

**Identifizierung eines Protein-Interaktionsnetzwerks für Huntingtin  
und  
polyglutaminabhängige Induktion von Hefeprionen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Heike Göhler  
aus Kulmbach

Oktober, 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Erich E. Wanker

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

Disputation am 24.01.2006

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Erich Wanker danke ich für die Überlassung der interessanten Themen, für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie für die umfassende und stets freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Lehrach, in dessen Abteilung diese Doktorarbeit begonnen wurde, möchte ich mich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen bedanken. Herrn Prof. Dr. Gerd Multhaup danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wanker, insbesondere meinen Kollegen in den Laboren 115, 118 und 0285, für die gute Arbeitsatmosphäre und für die Hilfe bei der praktischen Arbeit.

Bei Rudi Lurz und Gerhild Lüder bedanke ich mich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, bei Katrin Lindberg, Sarah Coleman, Claire-Anne Gutekunst und Bernhard Landwehrmeyer für die immunhistochemischen Untersuchungen. Vielen Dank an Caterina Holz, Sigrid Schaper und Yury Chernoff für die Überlassung von Plasmiden und Hefestämmen.

Auch bei Stephanie Wälter, Ulrich Stelzl und Maciej Lalowski möchte ich mich für die Unterstützung bei den Experimenten für das Y2H-Paper bedanken und bei Uwe Worm für die bioinformatischen Analysen. Christian Hänig danke ich für den „Rat und Tat“-Service bei computertechnischen Problemen. Eberhard Scherzinger danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und für die „Tipps und Tricks“ im Laborleben „Ein Klon lebt selten allein...“.

Vielen herzlichen Dank an Anja Dröge für das Korrekturlesen und die kompetente Beratung bei Problemen aller Art. Ich möchte auch Figen Ertas danken, die mir in der Zeit meiner Doktorarbeit eine sehr gute Freundin war. Hans-Peter Stuible möchte ich für die moralische Unterstützung bei dieser Arbeit danken.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
	Chorea Huntington .....	1
	Polyglutaminwiederholungen als Ursache von mehreren neurodegenerativen Erkrankungen .....	2
	Das Protein Huntingtin .....	2
	Entstehung von Huntingtin Aggregaten.....	3
	Ursachen der Toxizität bei Chorea Huntington.....	4
	Theorien über den Pathomechanismus bei Chorea Huntington.....	7
	Interaktionspartner von Huntingtin.....	7
	Protein-Interaktionsnetzwerke .....	11
	Zielsetzung der Arbeit-I .....	11
	Prionenkrankheiten .....	12
	Übertragung von Prionen .....	13
	Theorien zum molekularen Mechanismus der Replikation von Prionen .....	14
	Entdeckung von Hefeprionen .....	15
	Kriterien für Hefeprionen .....	16
	Das Hefeprion [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] .....	16
	Aggregation von Sup35.....	18
	Spontane Entstehung von [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ].....	18
	Unterschiedliche [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ]-Varianten .....	18
	Die Entdeckung von Rnq1.....	19
	Heilung von [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ]-Zellen .....	19
	Zielsetzung der Arbeit-II .....	20
2.	Identifizierung eines Protein-Interaktionsnetzwerks für Huntingtin .....	21
2.1.	Ergebnisse .....	21
2.1.1.	Das Y2H-System .....	21
2.1.2.	Amplifizierung von Y2H-cDNA-Bibliotheken .....	24
2.1.3.	Strategie zur Identifizierung des Htt-Protein-Interaktionsnetzwerkes .....	25
2.1.4.	Auswahl der Bait-Proteine für den ersten cDNA-Bank-Screen.....	26
2.1.5.	Identifizierung von Protein-Interaktionen durch cDNA-Bank-Screens .....	29
2.1.6.	Auswahl der Proteine für den zweiten cDNA-Bank-Screen .....	33

