

2. Identifizierung eines Protein-Interaktionsnetzwerks für Huntingtin

2.1. Ergebnisse

Huntingtin (Htt) und seine mutierte Form partizipieren an unterschiedlichsten zellulären Prozessen wie z.B. an der Transkriptionsregulation, an endozytotischen Prozessen, am intrazellulären Vesikel-Transport oder an postsynaptischen Signalübertragungsvorgängen. Obwohl bereits über 40 Proteine als Interaktionspartner für Htt oder seine mutierte Form identifiziert worden sind (Harjes and Wanker, 2003; Li and Li, 2004), wurde noch kein umfassendes Protein-Interaktionsnetzwerk für Htt publiziert. Ein solches Netzwerk hätte den Vorteil, dass nicht nur direkte, sondern auch indirekte Htt-Interaktionspartner, die mit Htt über ein oder zwei weitere Proteine in Verbindung stehen, berücksichtigt werden. Mit Hilfe des Hefe Two-Hybrid (Y2H) Systems können Protein-Interaktionen relativ schnell und effizient identifiziert werden (Fields and Song, 1989). Ein Ziel dieser Arbeit war die Erstellung eines Protein-Interaktionsnetzwerks für Htt mit Hilfe von Y2H-Analysen.

2.1.1. Das Y2H-System

Beim Y2H-System wird der modulare Aufbau von Transkriptionsfaktoren genutzt, die sich funktionell in eine DNA-Bindungsdomäne (DBD) und eine Aktivierungsdomäne (AD) unterteilen lassen (Abbildung 5). Um eine Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen, wird eines von ihnen mit der DBD (Bait-Protein) und das andere mit der AD (Prey-Protein) fusioniert. Anschließend werden beide Fusionsproteine gemeinsam in einem Y2H-Hefestamm exprimiert. Findet dabei eine Interaktion zwischen Bait- und Prey-Protein statt, so wird in den meisten Fällen ein funktioneller Transkriptionsfaktor rekonstruiert. Durch die Bindung des rekonstruierten Transkriptionsfaktors an seine spezifische DNA-Bindungssequenz wird die Expression von Reporter genen angeschaltet, auf deren Aktivität selektiert werden kann.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Y2H-System wurde die bakterielle LexA-DBD und die GAL4-AD von Hefe benutzt. Die verwendeten Y2H-Hefestämme waren L40ccU MAT α mit den Reporter genen *HIS3*, *URA3* und *lacZ* sowie L40cc MAT α mit den Reporter genen *HIS3* und *lacZ*.

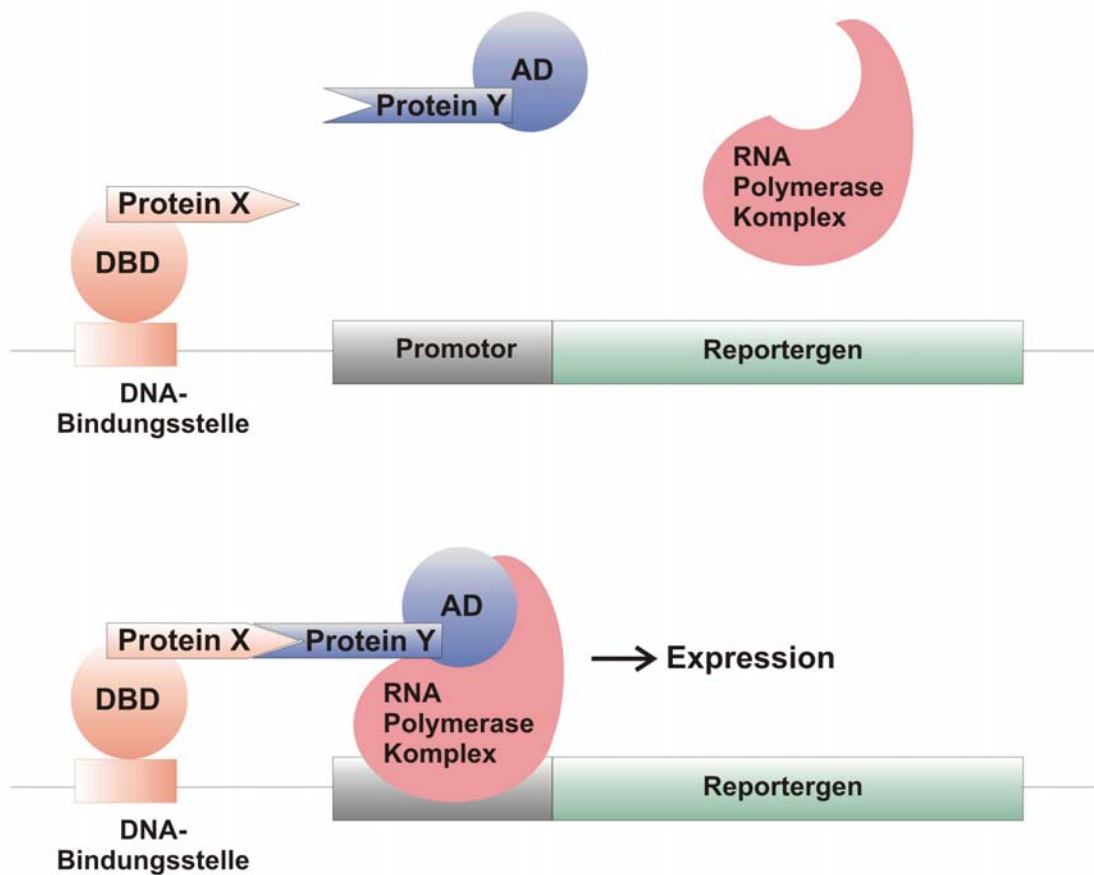


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Y2H-Systems.

Mit dem Y2H-System können Protein-Interaktionen durch cDNA-Bank- oder Array-Screens identifiziert werden (Abbildung 6). Mit einem cDNA-Bank-Screen wird innerhalb einer genomischen cDNA-Bibliothek nach Interaktionspartnern für ein vorgegebenes Bait-Protein gesucht. Die cDNA-Bibliothek besteht dabei aus einem Pool von cDNA-Fragmenten, die mit einer AD fusioniert worden sind. Idealerweise deckt eine cDNA-Bibliothek das gesamte Genom des jeweiligen Organismus ab. Bei einem cDNA-Bank-Screen werden die cDNA-Bibliothek und das Plasmid, welches für das

zu untersuchende Bait-Protein kodiert, in einen haploiden Y2H-Hefestamm cotransformiert. Die Transformanten werden anschließend unter selektiven Bedingungen kultiviert, sodass nur Hefezellen anwachsen können, in denen die Reportergene aufgrund einer Protein-Interaktion zwischen Bait- und Prey-Protein aktiviert worden sind. Im Folgenden muss aus diesen Transformanten das Prey-Plasmid isoliert und dessen Sequenz bestimmt werden. Dieser Screen ist zeit- und kostenaufwendig und zudem werden neben Proteinen oder größeren Proteinfragmenten auch oft kurze Peptide, die meist unspezifisch die Reportergene aktivieren, identifiziert. Der Vorteil eines cDNA-Bank-Screens ist aber, dass theoretisch das gesamte Proteom eines Organismus auf Interaktionen mit einem bestimmten Bait-Protein getestet werden kann.

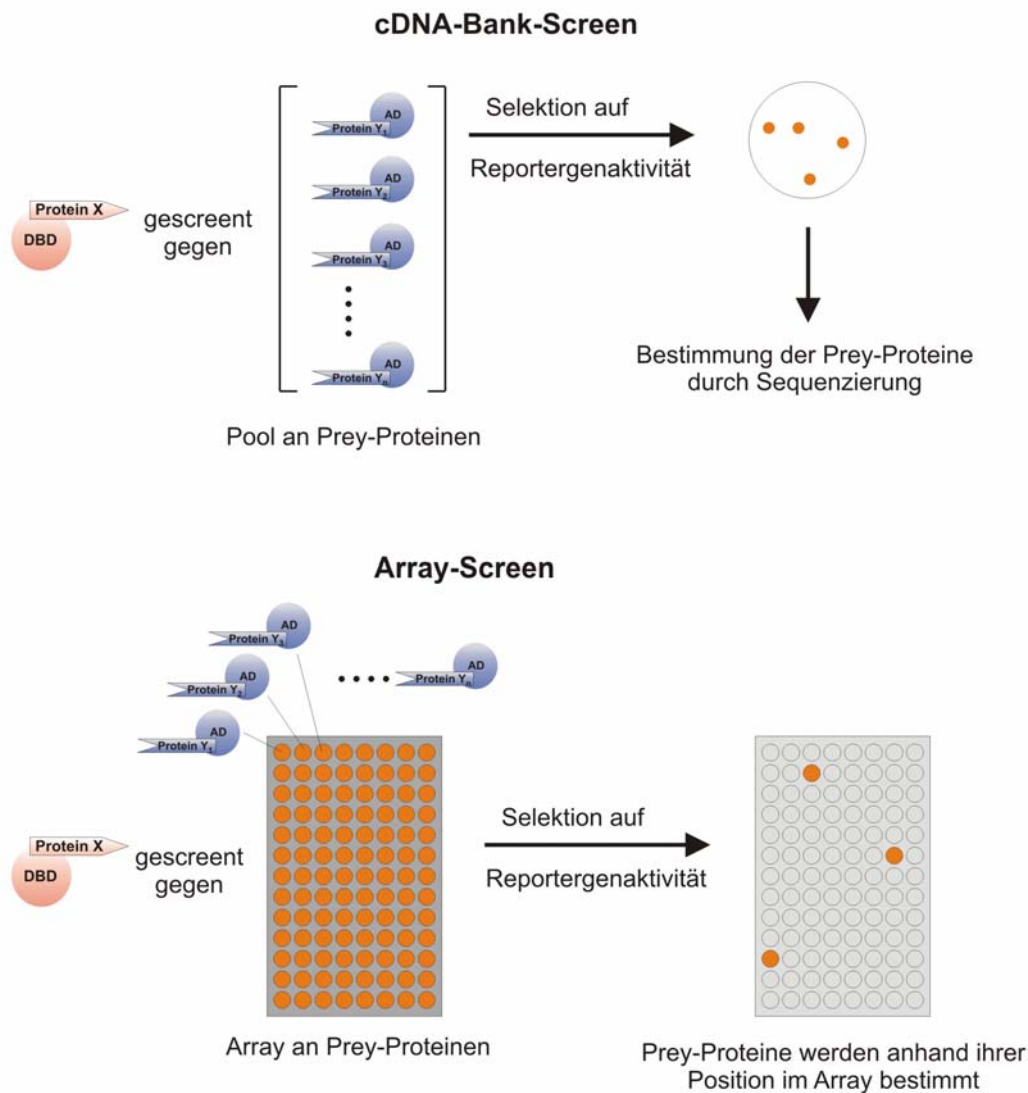


Abbildung 6: Schematische Darstellung des cDNA-Bank- und Array-Screens.

Mit einem Array-Screen wird nach Interaktionspartnern für ein Protein innerhalb einer Matrix gesucht. Die Matrix besteht aus systematisch in Mikrotiterplatten (MTPs) angeordneten Hefeklonen, die entweder Bait- oder Prey-Proteine synthetisieren. Um z.B. eine Prey-Matrix auf Interaktionen mit bestimmten Bait-Proteinen zu testen, werden Bait- und Prey-Proteine in haploiden Hefestämmen mit konträrem Matingtyp (MATa oder MAT α) exprimiert. Bei der systematischen Paarung der Hefestämme (Mating) können MATa- und MAT α -Hefen zu diploiden Hefezellen verschmelzen, die dann sowohl ein Bait- als auch ein Prey-Protein besitzen. Zur Identifikation von Protein-Interaktionen werden die diploiden Zellen auf ihre Reporterogenaktivität überprüft. Bei positiven Klonen kann der Interaktionspartner sofort aufgrund seiner Position in der Matrix bestimmt werden. Wenn eine Matrix zur Verfügung steht, lassen sich mit dieser Methode schnell und effizient Protein-Interaktionen identifizieren. Limitiert wird der Array-Screen nur durch die Anzahl der Proteine in der Matrix.

2.1.2. Amplifizierung von Y2H-cDNA-Bibliotheken

Für die cDNA-Bank-Screens wurden kommerziell erhältliche cDNA-Bibliotheken (Clontech), die von humanem fötalem Gehirngewebe (pACT2-HFB), von humanen Gehirnmaterial (pGAD10-HB) oder von Mäusegehirnen (pGAD10-MB) amplifiziert wurden, verwendet. Bei diesen Bibliotheken sind die cDNA-Fragmente am 3' Ende der Sequenz, die für GAL4-AD kodiert, fusioniert. Für cDNA-Bank-Screens mussten die cDNA-Bibliotheken vervielfältigt werden. Da bei jeder Amplifizierung selektiv bestimmte AD-Plasmide oder sogar leere Vektoren angereichert werden können, wurden Qualitätskontrollen durchgeführt. Dabei wurden je 48 cDNA-Fragmente mittels Kolonie-PCR amplifiziert und auf einem Agarosegel überprüft. Als Beispiel für eine Qualitätskontrolle ist hier die Amplifizierung einer pGAD10-HB-Bibliothek abgebildet (Abbildung 7). Die unterschiedlichen Größen der PCR-Produkte bestätigen die Qualität der amplifizierten cDNA-Bibliothek. Die in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Bibliotheken wiesen eine durchschnittliche cDNA-Fragmentgröße von 1,2 kb auf.

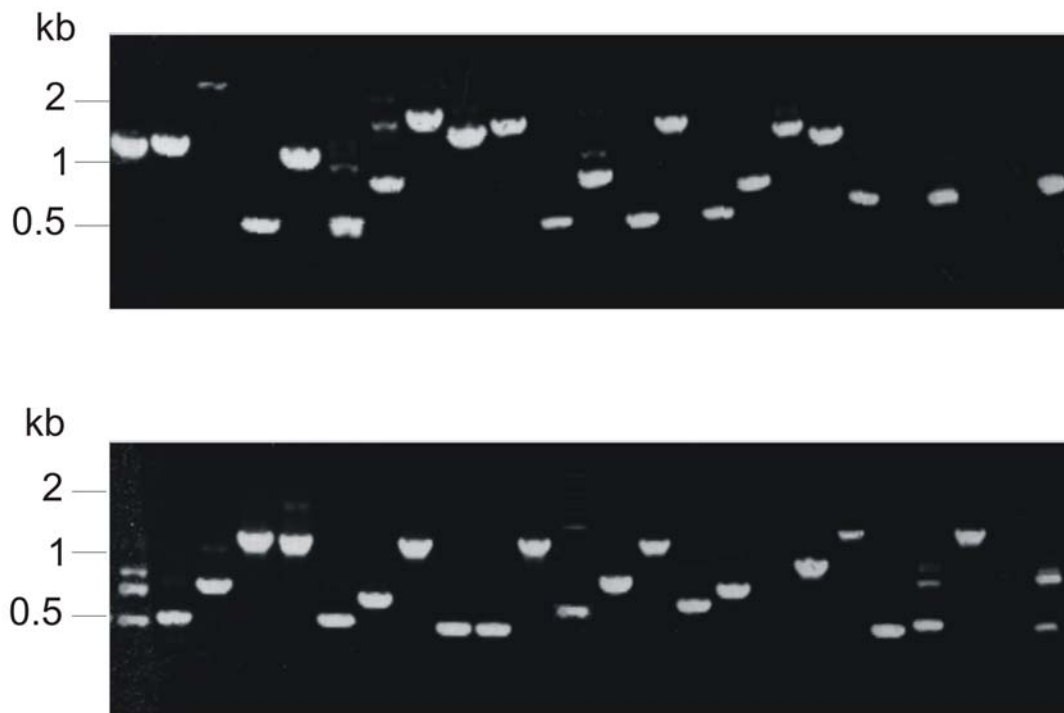


Abbildung 7: Qualitätskontrolle für eine in *E. coli* amplifizierte pGAD-HB-Bibliothek. 48 cDNA-Fragmente von *E. coli* Klonen wurden mittels Kolonie-PCR amplifiziert und die Größe der DNA-Fragmente wurde auf einem 0,8 %igen Agarosegel anhand von Standards abgeschätzt.

