, das auf diese Art und Weise gefunden wurde, war HAP1 (Li et al., 1995). Auch für HAP1 existiert keine Homologie zu schon bekannten Proteinen in den Datenbanken. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß HAP1, ähnlich wie Huntingtin, hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird und mit Mikrotubuli sowie mit membranumhüllten Organellen wie Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum, Lysosomen und synaptischen Vesikeln assoziiert ist (Li et al., 1998), (Gutekunst et al., 1998), (Martin et al., 1999). Als nächstes wurde mit dem Hefe Two-Hybrid System das „huntingtin interacting protein“, HIP1, identifiziert (Wanker et al., 1997), (Kalchman et al., 1997). HIP1 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, aber auch in geringen Mengen in peripheren Geweben. In einer subzellulären Fraktionierung von humanem Cortex wurden sowohl HIP1 als auch Huntingtin in den Membran-enthaltenden Fraktionen angereichert (Wanker et al., 1997), ein Befund, der darauf hindeutet, daß auch das Protein HIP1 eine Rolle im Vesikeltransport spielt. HIP1 ist homolog zu dem Protein Sla2p aus *Saccharomyces*

cerevisiae, bekannt auch als End4p oder Mop2p (Wanker et al., 1997), (Kalchman et al., 1997), (Wesp et al., 1997). Für Sla2p wurde mit Immunlokalisationen in der Hefe gezeigt, daß es Bestandteil des kortikalen Actincytoskeletts ist (Yang et al., 1999). Funktionelle Studien haben zudem ergeben, daß dieses Protein für den Internalisierungsschritt der Endocytose benötigt wird (Wesp et al., 1997). Weitere homologe Proteine von HIP1 wurden in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* sowie bei Drosophila, Maus und Mensch identifiziert (Holtzman et al., 1993), (Chopra et al., 2000), (Engqvist-Goldstein et al., 1999), aber über ihre zelluläre Funktion ist bisher nur wenig bekannt. Für das Mausprotein mHIP1R wurde gezeigt, daß es mit Clathrin, AP-2 und endocytotisch aufgenommenem Transferrin co-lokalisiert, was ebenfalls darauf hindeutet, daß dieses Protein ähnlich wie Huntingtin eine Rolle in der Clathrin-vermittelten Endocytose spielt (Engqvist-Goldstein et al., 1999).

Um mehr über die zellulären Funktionen von HIP1 und Huntingtin zu erfahren, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit mit Hilfe der Affinitätschromatographie nach neuen HIP1-interagierenden Proteinen gesucht. Außerdem wurde die Domänenstruktur von HIP1 mit den Computerprogrammen SMART und Pfam einer detaillierten Analyse unterzogen, um mögliche Hinweise auf neue Funktionen dieses Huntingtin-interagierenden Proteins zu erhalten. Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen zeigen, daß HIP1 direkt mit der schweren Kette von Clathrin und auch mit α -Adaptin A und α -Adaptin C interagiert. Diese Proteine sind Hauptkomponenten der Clathrin-bedeckten Vesikel und für die Rezeptor-vermittelte Endocytose an der Plasmamembran wichtig. Wie mehrere andere Proteine, die an der Rezeptor-vermittelten Endocytose beteiligt sind (z.B. AP180, Amphiphysin, Eps15 und Epsin), enthält auch HIP1 ein Asparaginsäure-Prolin-Phenylalanin (DPF)-Motiv, das für die Interaktion des Proteins mit den „Appendage“-Domänen von α -Adaptin A und C wichtig ist. Weiterhin zeigen *in vitro* Bindungsstudien mit verkürzten, rekombinanten HIP1 Proteinen, daß eine vorhergesagte coiled-coil-bildende Domäne im zentralen Bereich des Proteins für seine Assoziation mit der schweren Kette von Clathrin kritisch ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß sowohl HIP1 als auch Huntingtin eine funktionelle Rolle bei der Endocytose und dem Recycling der synaptischen Vesikel in Neuronen spielen. Computergestützte Strukturvoraussagen machen es außerdem wahrscheinlich, daß HIP1 über seine N-terminale ENTH-Domäne mit Lipidmembranen interagiert, während eine Talin-ähnliche Struktur am C-Terminus des Proteins auf eine Wechselwirkung mit F-Actin Filamenten schließen läßt.