---

2.1.7.	Identifizierung von Protein-Interaktionen durch den Array-Screen .....	34
2.1.8.	Analyse der identifizierten Proteine .....	38
2.1.9.	Direkte Interaktionspartner von Htt .....	41
2.1.10.	Erweiterung des Htt-Protein-Interaktionsnetzwerks.....	42
2.1.11.	Verifikation von Protein Interaktionen aus dem Htt-Netzwerk.....	44
2.1.12.	Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Htt bei Coexpression mit ausgewählten Netzwerkproteinen.....	45
2.1.13.	Zelluläre Funktion von GIT1 und Bestimmung der interaktionsrelevanten Regionen von Htt und GIT1 .....	46
2.1.14.	Verifizierung der Htt/GIT1-Interaktion durch Immunpräzipitations- experimente.....	49
2.1.15.	Colokalisation von Htt und GIT1 in Säugetierzellen.....	51
2.1.16.	Aggregation von GIT1 .....	53
2.1.17.	Einfluss von GIT1 auf die Htt-Aggregation .....	54
2.1.18.	Lokalisation von GIT1 in neuronalen Einschlusskörpern .....	55
2.1.19.	Akkumulierung von C-terminalen GIT1-Fragmenten in HD-Patienten .....	57
2.2.	Diskussion .....	59
3.	Polyglutaminabhängige Induktion von Hefeprionen.....	73
3.1.	Ergebnisse .....	73
3.1.1.	Charakterisierung der Hefestämme GT17 und OT56 .....	74
3.1.2.	Induktion von $[PSI^+]$ durch Sup-Htt Fusionsproteine.....	76
3.1.3.	Induktion von $[PSI^+]$ durch PrD-Htt Fusionsproteine.....	78
3.1.4.	Untersuchung der Aggregation von Sup-Htt und PrD-Htt Fusionsproteinen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie .....	80
3.1.5.	Elektronenmikroskopische Untersuchung von Sup-Q54 Aggregaten .....	81
3.1.6.	Löslichkeit von endogenem Sup35 in Gegenwart von aggregiertem Sup-Q54 .....	82
3.1.7.	Interaktion von Sup-Q54 mit endogenem Sup35.....	83
3.1.8.	<i>In vitro</i> Aggregation von PrD-Htt Fusionsproteinen und Sup35 .....	85
3.1.9.	Induktion von $[PSI^+]$ durch Coexpression von Sup35 und Htt-Exon1 Fragmenten .....	89
3.1.10.	Einfluss des Expressionsniveaus der Sup-Htt Fusionsproteine auf die Induktion von $[PSI^+]$ .....	91

---

3.1.11. Induktion von [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] durch Expression von Sup-Htt Fusionsproteinen in Abhängigkeit von Hsp104 und nach GdnHCl-Behandlung .....	92
3.1.12. Löslichkeit von endogenem Sup35 in Zellen mit Sup-Q54 bei veränderter Hsp104-Konzentration sowie nach einer Behandlung mit GdnHCl .....	95
3.1.13. Eliminierung von [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] in Zellen, die Sup35 oder Sup-Q54 überexprimieren.....	96
3.1.14. Die Rolle der Sup-Htt Fusionsproteine bei der Vererbung von [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ].....	97
3.1.15. Substitution von endogenem Sup35 durch Sup-Htt Fusionsproteine .....	101
3.1.16. Eliminierung von Hsp104 in GT680-Zellen mit Sup-Htt Fusionsproteinen .....	102
3.1.17. Induktion von [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ][ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] durch Expression von Rnq-Htt Fusionsproteinen .....	104
3.2. Diskussion .....	108
4. Materialien und Methoden .....	118
4.1. Materialien .....	118
4.1.1. Bakterienstämme.....	118
4.1.2. Hefestämme .....	118
4.1.3. Zelllinien .....	119
4.1.4. Plasmidvektoren .....	119
4.1.4.1. Bakterielle Expressionsvektoren .....	119
4.1.4.2. Expressionsvektoren für <i>S. cerevisiae</i> .....	120
4.1.4.3. Expressionsvektoren für Säugetierzellen .....	124
4.1.4.4. Plasmide .....	124
4.1.5. Oligonukleotide.....	125
4.1.6. Antikörper .....	128
4.1.7. Enzyme, Proteine und DNA.....	129
4.1.8. Kits .....	129
4.1.9. Computerprogramme .....	129
4.1.10. Datenbanken .....	129
4.1.11. Chemikalien.....	130
4.1.12. Medien und Medienzusätze.....	130
4.1.12.1. Medien und Medienzusätze für <i>E. coli</i> .....	130
4.1.12.2. Medien und Medienzusätze für <i>S.cerevisiae</i> .....	131
4.1.12.3. Medien und Medienzusätze für Säugetierzelllinien .....	132