2.1.3. Strategie zur Identifizierung des Htt-Protein-Interaktionsnetzwerkes

Für die Erstellung eines Htt-Protein-Interaktionsnetzwerkes ist es notwendig Proteine zu identifizieren, die entweder direkt oder indirekt mit Htt interagieren, und anschließend die ermittelten Interaktionspaare miteinander zu verknüpfen. Um dies zu erreichen, wurden in dieser Arbeit aufeinander aufbauende cDNA-Bank- und Array-Screens durchgeführt. In Abbildung 8 ist die Reihenfolge dieser Y2H-Screens dargestellt.

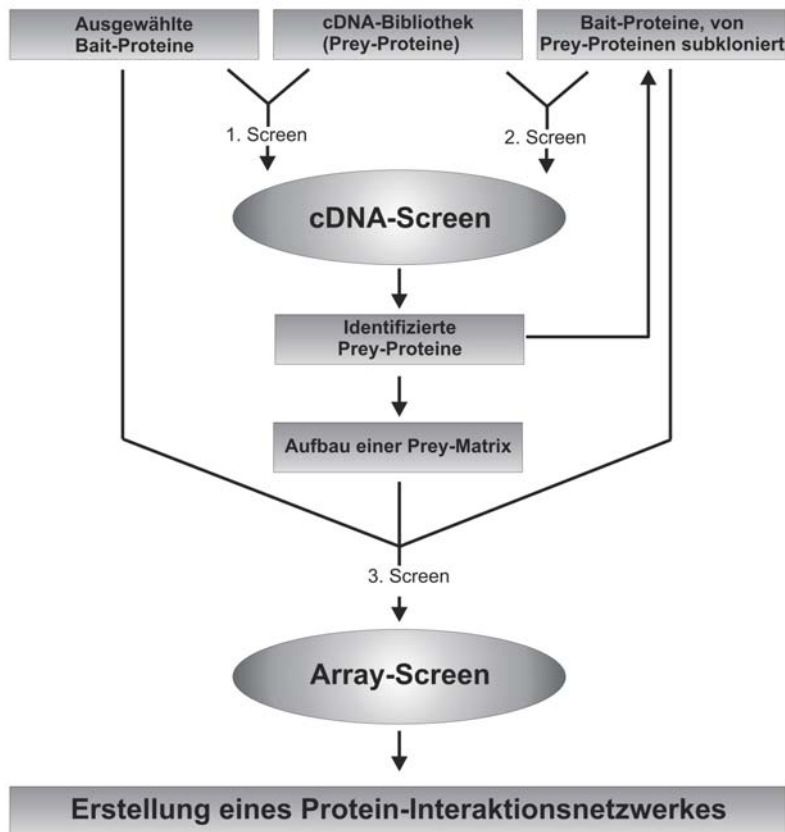


Abbildung 8: Systematische Durchführung von Y2H-Screens zur Erstellung eines Protein-Interaktionsnetzwerkes für Htt.

2.1.4. Auswahl der Bait-Proteine für den ersten cDNA-Bank-Screen

In dieser Arbeit wurden zuerst 7 verschiedene Htt-Fragmente als Bait-Proteine in cDNA-Bank-Screens eingesetzt (Abbildung 9). Um spezifische polyglutaminabhängige Interaktionspartner von Htt zu identifizieren, wurden unter anderem Proteine verwendet, die für N-terminale Htt-Fragmente mit und ohne Polyglutamin-Sequenzverlängerung kodieren. Die entsprechenden Htt-Bait-Plasmide wurden zusammen mit einem leeren AD-Vektor in den Hefestamm L40ccU MATa transformiert und die resultierenden Klone auf Autoaktivierung der Reportergene getestet (Abbildung 9, Tabelle 1). Dabei erwies sich das Fragment HD510Q68 als autoaktivierend und wurde somit von weiteren cDNA-Bank-Screens ausgeschlossen.

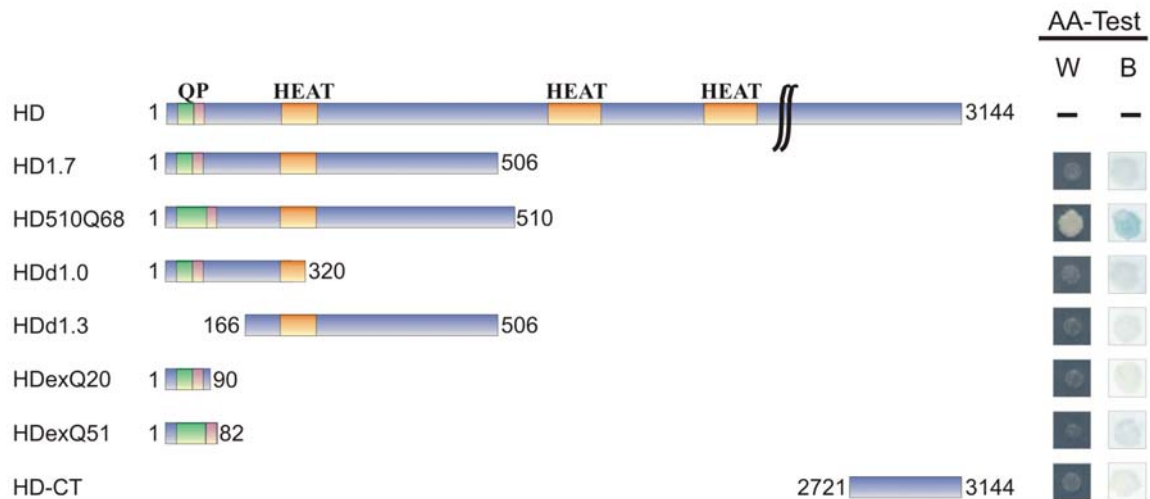


Abbildung 9: Struktur der verwendeten Htt-Fragmente und Ergebnis des Autoaktivierungstests. Für den Autoaktivierungstest wurde jedes DBD-Plasmid mit einem leeren AD-Vektor in den Hefestamm L40ccU MATa transformiert und die Cotransformanten wurden auf Minimalmedium mit Zusatz von Histidin und Uracil (SD2-Medium) selektiert. Die erhaltenen Klone wurden in flüssiges SD2-Medium eingerührt, dann auf SD-Medium ohne Zusatz von Aminosäuren (SD4-Medium) und auch auf SD2-Medium mit Membran gestempelt und für 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Membran wurde anschließend mit dem β -GAL Test prozessiert (vgl. Seite 155). Hefezellen, bei denen die Reportergene *HIS3* und *URA3* exprimiert werden, können auf SD4-Medium wachsen. Zeigen Hefekolonien eine Blaufärbung im β -GAL Test, so ist das Reportergen *lacZ* aktiviert worden. Das DBD-Plasmid HD510Q68 ist autoaktivierend, da Hefezellen, die HD510Q68 exprimieren, auf SD4-Medium wachsen und nach dem β -GAL Test blau gefärbt sind. W= Wachstum auf SD4-Medium; B= β -GAL Test.

Tabelle 1: Übersicht der im ersten cDNA-Bank-Screen eingesetzten Bait-Proteine

Bezeichnung	Beschreibung	Prot-ID	Match	Vektor	AA-Test	hEX1
HD1.7	Huntingtin	P42858	1-506	pBTM117c	-	-
HD510Q68	Huntingtin	P42858	1-510	pBTM117c	+	-
HDd1.0	Huntingtin	P42858	1-320	pBTM117c	-	-
HDd1.3	Huntingtin	P42858	166-506	pBTM117c	-	-
HDexQ20	Huntingtin	P42858	1-90	pBTM116	-	-
HDexQ51	Huntingtin	P42858	1-82	pBTM116	-	-
HD-CT	Huntingtin	P42858	2721-3144	pBTM117c	-	-
14-3-3	14-3-3 Protein Epsilon	P42655	93-255	pBTM117c	+	-
ACTG1	Gamma-Actin	P02571	182-375	pBTM117c	-	+
ALBU	Serum-Albumin Vorläufer	P02768	1-249	pBTM117c	-	+
ALDA	Fructose-Bisphosphat Aldolase A	P04075	1-363	pBTM117c	-	+
AMPL	Zytosolische Aminopeptidase	P28838	46-487	pBTM117c	-	+
ARF4L	ADP-Ribosylierungsfaktor ähnliches Protein 4L	P49703	33-201	pBTM117c	-	+
ASNS	Glutaminabhängige Asparagin Synthetase	P08243	318-560	pBTM117c	-	+
BARND1	BRCA1 assoziiertes Ringdomänen-Protein1	Q99728	1-379	pBTM117c	-	+
BCK	Kreatinkinase, B Kette	P12277	92-381	pBTM117c	-	+
CLH-17N	Schwere Kette 1 von Clathrin	Q00610	1-289	pBTM117c	-	-
CLH-17C	Schwere Kette 1 von Clathrin	Q00610	1165-1671	pBTM117c	-	-
CLK1	Proteinkinase CLK1	P49759	209-484	pBTM117c	-	+
DNAJ	DnaJ homologes Protein, Unterfamilie A-1	P31689	113-379	pBTM117c	+	+
GADD45G	Wachstum stoppendes und durch DNA-Schädigung induzierbares Protein GADD45G	O95257	18-159	pBTM117c	-	+
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase	P04406	1-334	pBTM117c	-	+
hADA3	ADA3 ähnliches Protein	O75528	235-432	pBTM117c	-	+
HIP1	Huntingtin interagierendes Protein1	O00291	245-631	pBTM117c	+	-
HIP2	Ubiquitin konjugierendes Enzym E2-25 kDa	P27924	1-200	pBTM117c	-	-
IMPD2	Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase 2	P12268	34-514	pBTM117c	-	+
KPNB1	Karyopherin beta-1 Untereinheit	Q14974	668-876	pBTM117c	-	+
LDHB	L-Lactat Dehydrogenase b Kette	P07195	96-333	pBTM117c	-	+
mAP2A1	α -Adaptin A (Maus)	P17426	697-971	pBTM117c	+	-
mAP2A2	α -Adaptin C (Maus)	P17427	697-938	pBTM117c	+	-
MDHM	Malat Dehydrogenase, mitochondrialer Vorläufer	P40926	1-338	pBTM117c	-	+
mHAP	Huntingtin assoziiertes Protein 1 (Maus)	O35668	3-471	pBTM117c	+	+
MOV34	MOV34 Isolog	O15387	76-297	pBTM117c	-	+
mp53	Zelluläres Tumor Antigen p53 (Maus)	P02340	73-390	pBTM116	-	-
NSFL1C	p97 Cofactor p47	Q9UNZ2	201-370	pBTM117c	-	+
PEBP	Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein	P30086	1-186	pBTM117c	-	+
PHGDH	D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase	O43175	1-553	pBTM117c	-	+
PLD2	Phospholipase D2	O14939	168-336	pBTM117c	-	+
RFA	Replikationsprotein A 70 kDa DNA-bindende Untereinheit	P27694	262-616	pBTM117c	+	+
SH3GL3	GRB2 ähnliches Protein 3 mit SH3 Domäne	Q99963	3-347	pBTM117c	+	-
TAL	Transaldolase	P37837	3-337	pBTM117c	-	+
TCPG	T-Komplex Protein 1, Gamma- Untereinheit	P49368	252-544	pBTM117c	-	+
TIP49	49 kDa TBP-interagierendes Protein	Q9Y265	1-456	pBTM117c	-	+
TRFE	Serotransferrin Vorläufer	P02787	213-698	pBTM117c	-	+
TUBA1	Alpha-Tubulin 1	P05209	1-451	pBTM117c	-	+
TUBB4	Beta-4 Kette von Tubulin	Q13509	113-450	pBTM117c	-	+
UBC1	Polyubiquitin C	Q9UEF2	1-685	pBTM117c	-	+
VIM	Vimentin	P08670	1-465	pBTM117c	-	+
ZNF33B	Zinkfinger Protein 33b	Q8NDW3	527-778	pBTM117c	-	+
ZFR	ZNF259	O75312	29-460	pBTM117c	+	+

Prot-ID: Referenznummer des Proteins in der Datenbank SwissProt oder TrEMBL; Match: Übereinstimmung der Aminosäuren mit dem unter der ProtID aufgeführten Protein; AA-Test: Autoaktivierungstest; hEX1: hEX1-cDNA-Bibliothek.

Neben den Htt-Fragmenten wurden noch 43 weitere Fragmente als Bait-Proteine für den ersten cDNA-Bank-Screen ausgewählt (Tabelle 1). Unter diesen Proteinen sind 5 bereits bekannte direkte Interaktionspartner von Htt und 38 Proteine, die an der Transkriptionsregulation, an endozytotischen Prozessen, am intrazellulären Vesikel-Transport, an Signalübertragungsvorgängen, an der Proteinbiosynthese oder an metabolischen Prozessen beteiligt sind. Die cDNA-Fragmente, die für diese Proteine kodieren, wurden größtenteils von der humanen hEX1-cDNA-Bibliothek (Bussow et al., 1998) in den DBD-Vektor pBTM117c subkloniert oder standen bereits als Bait-Plasmide in den Vektoren pBTM117c oder pBTM116 zur Verfügung. Alle Bait-Proteine wurden auf Autoaktivierung der Reportergene getestet. In der Tabelle 1 sind alle ausgewählten Proteine sowie das Ergebnis des Autoaktivierungstests aufgelistet.

2.1.5. Identifizierung von Protein-Interaktionen durch cDNA-Bank-Screens

Insgesamt wurden 40 nicht autoaktivierende Bait-Proteine für den ersten cDNA-Bank-Screen verwendet. Hefezellen, die ein Bait-Protein exprimierten, wurden mit je 100 µg cDNA-Bibliothek transformiert und auf Reporterogenaktivität getestet. Nach 5-10 Tagen Inkubation auf SD4-Medium wuchsen insgesamt 786 Hefekolonien an. Diese wurden in flüssiges SD4-Medium eingerührt, auf SD4-Medium mit und ohne Membran gestempelt und für weitere 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Die *lacZ*-Aktivität von Hefekolonien, die auf den Membranen wuchsen, wurden dann durch den β-GAL Test überprüft. Insgesamt wurden 329 Hefeklone identifiziert, die sowohl Wachstum auf SD4-Medium als auch Blaufärbung im β-GAL Test zeigten. Von diesen Klonen wurden die Y2H-Plasmide isoliert und in den *E. coli* Stamm HB101 transformiert, in dem die Prey-Plasmide aufgrund des *LEU2*-Markergens selektiv amplifiziert werden können. Da mit einer relativ hohen Konzentration an cDNA-Bibliothek transformiert wurde, können in einer Hefezelle mehrere Prey-Plasmide auftreten. Daher wurde das Prey-Plasmid aus je zwei HB101-Klonen isoliert und mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen analysiert (Abbildung 10). Anhand des Restriktionsmusters wurden diejenigen Prey-Plasmide ausgesucht, die für Retransformationsexperimente benutzt wurden. Bei gleichem Restriktionsmuster zweier Prey-Plasmide, die aus einer Hefekolonie isoliert wurden, wurde eines davon und bei unterschiedlichen Mustern beide

Prey-Plasmide ausgewählt. Alle Prey-Plasmide, bei denen im Restriktionsverdau kein sichtbares Fragment oder anormale Vektorbanden entstanden, wurden verworfen. Insgesamt erfüllten 289 Prey-Plasmide die Auswahlkriterien.

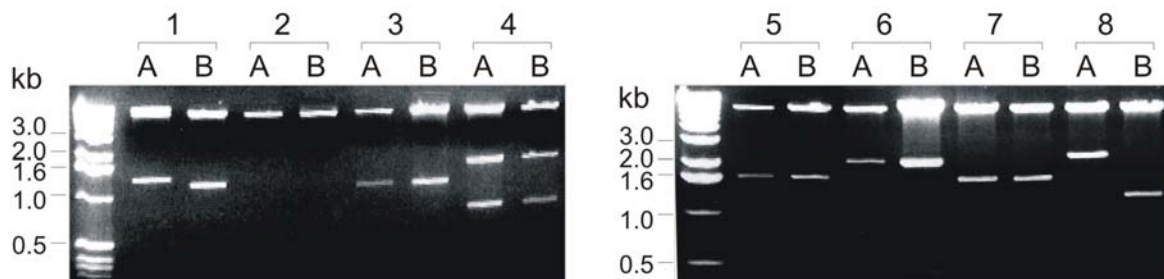
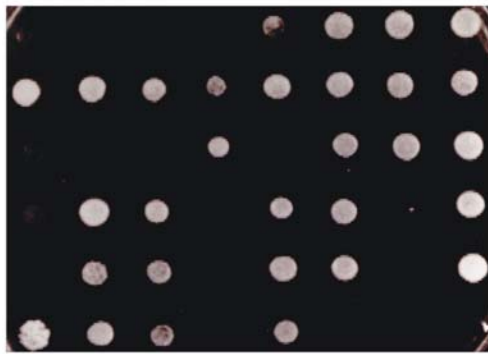


Abbildung 10: Analyse von je zwei Prey-Plasmiden (A, B) aus 8 Hefekolonien, die auf Reporteragenaktivität selektiert wurden. Die Plasmid-DNAs wurden mit dem Enzym *Bgl*II verdaut und die Größen der cDNA-Fragmente über ein 0,8 %iges Agarosegel abgeschätzt. Klon 2 wurde verworfen, da kein Fragment ($> 0,2$ kb) durch den *Bgl*II Verdau entstand. Bei Klon 1 und 8 wurden beide Plasmide (A, B) für Retransformationsexperimente benutzt, da unterschiedliche Prey-Plasmide aus einer Hefekolonie isoliert wurden.

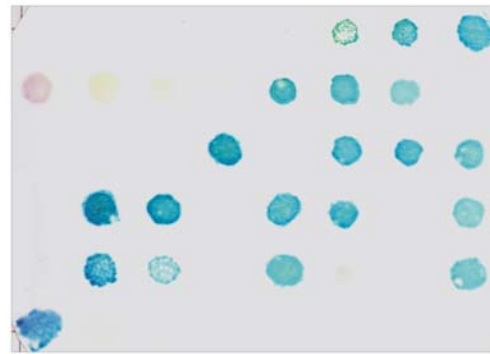
Die im Screen identifizierten Interaktionen wurden durch Retransformationsexperimente überprüft. Dafür wurde jeweils ein Prey-Plasmid mit dem entsprechenden Bait-Plasmid in L40ccU MATa Zellen cotransformiert. Die resultierenden Transformatanten wurden dann in MTP in flüssiges SD4-Medium eingerührt und zur Überprüfung der Reporteragenaktivität auf SD4-Medium mit und ohne Membranen gestempelt. Nach 4-tägiger Inkubation wurden die Membranen dem β -GAL Test unterzogen. Dabei konnten insgesamt 130 Hefezellen identifiziert werden, bei denen entweder zwei Reportergene (*HIS3*, *URA3*) oder alle drei Reportergene (*HIS3*, *URA3*, *lacZ*) exprimiert wurden. Somit wurden 130 der im cDNA-Bank-Screen identifizierten Interaktionspaare in einem unabhängigen Y2H-Experiment bestätigt. Abbildung 11 zeigt ein typisches Ergebnis der Retransformation.

Wachstumstest: Reportergene *HIS3*, *URA3*



SD4-Medium

β -Gal-Test: Reportergen *LacZ*



SD4-Medium mit Membran

Abbildung 11: Retransformation von 48 Bait-/Prey-Plasmidpaaren zur Bestätigung der im cDNA-Bank-Screen detektierten Protein-Interaktionen.

Um die Identität der Prey-Proteine zu bestimmen, wurden die cDNA-Fragmente der entsprechenden Plasmide von ihrem 5'-Ende her ansequenziert und die erhaltenen Sequenzen in allen 3 Leserahmen analysiert. Von den 130 Plasmiden kodierten 49 für ein Protein, bei den restlichen ergab die Analyse nur eine kurze Peptidsequenz von weniger als 30 Aminosäuren. Alle Interaktionen, bei denen nur ein Peptid als Prey-Protein beteiligt war, wurden verworfen. Unter den 49 Protein-Interaktionen traten 6 Interaktionspärchen mehrfach auf. Im ersten cDNA-Bank-Screen wurden daher insgesamt 41 Protein-Interaktionen zwischen 18 Bait-Proteinen und 38 Prey-Proteinen identifiziert. Eine detaillierte Übersicht über diese Ergebnisse ist in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Ergebnis des ersten cDNA-Bank-Screens

Bait-Protein	Identifiziertes Prey-Protein	Beschreibung Prey-Protein	cDNA-Bibliothek ¹	Anzahl ²
HD1.7	HIP1	Huntingtin interagierendes Protein 1	HB	1
HD1.7	HIP5	Protein unbekannter Funktion; Huntingtin interagierendes Protein 5	HFB	1
HD1.7	HIP11	Protein unbekannter Funktion; Huntingtin interagierendes Protein 11	HFB	1
HD1.7	HIP16	Protein unbekannter Funktion; Huntingtin interagierendes Protein 16	HFB	1
HD1.7	SH3GL3	GRB2 ähnliches Protein 3 mit SH3 Domäne	HB	1
HDd1.0	FEZ1	Fasciculation- und Elongationsprotein Zeta 1	HFB	1
HDd1.0	GIT1	ARF GTPase aktivierendes Protein GIT1	HFB	1
HDd1.3	IKAP	IKK Komplex assoziiertes Protein	HFB	1
HDexQ20	HIP13	Protein unbekannter Funktion; Huntingtin interagierendes Protein 13	HFB	1
HDexQ20	HYP A	Huntingtin interagierendes Protein HYP A/FBP11	HFB	2
HDexQ20	PFN2	Profilin II	HFB	1
HDexQ51	CA150	Transkriptionsfaktor CA150	HFB	1
HDexQ51	CGI-125	CGI-125 Protein	HFB	2
HDexQ51	HIP15	Protein unbekannter Funktion; Huntingtin interagierendes Protein 15	HFB	1
HDexQ51	HP28	Axoniales Dynein, leichte Kette	HB	1
BARD1	BAIP3	Protein unbekannter Funktion; Bard1 interagierendes Protein 3	HFB	1
BARD1	SETDB1	Histon-Lysin N-Methyltransferase	HFB	1
BARD1	PLIP	cPLA2 interagierendes Protein	HFB	1
CLH-17N	Ku70	ATP abhängige DNA-Helicase II, 70 kDa Untereinheit	HFB	1
CLK1	PIASy	Proteininhibitor von aktiviertem STAT Protein Gamma	HFB	1
GADD45G	EF1A	Translations-Elongationsfaktor 1 Alpha	HFB	1
GADD45G	EF1G	Elongationsfaktor 1 Gamma	HFB	1
GADD45G	GDF9	Wachstums- und Differenzierungsfaktor 9	HFB	1
GADD45G	G45IP1	Protein unbekannter Funktion; GADD45G interagierendes Protein 1	HFB	1
GADD45G	G45IP2	Protein unbekannter Funktion; GADD45G interagierendes Protein 2	HFB	1
GADD45G	G45IP3	Protein unbekannter Funktion; GADD45G interagierendes Protein 3	HFB	1
GADD45G	PTPK	Protein-Tyrosin-Phosphatase Kappa, Vorläufer	HFB	1
hADA3	MAGEH1	Melanoma assoziiertes Antigen H1	HFB	1
HIP2	PIASy	Proteininhibitor von aktiviertem STAT Protein Gamma	HFB	1
IMPD2	PIASy	Proteininhibitor von aktiviertem STAT Protein Gamma	HFB	1
KPNB1	PTN	Pleiotrophin Vorläufer	HFB	1
mp53 (Maus)	p53	Zelluläres Tumor Antigen p53	HB	1
TAL	HZFH	Zinkfinger Helicase HZFH	HFB	1
TCPG	Ku70	ATP abhängige DNA-Helicase II, 70 kDa Untereinheit	HFB	1
VIM	ALEX2	Armadillo Repeat Protein ALEX2	HFB	1
VIM	DRP-1	Dihydropyrimidinase verwandtes Protein 1	HFB	2
VIM	HSPC232	HSPC232	HFB	2
VIM	MOV34	MOV34 Isolog	HFB	1
VIM	NEFL	Neurofilament Protein	HFB	2
VIM	VIMc	Vimentin (C-terminus)	HFB	4
ZNF33B	mHAP1	Huntingtin assoziiertes Protein 1 (Maus)	MB	1

¹ benutzte cDNA-Bibliotheken: HB, Humanes Gehirn; HFB, Humanes fötales Gehirn; MB, Gehirn von Mäusen; ² Anzahl der identifizierten Protein-Interaktionen

2.1.6. Auswahl der Proteine für den zweiten cDNA-Bank-Screen

Um weitere Protein-Interaktionen zu identifizieren, wurde ein zweiter cDNA-Bank-Screen durchgeführt. Dafür wurden 12 Prey-Proteine aus dem ersten Screen ausgewählt, die direkt mit Htt interagieren, was durch *in vitro* Bindungsexperimente oder Literaturdaten bestätigt werden konnte (Tabelle 3). Die cDNA-Fragmente dieser Prey-Proteine wurden in den DBD-Vektor subkloniert und die resultierenden Bait-Plasmide wurden zusammen mit einem AD-Vektor in L40ccU MATa Zellen transformiert. Die resultierenden Klone wurden dann auf Reporterogenaktivität überprüft (Tabelle 3). Von den selektierten Proteinen erwiesen sich GIT1 und FEZ1 als autoaktivierende Bait-Proteine und wurden vom zweiten cDNA-Bank-Screen ausgeschlossen.

Tabelle 3: Bait-Proteine für den zweiten cDNA-Bank-Screen

Protein	Auswahlkriterium	AA-Test
CA150	Interaktion mit Htt, durch Literaturdaten bestätigt (Holbert et al., 2001)	-
EF1A	Literaturdaten, EF1A in Htt-Aggregaten nachgewiesen (Mitsui et al., 2002)	-
EF1G	Literaturdaten, EF1G in Htt-Aggregaten nachgewiesen (Vanwetswinkel et al., 2003)	-
FEZ1	Interaktion durch <i>in vitro</i> Bindungsexperimente bestätigt (Abbildung 15)	+
GIT1	Interaktion durch <i>in vitro</i> Bindungsexperimente bestätigt (Abbildung 15)	+
HIP5	Interaktion durch <i>in vitro</i> Bindungsexperimente bestätigt (Abbildung 15)	-
HIP11	Interaktion durch <i>in vitro</i> Bindungsexperimente bestätigt (Abbildung 15)	-
HYP A	Interaktion durch Literaturdaten bestätigt (Faber et al., 1998)	-
NEFL	Interaktion durch Literaturdaten bestätigt (Carpenter and Ip, 1996)	-
PIASy	Interaktion durch <i>in vitro</i> Bindungsexperimente bestätigt (Abbildung 15)	-
PLIP	Interaktion durch Literaturdaten bestätigt (Dechend et al., 1999)	-
p53	Interaktion durch Literaturdaten bestätigt (Steffan et al., 2000)	-

AA-Test: Autoaktivierungstest

Der zweite cDNA-Bank-Screen wurde wie für den ersten Screen beschrieben durchgeführt. Nach der Transformation der cDNA-Bibliothek wuchsen 98 Hefekolonien auf SD4-Medium, von denen 70 auch das Reportergen *lacZ* exprimierten. Restriktions- und Retransformationsanalysen führten zur Auswahl von 40 Prey-Plasmiden, die dann sequenziert wurden. Im zweiten cDNA-Bank-Screen wurden 21 Protein-Interaktionen identifiziert, von denen 4 mehrfach detektiert wurden. Insgesamt

konnten zwischen 5 Bait- und 14 Prey-Proteinen 14 unterschiedliche Interaktionen detektiert werden. Da das Prey-Protein EF1G dimerisiert, wurden *de facto* nur 13 zusätzliche Prey-Proteine identifiziert. Die Ergebnisse des zweiten cDNA-Bank-Screens sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Ergebnis des zweiten cDNA-Bank-Screens

Bait-Protein	Identifiziertes Prey-Protein	Beschreibung Prey-Protein	cDNA-Bibliothek	Anzahl*
CA150	LUC7B1	SR Protein LUC7B1	HFB	1
EF1G	EF1G	Elongationsfaktor 1 Gamma	HFB	1
HIP5	360a ¹	Protein unbekannter Funktion	HFB	1
HIP5	HBO1	ORC bindende Histonacetyltransferase	HFB	4
HIP5	NAG4	Bromodomäne enthaltendes Protein NAG4	HFB	1
HIP5	347a ²	Protein unbekannter Funktion	HFB	1
HIP5	HMP	Mitofilin	HFB	2
HIP5	KPNA2	Karyopherin Alpha-2 Untereinheit	HFB	1
HIP5	CGI-74	CGI-74 Protein	HFB	1
HIP5	APP1	Amyloid ähnliches Protein 1 Vorläufer	HFB	1
HYP A	ZHX1	Zinkfinger Homeobox Protein ZHX1	HFB	1
PIASy	SUMO-2	Ubiquitin ähnliches Protein SMT3A (SUMO-2)	HFB	3
PIASy	SUMO-3	Ubiquitin ähnliches Protein SMT3B (SUMO-3)	HFB	2
PIASy	MAP1lc3	Mikrotubulin assoziiertes Protein 1A/1B, leichte Kette 3	HFB	1

* Häufigkeit der identifizierten Protein-Interaktionen; ¹ später umbenannt in BAIP1; ² später umbenannt in BAIP2.

2.1.7. Identifizierung von Protein-Interaktionen durch den Array-Screen

Mit beiden cDNA-Bank-Screens konnten 55 Protein-Interaktionen zwischen 23 Bait- und 51 Prey-Proteinen identifiziert werden. Mit dem Array-Screen wurde nun untersucht, ob auch zwischen den einzelnen interagierenden Proteinpärchen Interaktionen bestehen. Um möglichst viele Proteine sowohl als Bait- als auch als Prey-Proteine einsetzen zu können, wurden für den Array-Screen noch 27 cDNA-Fragmente, die für positive Prey-Proteine aus den cDNA-Bank-Screens kodieren, in den DBD-Vektor subkloniert (Tabelle 5). Nach dem Autoaktivierungstest standen schließlich weitere 23 Bait-Konstrukte zur Verfügung, so dass im Array-Screen 2 346 potentielle Protein-Interaktionen zwischen 46 Bait- und 51 Prey-Proteinen überprüft werden konnten.