---

4.1.13. Standardlösungen .....	132
4.2. Methoden .....	133
4.2.1. Molekularbiologische Methoden .....	133
4.2.1.1. Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> .....	133
4.2.1.2. Amplifikation von cDNA-Bibliotheken.....	133
4.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von DNA .....	134
4.2.1.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA .....	134
4.2.1.5. DNA-Agarose-Gelelektrophorese .....	134
4.2.1.6. Auffüllen von 5'-Überhängen bei DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden .....	135
4.2.1.7. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen.....	135
4.2.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten.....	135
4.2.1.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	136
4.2.1.10. DNA-Fällung .....	137
4.2.1.11. DNA-Sequenzierung .....	137
4.2.1.12. Klonierungen.....	137
4.2.2. Mikrobiologische Methoden.....	143
4.2.2.1. Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	143
4.2.2.2. Transformation durch Elektroporation .....	143
4.2.2.3. Lagerung transformierter Bakterien .....	144
4.2.3. Proteinbiochemische Methoden .....	144
4.2.3.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	144
4.2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	144
4.2.3.3. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen.....	145
4.2.3.4. Westernblotting .....	145
4.2.3.5. Expression von rekombinanten Fusionsproteinen durch IPTG- Induktion .....	146
4.2.3.6. Reinigung von HIS <sub>6</sub> -markierten Proteinen unter denaturierenden Bedingungen.....	147
4.2.3.7. Reinigung von GST-Fusionsproteinen .....	148
4.2.3.8. Reinigung von MBP-Fusionsproteinen.....	149
4.2.3.9. <i>In vitro</i> Bindungsexperimente.....	150
4.2.3.10. Immunpräzipitation aus Zellkulturlysat .....	151
4.2.3.11. Immunpräzipitation aus Extrakten von humanem Gehirn.....	151

4.2.3.12.	Filtertest .....	152
4.2.3.13.	Aggregationsexperimente mit aufgereinigten rekombinanten Proteinen.....	152
4.2.3.14.	Aggregationsexperimente mit Lysaten von Säugetierzellen.....	153
4.2.4.	Hefespezifische genetische und molekularbiologische Methoden.....	154
4.2.4.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe .....	154
4.2.4.2.	Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe .....	154
4.2.4.3.	Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen mittels der Lithiumacetat-Methode .....	155
4.2.4.4.	Y2H-cDNA-Bank Screen.....	155
4.2.4.5.	Y2H Array-Screen .....	156
4.2.4.6.	$\beta$ -GAL Test.....	157
4.2.4.7.	Lagerung von Hefezellen .....	158
4.2.4.8.	Aufbereitung von Hefezelllysaten für den Filtertest.....	158
4.2.4.9.	Bestimmung der Konversionsraten von Hefeprionen .....	158
4.2.4.10.	Bestimmung der Löslichkeit von Hefeprionen durch Zentrifugation .....	159
4.2.4.11.	Herstellung des Hefestammes GT17-SM.....	160
4.2.4.12.	Immunpräzipitation von endogenem Sup35 aus Hefezellen .....	160
4.2.4.13.	Präparation von Hefezellen für die Immunfluoreszenz-mikroskopie.....	161
4.2.4.14.	Präparation von Hefezellen für die Elektronenmikroskopie.....	162
4.2.4.15.	GdnHCl-Behandlung zur Eliminierung von Hefeprionen .....	164
4.2.4.16.	Eliminierung von Plasmiden mit URA3-Marker aus Hefezelle....	164
4.2.5.	Zellbiologische Methoden.....	164
4.2.5.1.	Auftauen von kryokonservierten Säugetierzellen .....	164
4.2.5.2.	Kultivierung und Lagerung von Säugetierzellen.....	165
4.2.5.3.	Transfektion von Säugerzellen.....	165
4.2.5.4.	Herstellung von Zelllysaten .....	166
4.2.5.5.	Präparation von COS-1 Zellen für die Immunfluoreszenz-mikroskopie.....	167
4.2.5.6.	Herstellung von Extrakten aus humanem Gehirn.....	167
4.2.6.	Immunologische Methoden .....	168
4.2.6.1.	Herstellung von Antikörpern.....	168



4.2.6.2.	Affinitätsreinigung von Antikörpern .....	168
5.	Zusammenfassung .....	170
6.	Abstract .....	172
7.	Literaturverzeichnis .....	174
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	195
9.	Publikationen .....	197
10.	Lebenslauf.....	198
11.	Anhang .....	199