Tabelle 5: Zusammenstellung der zusätzlichen Bait-Proteine für den Array-Screen

Bait	AA	Bait	AA	Bait	AA
ALEX	-	HIP11	-	NEFL	-
APP1	-	HIP13	-	PFN2	-
BAIP3	-	HMP	-	PLIP	-
DRP-1	-	HZFH	-	PTN	-
EF1a	-	IKAP	+	PTPK	-
GAPDH	-	KPNA2	+	SETDB1	-
GDF9	-	Ku70	-	SUMO-3	-
G45IP1	+	MAGEH1	-	ZHX1	-
G45IP3	-	MAP1lc3	+		
HBO1	+	MOV34	-		

AA-Test: Autoaktivierungstest

Für den Array-Screen wurden die 51 Prey-Plasmide und als Kontrolle der AD-Vektor jeweils einzeln in den Hefestamm L40cc MAT α transformiert. Die Transformaten wurden in flüssigem Selektivmedium angezogen und dann systematisch in einer MTP angeordnet, wodurch eine Prey-Matrix generiert wurde. Nach der Transformation der 46 Bait-Plasmide und des DBD-Vektors in L40ccU MAT α Zellen wurden die resultierenden Klone in flüssigem Medium angezogen. Die Prey-Matrix wurde 47 mal repliziert und jeweils mit einer Bait-Kultur versetzt. Die entstandenen Gemische wurde auf Vollmedium (YPD) gestempelt und zum Mating für 36 h bei 30 °C inkubiert. Zur Selektion diploider Zellen wurden die Hefekolonien auf SD2-Medium übertragen und nach 2-tägiger Wachstumsphase auf SD4-Medium mit und ohne Membran gestempelt (Abbildung 12). Nach 4 Tagen bei 30 °C wurden die Membranen mit dem β -GAL Test prozessiert und der Screen ausgewertet.

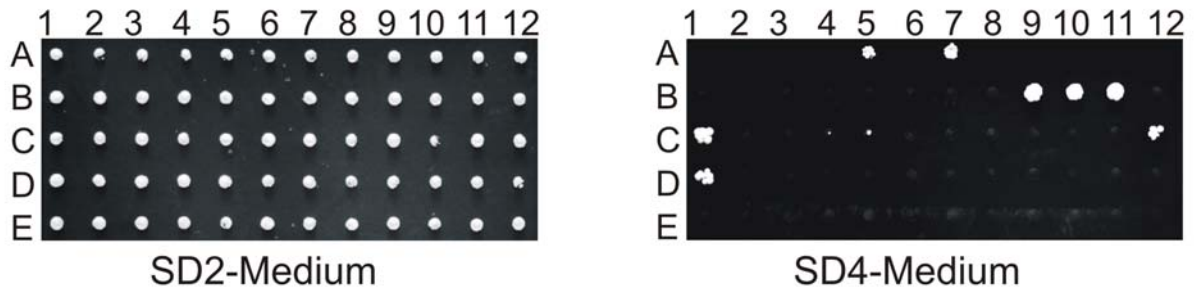


Abbildung 12: Identifizierung von Protein-Interaktionen durch den Array-Screen. Array-Screen des Bait-Proteins HDexQ51 gegen die Prey-Matrix, die aus 51 Prey-Proteinen und 9 Kontrollen besteht. Gezeigt ist der Wachstumstest. Prey-Positionen: A5: HP28; A7: SH3GL3; B9: CA150; B10: HIP15; B11: PFN2; C1: HIP13; C12: CGI-125; D1: HYPA.

Im Array-Screen konnten alle Protein-Interaktionen aus den beiden cDNA-Bank-Screens bestätigt werden. Zusätzlich wurden weitere 131 Protein-Interaktionen detektiert, die auch in einem unabhängigen Y2H-Experiment, nämlich durch Cotransformation der entsprechenden Bait- und Prey-Proteine in den Hefestamm L40ccU MATa, reproduziert werden konnten. Somit wurden in den drei Y2H-Screens insgesamt 186 Protein-Interaktionen zwischen 35 Bait- und 51 Prey-Proteinen identifiziert. Da einige Proteine sowohl als Bait- als auch als Prey-Protein vorkamen, besteht das Htt-Netzwerk aus 64 unterschiedlichen Proteinen. Zwischen den 186 Interaktionen bestehen Querverbindungen, so dass ein Protein-Interaktionsnetzwerk generiert werden konnte (Abbildung 13). In Abbildung 14 sind alle identifizierten Protein-Interaktionen in Form einer Interaktionsmatrix zusammengestellt.

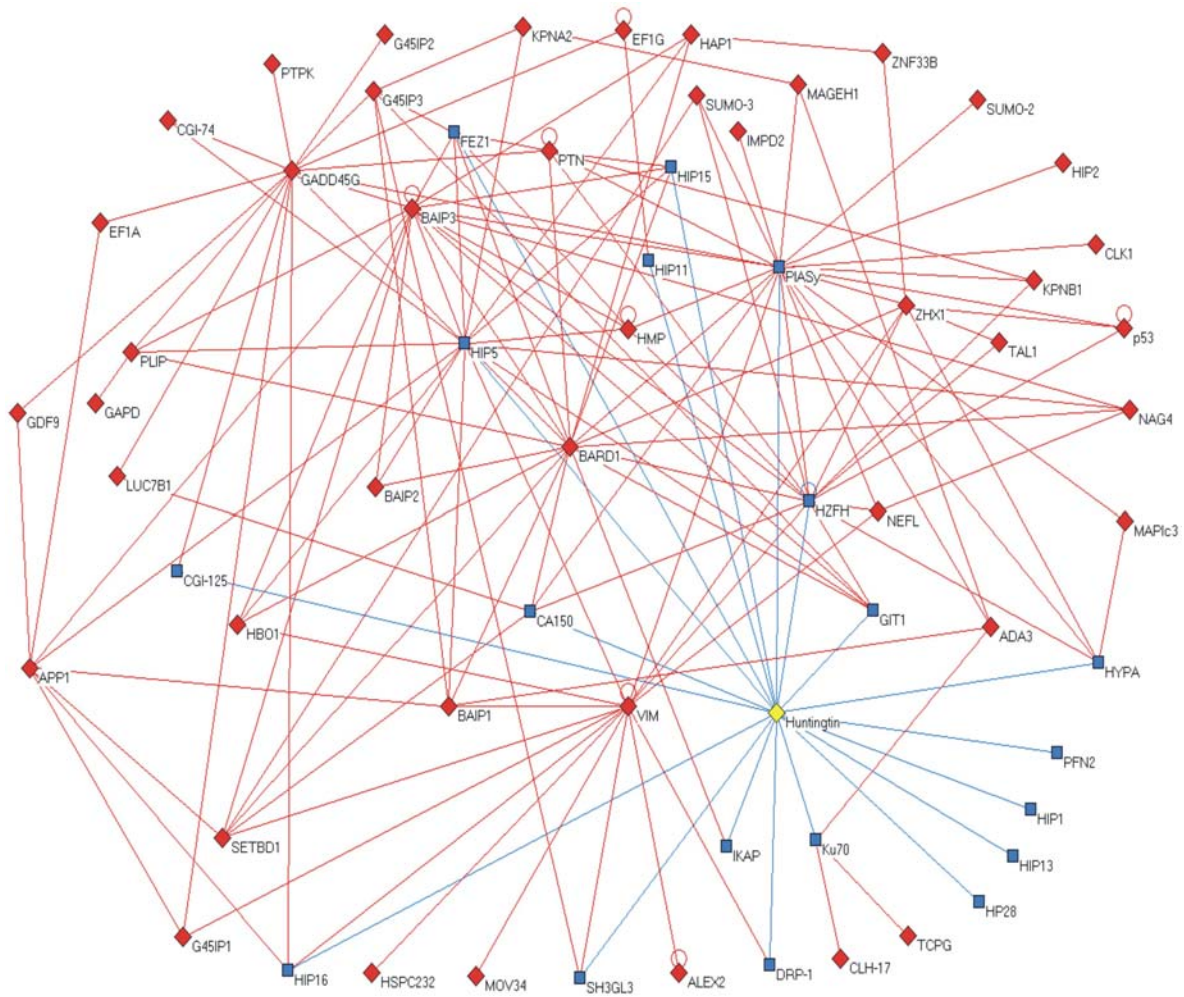


Abbildung 13: Protein-Interaktionsnetzwerk von Htt. Mit Hilfe der Computersoftware Pajek wurde das Htt-Netzwerk graphisch dargestellt. Dabei wurde Htt mit einem gelben Viereck markiert. Alle direkten Htt-Interaktionspartner wurden mit blauen und alle indirekten mit roten Vierecken dargestellt. Ein Kreis kennzeichnet dimerisierende Proteine.

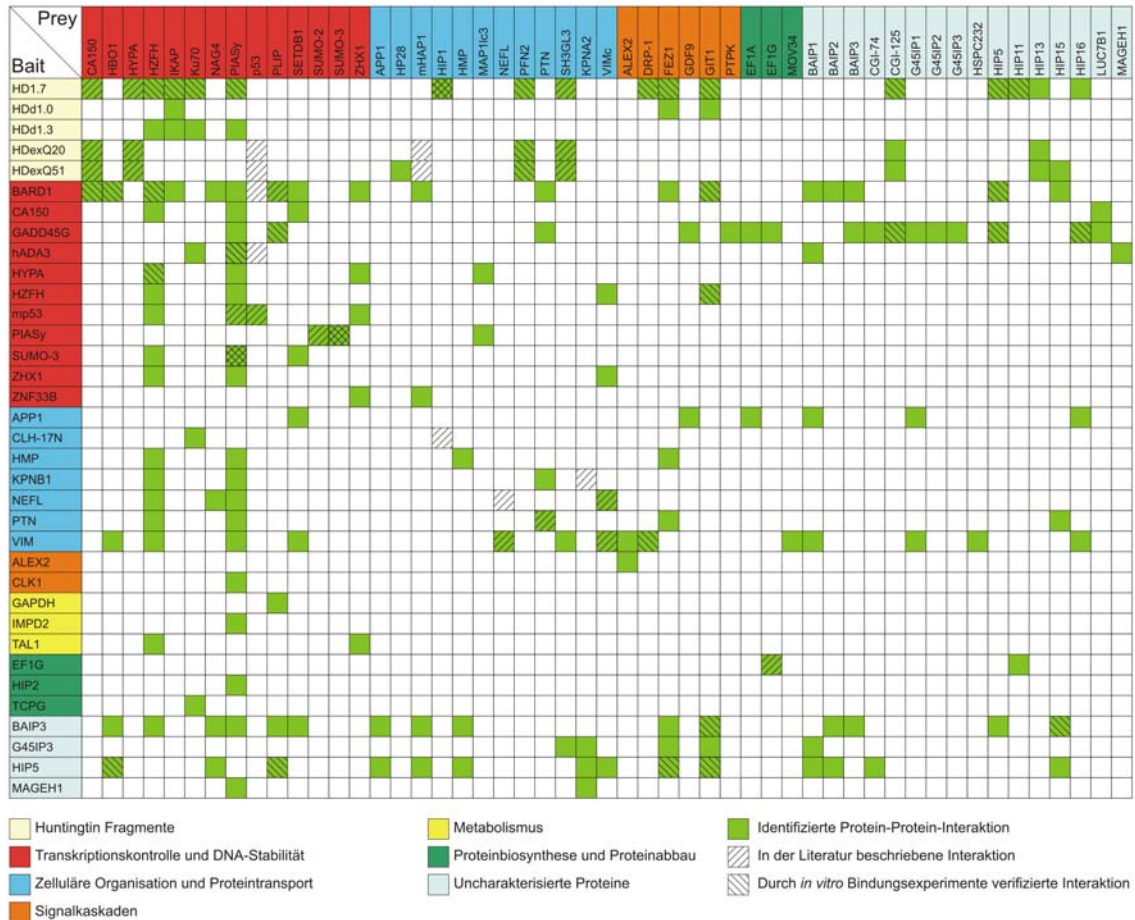


Abbildung 14: Zusammenstellung der identifizierten Protein-Interaktionen in einer Interaktionsmatrix. Die Proteine der Matrix wurden anhand von Literaturdaten in funktionelle Gruppen eingeteilt. Außerdem sind alle Interaktionen markiert, die in der Literatur beschrieben oder durch *in vitro* Bindungsexperimente verifiziert worden sind.

2.1.8. Analyse der identifizierten Proteine

In den Y2H-Screens wurden insgesamt 70 verschiedene Proteine oder Proteinfragmente verwendet bzw. identifiziert, deren genaue Aminosäureabfolge durch Sequenzierung ihrer cDNA-Fragmente bestimmt wurde. Nach Translation wurden die Sequenzen mit den Eintragungen der Protein-Datenbanken SwissProt und TrEMBL verglichen. In Tabelle 6 sind die exakten Proteinfragmentgrößen, ihre Übereinstimmungen mit Proteindatenbankeintragen und ihre Referenznummern zusammengestellt. Die Größe der einzelnen Proteine und Proteinfragmente bewegte sich zwischen 82 und 729 Aminosäuren. 62 Proteine waren vollkommen identisch mit einer Datenbankeintrage, während 8 Proteine aufgrund von

Polyglutaminverlängerungen, Punktmutationen oder kleinen Sequenzvariationen 75-99% Übereinstimmung aufwiesen. Proteine, die in der Datenbank als Proteine mit unbekannter Funktion beschrieben sind, wurden nach ihren Interaktionspartnern Htt, BARD1 oder GADD45G neu benannt (z.B. Huntingtin interagierendes Protein 5; HIP5).

Anhand von Literaturdaten konnten die Proteine der Interaktionsmatrix in sechs funktionelle Gruppen eingeteilt werden. Die größte Gruppe mit 18 Vertretern stellen die Proteine mit einer Funktion bei der Transkription oder der DNA-Stabilisierung dar. Die zweitgrößte Gruppe wird von 14 Proteinen, die an der Organisation des Cytoskeletts und am Vesikel-Transport beteiligt sind, gebildet. Ferner wurden 7 Proteine, die an der zellulären Signalübertragung beteiligt sind, 5 Proteine, die eine Funktion bei der Biosynthese oder dem Abbau von Proteinen ausüben, und 3 Proteine, die in zellulären Stoffwechselprozessen involviert sind, gruppiert. Des Weiteren wurden 16 Proteine identifiziert, die an insgesamt 72 Interaktionen innerhalb des Netzwerkes partizipieren, aber bislang noch nicht funktionell charakterisiert worden sind. Ein Protein war im Durchschnitt an 2,6 Interaktionen beteiligt, wobei die Anzahl der gefunden Interaktionspartner pro Protein von 1 bis 24 variierte. Für 15 Proteine konnte nur ein einzelner Interaktionspartner identifiziert werden, während für Htt, BARD1, GADD45G, HIP5, HZFH, PIASy, BAIP3 und VIM mehr als 15 verschiedene Interaktionspartner detektiert wurden. Proteine mit vielen Interaktionspartnern bilden Knotenpunkte, sogenannte Hubs, die charakteristisch für Proteinnetzwerke sind (Barabasi and Oltvai, 2004). Aufgrund seiner 19 Interaktionspartner stellt Htt einen solchen Knotenpunkt dar und nimmt innerhalb des Netzwerkes eine zentrale Stellung ein.

Tabelle 6: Übersicht der Proteine des Htt-Netzwerks

Protein	Proteinlänge in As	Gen-ID	Prot-ID	Identität	Match
Htt-Fragmente					
HD1.7	506	3064	P42858	100	1-506
HDd1.0	320	3064	P42858	100	1-320
HDd1.3	341	3064	P42858	100	166-506
HDexQ20	90	3064	P42858	96	1-90
HDexQ51	82	3064	P42858	75	1-82
Transkriptionskontrolle und DNA-Stabilität					
BARD1	379	580	Q99728	99	1-379
CA150	331	10915	O14776	93	299-629
GADD45G	150	10912	O95257	100	18-159
hADA3	198	10474	O75528	100	235-432
HBO1	611	11143	O95251	100	1-611
HYP A	415	55660	O75400	100	8-422
HZFH	171	1107	Q9Y410	100	1830-2000
IKAP	126	8518	O95163	100	1207-1332
Ku70	311	2547	P12956	100	298-608
NAG4	558	29117	Q9NPI1	100	94-651
PIASy	506	51588	Q8N2W9	100	5-510
p53	393	7157	P04637	100	1-393
mp53	318	7157	P02340	100	73-390
PLIP	457	10524	O95624	100	5-461
SETDB1	268	9869	Q15047	100	1023-1291
SUMO-2	103	6612	P55854	100	1-103
SUMO-3	95	6613	P55855	100	1-95
ZHX1	729	11244	Q9UKY1	100	145-873
ZNF33B	252	7582	Q8NDW3	100	527-778
Zelluläre Organisation und Proteintransport					
APP1	313	333	P51693	100	243-555
CLH-17N	276	1213	Q00610	100	1-289
HP28	256	7802	Q9BQZ6	100	3-258
mHAP1	469	9001	O35668	100	3-471
HIP1	387	3092	O00291	100	245-631
HMP	547	10989	Q16891	100	212-758
KPNA2	389	3838	P52292	100	141-529
KPNB1	209	3837	Q14974	100	668-876
MAP1Ic3	113	84557	Q9H491	100	58-170
NEFL	543	4747	Q8IU72	100	1-543
PFN2	139	5217	P35080	100	1-139
PTN	168	5764	P21246	100	1-168
SH3GL3	345	6457	Q99963	100	3-347
VIM	465	7431	P08670	100	1-465
VIMc	277	7431	P08670	100	189-465
Signalkaskaden					
ALEX2	506	9823	O60267	100	127-632
CLK1	276	1195	P49759	100	209-484
DRP-1	228	1400	Q14194	100	345-572
FEZ1	262	9638	Q99689	100	131-392
GDF9	179	2661	O60383	100	276-454
GIT1	513	28964	Q9Y2X7	98	249-761
PTPK	213	5796	Q15262	100	1227-1439
Metabolismus					
GAPDH	219	2597	P04406	100	116-334
IMP2	481	3615	P12268	100	34-514
TAL1	335	6888	P37837	100	3-337
Proteinbiosynthese und Proteinabbau					
EF1A	169	1915	P04720	100	294-462
EF1G	436	1937	P26641	100	2-437
HIP2	200	3093	P27924	100	1-200
MOV34	297	10980	O15387	95	1-297
TCPG	293	7203	P49368	100	252-544

Fortsetzung Tabelle 6:

Uncharakterisierte Proteine					
BAIP1 (360a)	226	84289	Q9BS30	100	1-226
BAIP2 (347a)	578	84078	Q9H0I6	100	107-684
BAIP3	285	55791	Q96HT4	100	152-436
CGI-74	112	51631	Q9Y383	100	159-270
CGI-125	131	51003	Q9Y3C7	100	1-131
G45IP1	340	84060	Q9H0V7	100	1-340
G45IP2	361	9842	Q9NYA0	100	566-926
G45IP3	132	-	Q8NI70	100	3-134
HIP5	544	57562	Q9P2H0	100	445-988
HIP11	153	1891	Q96EZ9	100	176-328
HIP13	244	9788	Q96RX2	100	512-755
HIP15	176	114928	Q96D09	100	663-838
HIP16	187	10813	Q9BVJ6	100	585-771
HSPC232	319	51535	Q9POP6	92	1-319
LUC7B1	256	55692	Q9NQ29	99	116-371
MAGEH1	219	28986	Q9H213	100	1-219

As: Aminosäuren; Gen-ID: Referenznummer für das Gen; Prot-ID: Referenznummer für das Protein; Match: Übereinstimmung der As des identifizierten Proteins mit der des unter der Prot-ID aufgeführten Proteins. Als Datenbanken wurden SwissProt und TrEMBL verwendet.

2.1.9. Direkte Interaktionspartner von Htt

Neben den bereits in der Literatur beschriebenen Htt interagierenden Proteinen HIP1, CA150, SH3GL3 und HYP A wurden noch 15 weitere Proteine als direkte Interaktionspartner von Htt identifiziert (Abbildung 14). Htt interagiert mit 6 Proteinen, die transkriptionale Prozesse kontrollieren oder regulieren, mit 4 Proteinen, die an der Organisation des Cytoskeletts und am Vesikel-Transport beteiligt sind sowie mit 3 Proteinen mit nachgewiesener Funktion bei Signalübertragungsvorgängen. Diese Interaktionen erhärten die Vermutungen, dass Htt ein multifunktionelles Protein ist und eine Rolle bei all diesen zellulären Prozessen spielt. Es wurden außerdem noch 6 weitere direkte Htt-Interaktionspartner identifiziert, die bis *dato* noch nicht funktionell charakterisiert worden sind. Zwei der identifizierten Htt-Interaktionspartner scheinen selektiv an mutiertes Htt zu binden. So wurden für HP28 und HIP5 nur Interaktionen mit HDexQ51, nicht aber mit HDexQ20 detektiert. Diese beiden Interaktionen sind demnach von der Länge der Polyglutaminsequenz in Htt abhängig. HP28 und HIP15 haben somit möglicherweise Einfluss auf die Pathogenese von HD.

2.1.10. Erweiterung des Htt-Protein-Interaktionsnetzwerks

Um das in dieser Arbeit identifizierte Htt-Interaktionsnetzwerk zu erweitern, wurden es durch bereits publizierte Interaktionen ergänzt. Zunächst wurden 34 Interaktionen integriert, an denen Htt direkt beteiligt ist. Somit vergrößerte sich die Anzahl der Proteine im Htt-Netzwerk von 64 auf 98. Anschließend wurden alle Interaktionspartner der 98 Proteine durch Abfragen der Protein-Interaktionsdatenbanken MINT, HPRD und BIND identifiziert. Es wurden 83 Proteine gefunden und ins Netzwerk integriert, die mit mindestens zwei der 98 Proteine interagieren und so eine Netzwerkverbindung herstellen. Das mit Literaturdaten erweiterte Htt-Netzwerk umfasst insgesamt 181 Proteine, die 592 Protein-Interaktionen ausbilden. In diesem Netzwerk ist Htt das Protein mit den meisten Interaktionspartnern. Es interagiert mit insgesamt 57 Proteinen. Alle 592 Protein-Interaktionen sind im Anhang der Arbeit aufgelistet. Mit Hilfe des Computerprogramms Pajek, einer Software zur Analyse und Darstellung von Netzwerken, wurde das Htt-Netzwerk graphisch dargestellt (Abbildung 15).

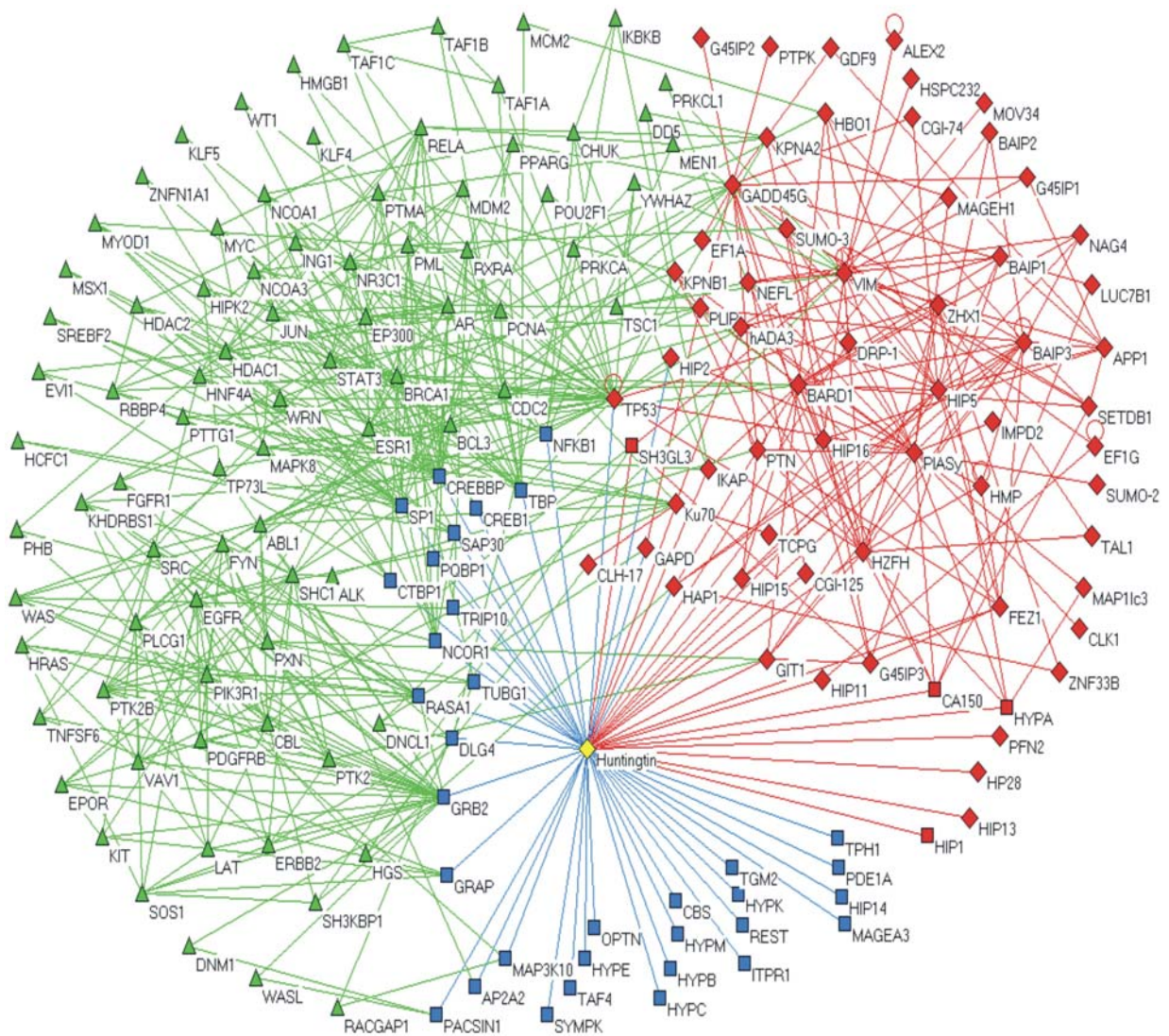


Abbildung 15: Graphische Darstellung des erweiterten Htt-Protein-Interaktionsnetzwerks. Im Netzwerk ist Htt als gelbes Viereck und die Proteine der Interaktionsmatrix sind als rote Vierecke dargestellt. Blaue Vierecke markieren direkte Htt-Interaktionspartner, die nicht in dieser Arbeit identifiziert worden sind. Proteine, die mit mindestens zwei Proteinen interagieren, die entweder zur Interaktionsmatrix gehören oder direkte Htt-Interaktionspartner sind, wurden anhand von Abfragen der Datenbanken HPRD, MINT und BIND identifiziert. Diese sind als grüne Dreiecke dargestellt.

2.1.11. Verifikation von Protein Interaktionen aus dem Htt-Netzwerk

Das Protein-Interaktionsnetzwerk von *S. cerevisiae* (Ito et al., 2001b; Uetz and Hughes, 2000), das mit Hochdurchsatz Y2H-Untersuchungen erstellt wurde, wies eine relativ hohe Rate (~50 %) an falsch positiven Interaktionen auf (Schwikowski et al., 2000; von Mering et al., 2002). Viele Interaktionen waren weder im Y2H-System reproduzierbar noch mit biochemischen Methoden verifizierbar. Für die Erstellung eines Netzwerks mit einer möglichst geringen Rate an falsch positiven Interaktionen wurden alle in dieser Arbeit identifizierten Protein-Interaktionen mehrfach im Y2H-System bestätigt. Darüber hinaus wurden 54 Interaktionen durch *in vitro* Bindungsexperimente überprüft (Abbildung 16). Bei diesen handelte es sich hauptsächlich um Interaktionen, an denen Htt oder ein direkter Interaktionspartner von Htt beteiligt war. Für die *in vitro* Bindungsexperimente wurde ein Interaktionspartner als GST-Fusionsprotein in *E. coli* und der andere als HA-Fusionsprotein in Säugetierzellen exprimiert. Die GST-Fusionsproteine wurden mit Glutathion-Agarosebeads aufgereinigt und mit Lysaten der Säugetierzellen des jeweiligen Interaktionspartners inkubiert. Als Kontrolle wurden für jeden Ansatz das entsprechende Zellkulturlysat zu Agarosebeads mit und ohne gebundenem GST gegeben. Nach intensivem Waschen wurden die Proteine eluiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulosemembranen entweder mit HA- oder anti-Htt-Antikörper detektiert. Von 54 der so überprüften Protein-Interaktionen konnten 35 verifiziert werden. Dies entspricht einer Verifizierungsrate von 65%, womit im Htt-Netzwerk deutlich weniger falsch positive Interaktionen auftreten als bei bislang publizierten genomweiten Protein-Interaktionsnetzwerken.

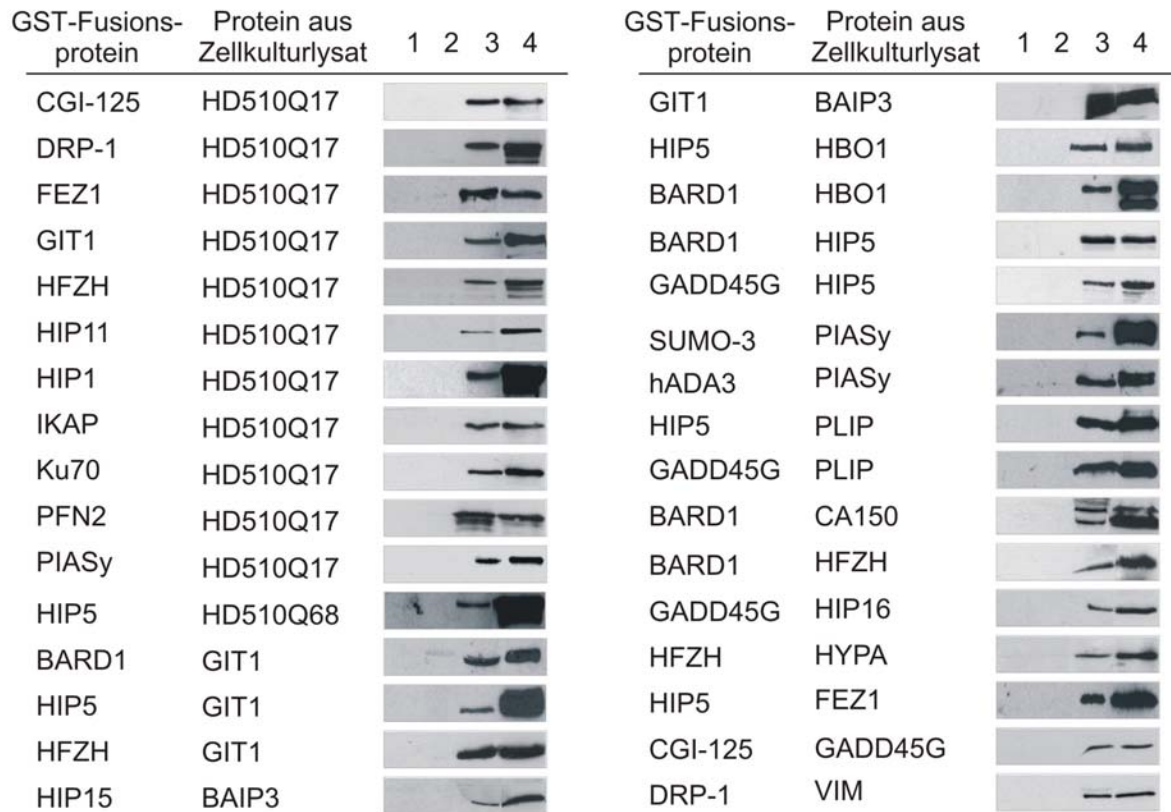


Abbildung 16: Verifizierung von Protein-Interaktionen des Htt-Interaktionsnetzwerks durch *in vitro* Bindungsexperimente. GST-Fusionsproteine wurden an Glutathion-Agarose gebunden, aufgereinigt und anschließend mit Zellkulturextrakten, die das entsprechende interagierende Protein exprimierten, inkubiert. Proteine, die nach dem Waschen an der Agarose gebunden waren, wurden durch SDS-PAGE und Westernblotting mit anti-Htt oder anti-HA Antikörpern analysiert. Spur 1: Agarose + Zellkulturlysats; Spur 2: an Agarose gebundenes GST-Protein + Zellkulturlysats; Spur 3: an Agarose gebundenes GST-Fusionsprotein + Zellkulturlysats; Spur 4: Zellkulturlysats allein.

2.1.12. Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Htt bei Coexpression mit ausgewählten Netzwerkproteinen

Da die Bildung von Htt-Aggregaten mit der Pathogenese von HD korreliert, wurde untersucht, ob Netzwerk-Proteine die Aggregation von mutiertem Htt stimulieren und somit für HD relevant sein können. Für die Aggregationsexperimente wurde ein Filtertest verwendet. Beim Filtertest werden SDS-stabile Htt-Aggregate auf einer Zelloloseacetat-Membran zurückgehalten, die dann mit einem anti-Htt Antikörper detektiert werden können. Für die Aggregationsexperimente wurde das DNA-Fragment

HD169Q68, das für die ersten 169 Aminosäuren von Htt mit 68 Glutaminen kodiert, in den Expressionsvektor pcDNA1/Amp kloniert. Wurde HD169Q68 in den Säugetierzellen HEK293 exprimiert, so traten nach 4 Tagen erste SDS-stabile Htt-Aggregate auf, während nach 48stündiger Inkubation kaum Aggregate detektiert werden konnten. Für die Expression in Säugetierzellen wurden alle direkten Htt-Interaktionspartner sowie Bard1 in den Expressionsvektor pTL1-HA subkloniert und einzeln mit HD169Q68 in HEK293-Zellen coexprimiert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und je 50, 25 und 12,5 µg Gesamtprotein der Lysate im Filtertest eingesetzt. Von den 20 untersuchten Netzwerkproteinen stimulierte das Protein GIT1 die Aggregation von Htt, während die anderen getesteten Proteine nur marginale Effekte auf das Aggregationsverhalten von Htt hatten. Ein Beispiel für ein Aggregationsexperiment ist in der Abbildung 17 dargestellt.

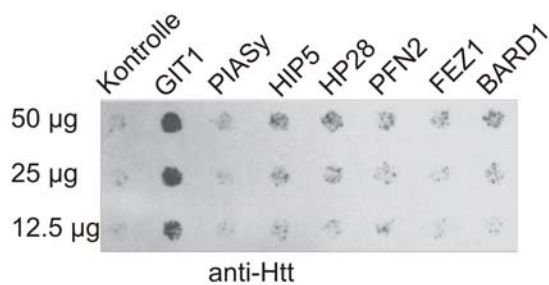


Abbildung 17: Untersuchung des Aggregationsverhaltens von mutiertem Htt bei Coexpression mit Netzwerkproteinen. 48 h nach Transfektion von HEK293-Zellen mit HD169Q68 und einem der angezeigten Netzwerkproteine oder einem Kontrollvektor wurden die Zellen geerntet und lysiert. Das Lysat wurde mit Hilfe einer Filtrationsmethode auf SDS-stabile Htt-Aggregate untersucht. Aggregate wurden mit dem anti-Htt Antikörper CAG53b nachgewiesen.

2.1.13. Zelluläre Funktion von GIT1 und Bestimmung der interaktionsrelevanten Regionen von Htt und GIT1

Das G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase interagierende Protein 1 (GIT1) ist ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP), das zusammen mit GIT2, einschließlich verschiedener Splicevarianten, die GIT Familie bildet. Exprimiert wird GIT1 verstärkt im Gehirn und in den Hoden, aber auch in peripheren Geweben (Premont et al., 1998; Vitale et al., 2000).

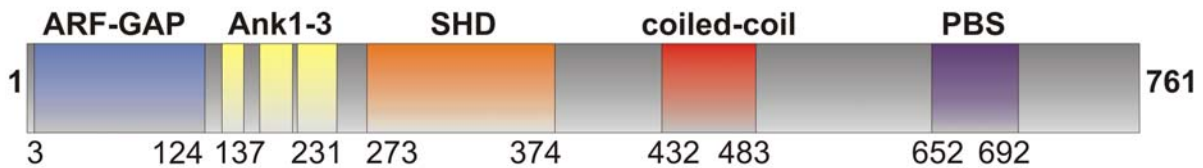


Abbildung 18: Struktur von GIT1.

GIT1 ist ein 95 kDa großes Protein (761 Aminosäuren) und weist verschiedene Protein-Domänen auf (Abbildung 18). N-terminal befindet sich eine ARF-GAP-Domäne, die eine Consensus Sequenz für ein Zinkfinger-Motiv enthält. Auf diese Region folgen drei Ankyrin-Repeats, eine Spa2-homologe Domäne (SHD) und eine coiled-coil-Sequenz. Eine Paxillin-Bindungsstelle (PBS) ist im C-terminalen Bereich lokalisiert (Premont et al., 1998; Turner et al., 1999). Über die ARF-GAP-Region bindet GIT1 an ARF6, ein kleines GTP-bindendes Protein, das den Transport von Membranstücken zwischen dem endosomalen Kompartiment und der Plasmamembran reguliert (Vitale et al., 2000). Mit der SHD von GIT1 interagieren PIX und FAK. PIX agiert als ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für die GTPase Rac und bindet PAK, eine p21-aktivierende Kinase. FAK ist eine im Bereich von Adhäsionsplaques lokalisierte Tyrosin-Kinase, die Paxillin phosphoryliert (Turner et al., 2001; Zhao et al., 2000). Mit der PBS interagiert das Adapterprotein Paxillin, das die Struktur- und Signalübertragungsproteine von Adhäsionsplaques rekrutiert (Turner, 2000). Ein weiterer Interaktionspartner von GIT1, der C-terminal bindet, ist α -Liprin, das in der postsynaptischen Zielsteuerung von AMPA-Rezeptoren und beim Aufbau von präsynaptisch aktiven Zonen involviert ist (Ko et al., 2003). GIT1 bildet mit seinen Interaktionspartnern unterschiedliche Proteinkomplexe aus. In der Zelle ist GIT1 an der Ausbildung von Dendritenausläufern und Synapsen, an der Assemblierung oder Auflösung von Adhäsionsplaques und an der Endozytose von Membranbestandteilen und Rezeptoren beteiligt (Claing et al., 2000; de Curtis, 2001; Zhang et al., 2003).

Zur Bestimmung der für eine Interaktion mit GIT1 erforderlichen Proteindomäne in Htt wurde zu den bereits vorhandenen Fragmenten ein weiteres Htt-Fragment, HD170Q23, das für die ersten 170 As kodiert und bereits im Bait-Plasmid vorlag, verwendet. Im cDNA-Bank-Screen wurde ein C-terminales GIT1-Protein (As 249-761), das von einem Prey-Plasmid kodiert wurde, als direkter Interaktionspartner von

Htt identifiziert. Dieses Prey-Plasmid wurde jeweils mit einem der 6 Htt Bait-Plasmide in den Hefestamm L40ccU MATa transformiert. Die Transformanten wurden auf Reporterogenaktivität überprüft (Abbildung 19). Das kleinste mit dem C-terminalen GIT1-Protein interagierende Htt-Fragment war HD170Q23. Es entspricht, abgesehen von der Polyglutaminlänge, dem HD169Q68 Fragment, das für die Aggregationsexperimente eingesetzt wurde. HD170Q23 umfasst neben dem Polyglutaminabschnitt die Prolin-reiche Sequenz (PRS), nicht aber die HEAT-Repeats (As 205-329) von Htt. Die Htt-Fragmente HDexQ20 oder HDexQ51 interagieren nicht mit GIT1. Somit ist vermutlich die PRS von Htt entscheidend für die Bindung von GIT1 an Htt.

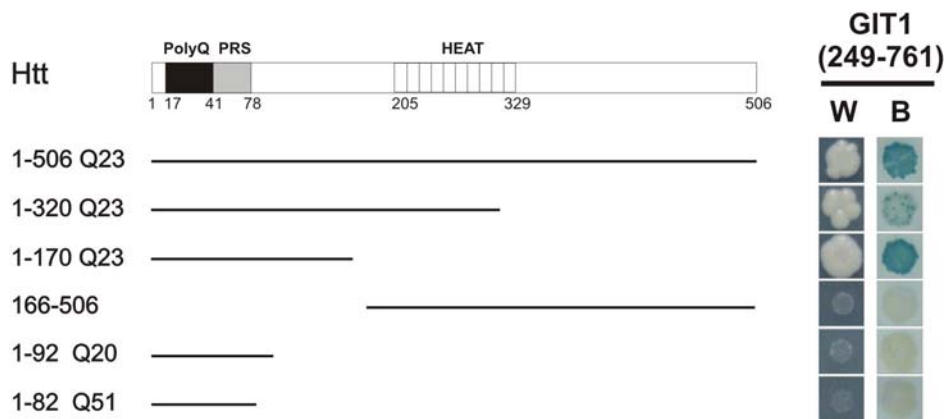


Abbildung 19: Identifizierung der für die Interaktion mit GIT1 erforderlichen Htt-Domäne. 6 Bait-Plasmide, die für die beschriebenen Htt-Fragmente kodieren, wurden zusammen mit dem Prey-Plasmid, das für das C-terminale GIT1-Protein (249-761 As) kodiert, in den Hefestamm L40ccU MATa transformiert. Die Transformanten wurden zur Überprüfung der Reporterogenaktivität sowohl auf SD4-Medium als auch auf eine auf SD2-Medium aufgelegte Membran gestempelt und für 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Membran wurde mit dem β -GAL Test prozessiert. Das kleinste Fragment, mit dem das C-terminale GIT1 interagiert, umfasst die ersten 170 As von Htt. W: Wachstum auf SD4-Medium; B: β -GAL Test.

In weiteren Y2H-Experimenten wurde die für eine Interaktion mit Htt benötigte Proteindomäne in GIT1 bestimmt. Dafür wurden die vollständige GIT1-Kodierungssequenz sowie 5 verschiedene für GIT1 kodierenden cDNA-Fragmente in den AD-Vektor kloniert. Insgesamt standen somit 7 teilweise überlappende GIT1-Konstrukte zur Verfügung (Abbildung 20). Das Bait-Plasmid HD1.7 wurde mit jedem der 7 für die GIT1-Fragmente kodierenden Prey-Plasmide in den Hefestamm L40ccU MATa

transformiert und die resultierenden Klone wurden auf Y2H-Reportergenaktivität überprüft. Wie erwartet interagiert HD1.7 mit dem vollständigen GIT1-Protein. Die letzten 164 As von GIT1 (As 597-761) stellen die kleinste Proteindomäne dar, mit der HD1.7 im Y2H-System interagiert. Somit ist der C-Terminus von GIT1, der für die Paxillin-bindende-Domäne kodiert, für die Htt/GIT1-Interaktion ausreichend.

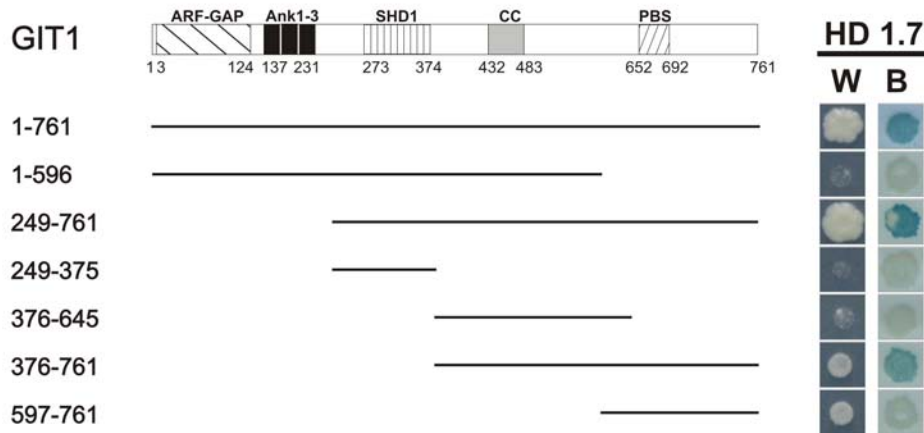


Abbildung 20: Identifizierung der für die Interaktion mit Htt erforderlichen GIT1-Domäne. Verschiedene, teilweise überlappende GIT1-Fragmente wurden zusammen mit HD1.7 in dem Hefestamm L40ccU MATa exprimiert und auf Reportergenaktivität getestet. Der C-Terminus von GIT1 (As 597-761) ist für eine Interaktion mit Htt erforderlich. W: Wachstum auf SD4-Medium; B: β -GAL Test.

2.1.14. Verifizierung der Htt/GIT1-Interaktion durch Immunpräzitationsexperimente

Um die Htt/GIT1-Interaktion mit einem unabhängigen experimentellen Ansatz zu überprüfen, wurden Coimmunpräzitationen durchgeführt. Dafür wurden zunächst zwei cDNA-Fragmente, die für die ersten 510 As von Htt mit entweder 17 (HD510Q17) oder 68 Glutaminen (HD510Q68) kodieren, in den Expressionvektor pcDNA1/Amp kloniert. Anschließend wurden die entsprechenden Htt-Proteine zusammen mit HA-getagtem GIT-CT (As 249-761) in COS-1 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und lysiert. Als Kontrollen wurden Zelllysate von nicht transfektierten COS-1 Zellen und Lysate von Zellen, die nur je eines der beiden Proteine exprimierten, verwendet. Die Lysate wurden mit dem

anti-GIT1 bzw. mit unspezifischen Kontroll-Antikörpern inkubiert, die dann über Protein-A Sepharose aufgereinigt wurden. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrozellulosemembranen wurden die Proteine mit anti-HA oder anti-Htt Antikörpern detektiert. Beide Htt-Fragmente wurden über GIT1 aus dem Zellextrakt präzipitiert (Abbildung 21). In der Zelle interagiert also GIT1 sowohl mit normalem (17 Glutamine) als auch mit mutiertem Htt (68 Glutamine).

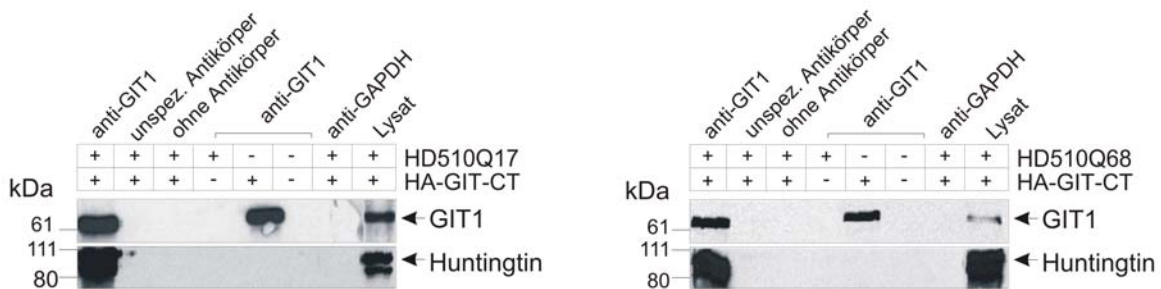


Abbildung 21: Coimmunpräzipitation von Htt und GIT-CT. Extrakte von COS-1 Zellen wurden mit anti-GIT1 Antikörper und unspezifischen Antikörpern versetzt. Nach der Immunpräzipitation wurden die Proteinkomplexe über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit den Antikörpern anti-HA und anti-Htt detektiert.

Um die physiologische Relevanz der Htt/GIT1-Interaktion zu überprüfen, wurden Immunpräzipitationen mit humanen Gehirngewebe durchgeführt. Dafür wurde ein Zell-extrakt aus dem Kortex eines verstorbenen gesunden Menschen präpariert. Aliquots dieses Extraktes wurden mit unterschiedlichen Mengen der Htt-Antikörper CAG53b bzw. anti-HD1 versetzt und bei 4 °C inkubiert. Die Antikörper wurden mit magnetischen Beads, die mit einem sekundären Antikörper gekoppelt waren, aufgereinigt und die Proteinkomplexe eluiert. Nach Auftrennung der Proben über SDS-PAGE mit anschließendem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die GIT1-Proteine mit dem anti-GITz Antikörper detektiert (Abbildung 22). In Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Htt-Antikörper wurde endogenes GIT1 aus dem Gehirnmaterial über Htt präzipitiert. Folglich bilden beide Proteine auch unter physiologischen Bedingungen einen Komplex.

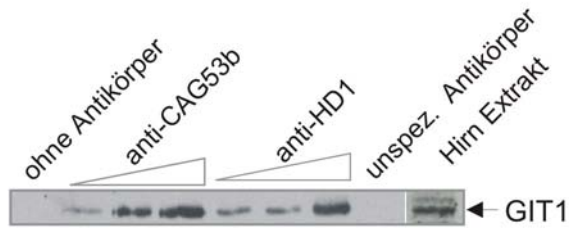


Abbildung 22: Coimmunpräzipitation von Htt und GIT1 aus humanem Gehirngewebe. Extrakte von humanem Kortexgewebe wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Htt-Antikörper CAG53b und anti-HD1 (1, 3, 5 μ l Antiserum) sowie eines unspezifischen Antikörpers (5 μ l Antiserum) versetzt und bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper über sekundäre Antikörper, die an magnetische Beads gekoppelt waren, aufgereinigt. Nach Elution der Proteinkomplexe wurden dieselben über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem monoklonalen anti-GITz Antikörper detektiert.

2.1.15. Colokalisation von Htt und GIT1 in Säugetierzellen

Die Htt/GIT1-Interaktion wurde auch mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dafür wurden die entsprechenden Proteine für 48 h in COS-1 Zellen exprimiert. Nach Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd wurden die Proteine mit einem spezifischen Antikörper markiert, der durch einen mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper detektiert wurde. Um die Lokalisation der Proteine HD510Q17, HD510Q68, HD169Q68 und HA-GIT-CT in der Zelle zu bestimmen, wurden diese zunächst einzeln exprimiert (Abbildung 23). Alle Htt-Proteine sind diffus im Cytoplasma der Zelle verteilt, während HA-GIT-CT große perinukleare Strukturen, die extrem großen Vesikel ähneln, ausbildet. Dass die Expression von N-terminal verkürzten GIT1-Fragmenten zur Bildung solcher speziellen Strukturen führt, wurde bereits von Matafora *et al.* gezeigt (Matafora et al., 2001).

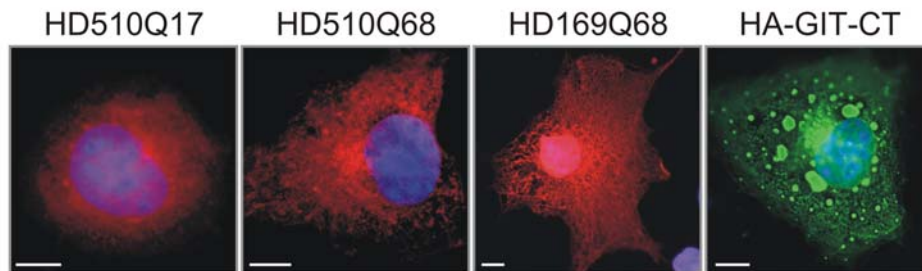


Abbildung 23: Zelluläre Lokalisation von HD510Q17, HD510Q68, HD169Q68 und GIT-CT in COS-1 Zellen. Htt-Proteine wurden mit rotem Fluoreszenzfarbstoff durch 4C8 Antikörper und GIT1 mit grünem Fluoreszenzfarbstoff durch anti-GIT1 Antikörper visualisiert. Die Kerne wurden mit Hoechst angefärbt. Balken: 10 μ m.

Bei Coexpression von HD510Q17 und HA-GIT-CT (Abbildung 24 a-c) colokalisierten beide Proteine im Cytoplasma um den Zellkern. Dabei wurde HD510Q17 teilweise in die perinuklearen vesikelartigen Strukturen von HA-GIT-CT rekrutiert. Wurden jedoch Htt-Fragmente mit verlängerter Polyglutaminsequenz (HD510Q68 oder HD169Q68) mit HA-GIT-CT coexprimiert, so waren die Htt-Proteine fast ausschließlich zusammen mit HA-GIT-CT in den vesikelartigen Strukturen lokalisiert (Abbildung 24 d-i). Somit rekrutiert das C-terminale GIT1-Fragment verstärkt die mutierten Htt-Fragmente in vesikelartige Strukturen und fördert dadurch möglicherweise die Htt-Aggregation.

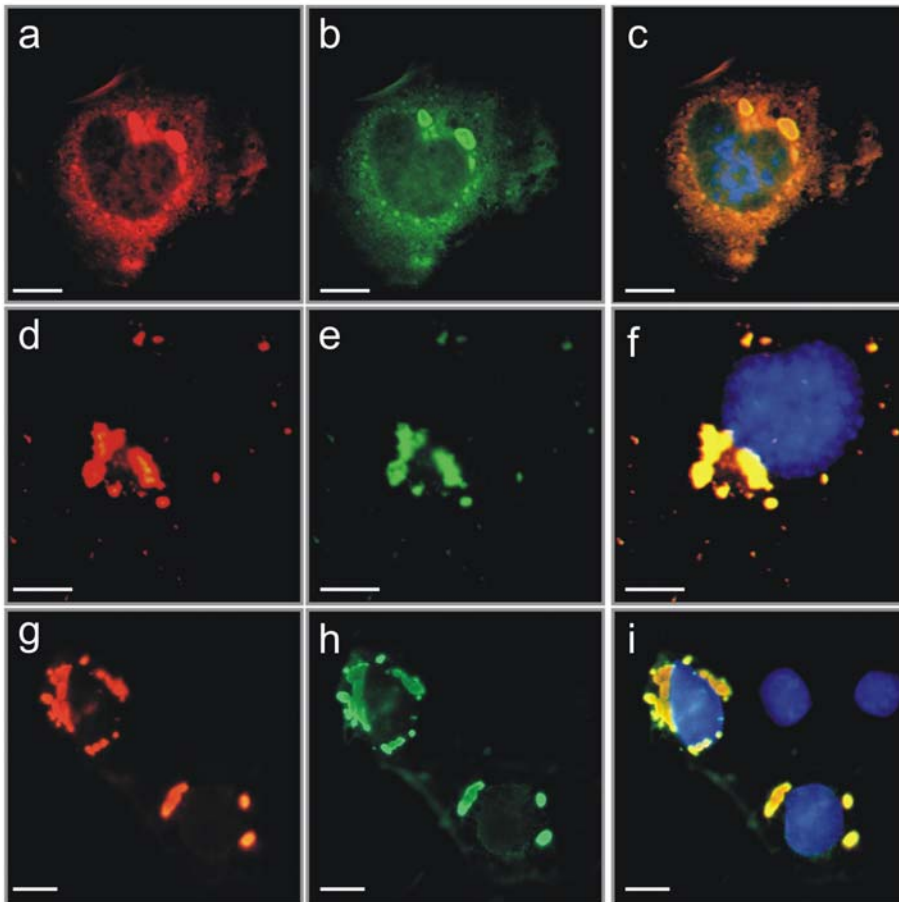


Abbildung 24: Colokalisation von Htt-Fragmenten und HA-GIT-CT. HD510Q17 (a-c), HD510Q68 (d-f) und HD169Q68 (g-i) wurden zusammen mit HA-GIT-CT in COS-1 Zellen für 48 h exprimiert. HD510Q17 und HD510Q68 wurden mit dem Antikörper 4C8 und HD169Q68, das mit einem V5-Tag fusioniert ist, mit dem anti-V5 Antikörper immunmarkiert. Die an Htt-Fragmente bindenden Antikörper wurden mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff detektiert. GIT1 wurde mit grünem Fluoreszenzfarbstoff durch anti-GIT1 Antikörper visualisiert. Die Gelbfärbung in c, f und i zeigt die Colokalisation von Htt-Fragmenten mit HA-GIT-CT an. Die Kerne wurden mit Hoechst angefärbt. Balken: 10 μ m.

2.1.16. Aggregation von GIT1

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz lassen vermuten, dass mutiertes Htt und GIT-CT coaggregieren. Um dies zu überprüfen, wurden HD169Q68 und HA-GIT-CT sowohl einzeln als auch gemeinsam in HEK293-Zellen für 48 h exprimiert. Nach Lyse der Zellen wurden die Extrakte mit dem Filtertest untersucht (Abbildung 25). Wenn

alleine exprimiert, bildete HD169Q68 nur relativ wenige und GIT1 keinerlei detektierbaren Aggregate. Wurden jedoch beide Proteine coexprimiert, so entstanden SDS-stabile Aggregate, die sowohl mit anti-Htt als auch mit anti-GIT1 Antikörpern nachgewiesen werden konnten. Somit fördert die Coexpression von HD169Q68 und HA-GIT-CT nicht nur die Bildung von SDS-stabilen Htt-Aggregaten, sondern initiiert auch die Aggregation von GIT-CT. Vermutlich ist HA-GIT-CT ein integraler Bestandteil der Htt-Aggregate, da bislang keinerlei Daten darauf hinweisen, dass dieses Protein von sich aus aggregiert.

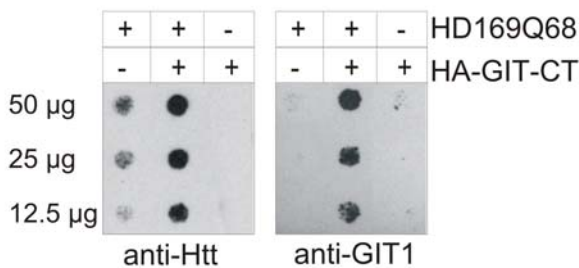


Abbildung 25: Nachweis von Htt/GIT1-CT Aggregaten. 48 h nach Transfektion wurden HEK293-Zellen, die mit HD169Q68 und GIT1-CT transfektiert worden waren, lysiert und mit Hilfe des Filtertests auf die Präsenz von Aggregaten untersucht. Nur bei Coexpression von HA-GIT-CT und HD169Q68 konnten SDS-stabile Aggregate, mit dem anti-Htt Antikörper CAG53b und mit dem anti-GIT1 Antikörper nachgewiesen werden.

2.1.17. Einfluss von GIT1 auf die Htt-Aggregation

Durch die Zellkulturexperimente wurde gezeigt, dass ein C-terminales Fragment von GIT1 die Aggregation von mutiertem Htt fördert. Aufgrund dieses Ergebnisses stellte sich die Frage, ob auch das vollständige GIT1-Protein das Aggregationsverhalten von mutiertem Htt beeinflusst. Für dieses Experiment wurde die komplette Kodierungssequenz von GIT1 (1-761 As) in den pTL1-HA Expressionsvektor kloniert (HA-GIT1). Zusammen mit pcDNA1/Amp-HD169Q68 wurde pTL1-HA-GIT1, pTL1-HA-GIT-CT oder pTL1-HA (Kontrolle) in HEK293-Zellen transfektiert. 48 h nach der Cotransfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Extrakte mit dem Filtertest auf SDS-stabile Htt-Aggregate untersucht (Abbildung 26). Dabei zeigte sich, dass die Aggregation von Htt auch durch die Expression von HA-GIT1 gefördert wird, und

zwar um so mehr je höher die Konzentration an transfektierter pTL1-HA-GIT1 DNA war. Jedoch war die Stimulierung der Htt-Aggregation durch HA-GIT1 deutlich geringer als durch HA-GIT-CT. Folglich fördert das C-terminale GIT1-Fragment (As 249-761) die Htt-Aggregation deutlich besser als das vollständige GIT1-Protein (As 1-761).

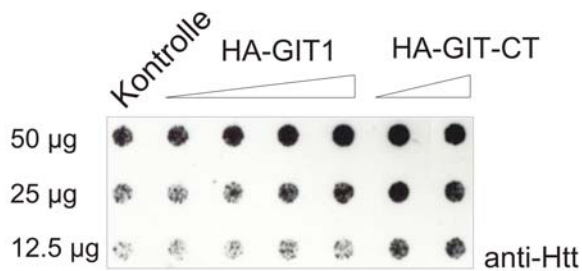


Abbildung 26: Stimulierung der Aggregation von mutiertem Htt durch GIT1. In HEK293-Zellen wurde HD169Q68 allein (Kontrolle) oder zusammen mit HA-GIT1 oder HA-GIT-CT für 48 h exprimiert. Die Menge der transfektierten DNA betrug für HA-GIT1 0,4 / 0,8 / 1,6 / 3,2 µg und für HA-GIT-CT 0,4 / 3,2 µg. Die Zelllysate (50, 25, 12,5 µg) wurden mit dem Filtertest analysiert. SDS-stabile Htt-Aggregate wurden mit dem anti-Htt Antikörper CAG53b detektiert.

2.1.18. Lokalisation von GIT1 in neuronalen Einschlusskörpern

Die Ergebnisse der Aggregationsexperimente deuten darauf hin, dass GIT1 ein Bestandteil der neuronalen Einschlusskörper sein könnte, die in einem fortgeschrittenem Stadium bei HD gebildet werden. Um dies zu überprüfen, wurden die Gehirne von transgenen R6/1- und Wildtyp-Mäusen einer vergleichenden histologischen Untersuchung unterzogen. Transgene R6/1-Mäuse exprimieren ein humanes N-terminales Htt-Fragment mit ungefähr 150 Glutaminen (Mangiarini et al., 1996). In Wildtyp-Mäusen war endogenes GIT1 diffus im Cytoplasma und in den Kernen von Neuronen des Striatums sowie des dorsalen Kortex verteilt. In den R6/1-Mäusen dagegen wurde GIT1 hauptsächlich in neuronalen Htt-haltigen Einschlusskörpern detektiert (Abbildung 27)

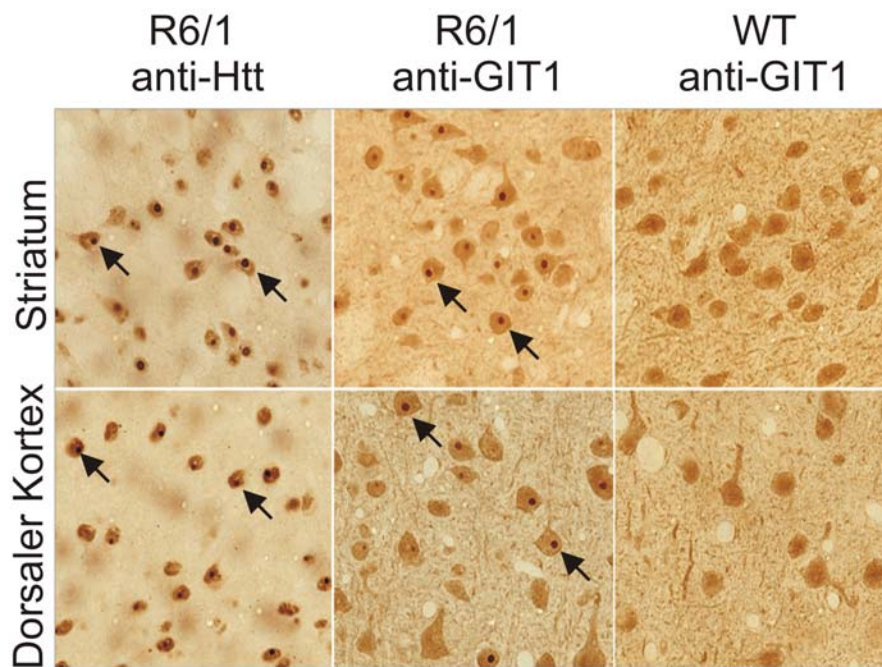


Abbildung 27. Lokalisation von GIT1 in den neuronalen Einschlusskörpern von R6/1-Mäusen. Gehirne von transgenen R6/1- und Wildtyp-Mäusen wurden für histologische Untersuchungen geschnitten. GIT1 wurde mit anti-GIT1 und Htt mit dem EM48-Antikörper immunmarkiert. Die Pfeile kennzeichnen einige der immunreaktiven neuronalen Einschlusskörper. [Abbildung freundlicherweise von Claire-Anne Gutekunst zur Verfügung gestellt]

Darüber hinaus wurde geprüft, ob GIT1 auch Bestandteil von humanen neuronalen Einschlusskörpern ist. Dafür wurde post mortem Kortexgewebe eines HD-Patienten und einer nicht von HD betroffenen Person vergleichend histologisch untersucht. Htt wurde dabei mit dem anti-Htt Antikörper 2B4 und GIT1 mit dem anti-GIT1 Antikörper immunmarkiert. Wie bei den transgenen R6/1-Mäusen wurde beim HD-Patienten GIT1 eindeutig in den neuronalen Einschlusskörpern des dorsalen Kortex nachgewiesen. Im Hirngewebe der Kontrollperson hingegen war GIT1, ebenso wie bei Wildtyp-Mäusen, diffus im Cytoplasma und in den Kernen von Neuronen verteilt (Abbildung 28).

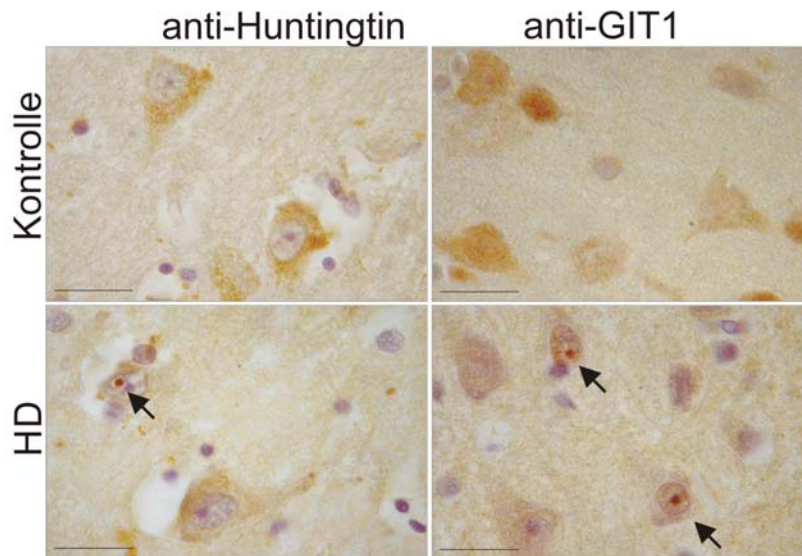


Abbildung 28: GIT1 ist Bestandteil der neuronalen Einschlusskörper von HD-Patienten. Der dorsale Kortex eines an HD verstorbenen Patienten und einer Kontrollperson wurden für histologische Untersuchungen geschnitten. Htt und GIT1 wurden mit spezifischen Antikörpern immunmarkiert. Die Pfeile kennzeichnen immunreaktive neuronale Einschlusskörper. Balken: 20 μ m. [Abbildung freundlicherweise von Katrin Lindenberg zur Verfügung gestellt]

2.1.19. Akkumulierung von C-terminalen GIT1-Fragmenten in HD-Patienten

Um zu prüfen, ob die GIT1 Konzentration im Gehirn von HD-Patienten im Vergleich zu nicht betroffenen Individuen variiert, wurden Zellextrakte aus post mortem Kortexgewebe der jeweiligen Personengruppen hergestellt. Die Proteinextrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. GIT1 wurde mit dem anti-GIT1 Antikörper, der spezifisch den C-Terminus von GIT1 erkennt, immunmarkiert. Mit Hilfe eines anti-Actin Antikörpers wurde überprüft, ob vergleichbare Mengen an Totalextrakt geladen wurden. Im Zellextrakt der Kontrollperson wurde GIT1, wie erwartet, bei 95 kDa detektiert (Vitale et al., 2000). Daneben wurde auch ein 64 kDa Protein von dem anti-GIT1 Antikörper markiert. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Splicevariante oder ein proteolytisches Spaltprodukt von GIT1. Erstaunlicherweise traten in Zellextrakten von HD-Patienten nur relativ geringe Mengen der 95 und 64 kDa großen GIT1-Proteinbanden auf. Stattdessen wurden C-terminale

GIT1-Fragmente von 30-40 kDa identifiziert (Abbildung 29). Somit existieren unterschiedliche Formen von GIT1-Proteinen im Kortexgewebe von HD-Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Das Auftreten von C-terminalen GIT1-Fragmenten und eine damit einhergehende Reduktion der hochmolekularen Formen von GIT1 sprechen für eine Prozessierung des Proteins bei HD. Eine Prozessierung von GIT1 könnte sich gravierend auf die Funktion des Proteins in der Zelle auswirken und somit auch die Pathogenese von HD negativ beeinflussen.

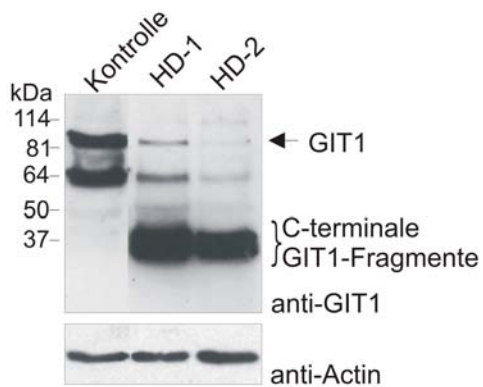


Abbildung 29: Prozessierung von GIT1 in HD-Patienten. Zellextrakte (je 25 µg) aus dem Kortex (post mortem) einer Kontrollperson und zweier HD-Patienten wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die C-terminalen GIT1-Fragmente wurden mit dem anti-GIT1 Antikörper detektiert. Ein anti-Actin Antikörper wurde benutzt, um die geladene Proteinmenge zu kontrollieren.

2.2. Diskussion

In dieser Arbeit wurden mit dem Y2H-System Proteine identifiziert, die mit Wildtyp-Htt oder seiner HD verursachenden mutierten Form direkt oder auch indirekt interagieren. Anhand der erhaltenen Ergebnisse konnte ein Protein-Interaktionsnetzwerk erstellt werden, das Htt mit verschiedenen zellulären Stoffwechselwegen verbindet. Dadurch wurden Hinweise sowohl auf die normale zelluläre Funktion von Htt als auch auf die Pathogenese von HD erhalten.

In der Zelle bilden fast alle Proteine mit Interaktionspartnern stabile oder zeitweise assoziierte Proteinkomplexe, um ihre spezifische biologische Funktion auszuüben (Alberts, 1998). Somit wird die Funktion eines Proteins oft durch Wechselwirkungen und Reaktionen mit anderen Biomolekülen bestimmt (Bader et al., 2003). Um komplex ablaufende zelluläre Prozesse besser zu verstehen, ist es daher hilfreich, Protein-Interaktionsnetzwerke zu generieren. Für mehrere Modellorganismen wie z.B. *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und *C. elegans* sind bereits umfassende durch genomweite Y2H-Studien erstellte Protein-Interaktionsnetzwerke publiziert worden (Giot et al., 2003; Ito et al., 2001b; Li et al., 2004; Uetz and Hughes, 2000). Bei der Analyse der *S. cerevisiae* Interaktionsdaten zeigte sich, dass sich Netzwerke gut zur Charakterisierung von einzelnen Proteinen aber auch von zellulären Prozessen eignen (Schwikowski et al., 2000). Interagieren zwei charakterisierte Hefeproteine miteinander, so gehören sie in 72% der Fälle zu der selben Funktionsklasse oder sind im gleichen Zellkompartiment lokalisiert. Ferner gruppieren sich Proteine mit ähnlicher Funktion innerhalb des *S. cerevisiae* Netzwerks und die resultierenden Gruppen sind untereinander durch einzelne Interaktionen verbunden. Aus diesen Gründen kann ein unbekanntes Protein über eine Interaktion mit einem charakterisierten Protein funktionell annotiert und mit einem zellulären Prozess assoziiert werden (Bader and Hogue, 2002; Schwikowski et al., 2000).

Kürzlich sind zwei humane Protein-Interaktionsnetzwerke publiziert worden, die mehrere Proteine als neue Mitglieder der TNF- α /NF- κ B- und der Smad-Signalkaskaden identifizierten. Die TNF- α /NF- κ B-Signalkaskade besteht nunmehr aus 80

interagierenden und 221 assoziierten Proteinen (Bouwmeester et al., 2004), und die Smad-Signalkaskade umfasst ein Netzwerk mit insgesamt 755 Interaktionen zwischen 591 Proteinen, von denen bis *dato* 179 noch nicht funktionell charakterisiert waren (Colland et al., 2004). Beide Studien zeigen, dass durch die gezielte Suche nach neuen Protein-Interaktionen das Wissen über zellulär ablaufende Prozesse erweitert werden kann.

In dieser Arbeit wurde ein humanes Protein-Interaktionsnetzwerk generiert, dessen Fokus nicht auf einer Signalkaskade, sondern auf dem krankheitsrelevanten Protein Htt liegt. Das Y2H-System wurde zunächst dazu benutzt, um mit iterativen cDNA-Bibliothek-Screens nach Interaktionspartnern für 52 Bait-Proteine zu suchen. Diese Bait-Proteine waren entweder Htt-Fragmente oder mit Htt-assoziierte Proteine. Mit diesen cDNA-Bank-Screens wurden 55 Protein-Interaktionen zwischen 23 Bait- und 51 Prey-Proteinen identifiziert. Für die Erstellung eines Netzwerks war es nötig, die einzelnen Interaktionspärchen miteinander zu verbinden. Um dies zu erreichen, wurden mit einem Y2H-Array-Screen Bait- und Prey-Proteine paarweise auf Interaktionen getestet. Für diesen Screen wurden noch 23 zusätzliche Bait-Proteine von den bereits identifizierten Prey-Proteinen hergestellt, so dass insgesamt 46 Bait- gegen 51 Prey-Proteine getestet werden konnten. Durch die Überprüfung von 2 346 Proteinkombinationen wurden 131 weitere Protein-Interaktionen identifiziert. Aus diesen Daten wurde dann eine Htt-Interaktionsmatrix erstellt, die einen Überblick über die identifizierten 186 Interaktionen zwischen 35 Bait- und 51 Prey-Proteinen gibt (Abbildung 14). Durch die Integration von Literaturdaten konnte schließlich ein umfassendes Htt-Interaktionsnetzwerk mit 592 Interaktionen zwischen 181 Proteinen erstellt werden (Abbildung 15).

Der Hauptkritikpunkt an genomweiten, mit Y2H-Interaktionsdaten generierten Netzwerken ist, dass bis zu 50 % aller Interaktionen nicht reproduzierbar oder falsch positiv sind (Bader et al., 2003; Ge et al., 2003; von Mering et al., 2002). Ein Grund dafür ist sicherlich, dass die in diesen Studien identifizierten Protein-Interaktionen ohne weitere Bestätigung im Y2H-System als „Rohdatensatz“ veröffentlicht wurden. Das Auftreten von falsch positiven Interaktionen ist leider systemimmanent, da das Y2H-System jede physikalisch stattfindende Interaktion detektiert, ohne dabei auf eine physiologische Relevanz zu selektieren. So können beispielsweise im Y2H-System

Proteine miteinander interagieren, die normalerweise durch die Kompartimentierung der Zelle räumlich getrennt sind. Neben den falsch positiven gibt es auch falsch negative Interaktionen, d.h. reale Interaktionen, die im Y2H-System nicht detektiert werden. Die intrinsischen Beschränkungen des Y2H-Systems, die zum Auftreten von falsch negativen Interaktionen führen, liegen in der Fehlfaltung von Proteinen und der damit verbundenen Instabilität der Hybridproteine, der erforderlichen Colokalisation von interagierenden Protein im Hefezellkern und dem Fehlen von notwendigen posttranslationalen Modifikationen. Auch das Vorkommen von autoaktivierenden Bait- oder Prey-Proteinen stellt eine Limitierung des Y2H-System dar. Die Erstellung von Interaktionsnetzwerken mit dem Y2H-System lohnt sich trotz dieser Beschränkungen, denn mit keinem anderen System kann eine so große Anzahl von Proteinen effektiv auf Protein-Interaktionen untersucht werden. Die Fehlerraten, die durch das nicht vermeidbare Auftreten von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen im Y2H-System entstehen, können zudem durch ergänzende bioinformatische Analysen und durch Verifizierung von Interaktionspaaren mit Y2H unabhängigen Methoden verringert werden (Bader et al., 2003).

Um die Qualität der Protein-Interaktionen innerhalb des Htt-Netzwerks abschätzen zu können, wurden 54 Interaktionspaare durch *in vitro* Bindungsexperimente überprüft. Insgesamt konnten 35 Interaktionen mit dieser biochemischen Methode bestätigt werden, was einer Verifizierungsrate von 65 % entspricht. Somit konnten im vorliegenden Htt-Netzwerk prozentual deutlich mehr Interaktionen als in früher publizierten genomweiten Netzwerken verifiziert werden (Bader et al., 2003; von Mering et al., 2002). Dies liegt zum einen daran, dass ein sehr stringentes Y2H-System mit Selektion auf drei Reportergenen verwendet wurde. Zum anderen wurden nur diejenigen Interaktionen, die mehrmals in unabhängigen Y2H-Experimenten detektiert wurden, als positiv gewertet und ins Htt-Netzwerk aufgenommen.

Die Ergebnisse der *in vitro* Bindungsexperimente zeigen, dass ca. 65 % der im Netzwerk auftretenden Interaktionen mit einer Y2H-unabhängigen Methode reproduzierbar sind. Jedoch stellt sich die Frage, ob diese Interaktionen auch eine physiologische Relevanz besitzen. Im Htt-Netzwerk besitzen zwei Proteine oft zwei identische Interaktionspartner und bilden so multiple zirkuläre Interaktionsschleifen. Dies weist darauf hin, dass die Interaktionen im Htt-Netzwerk auch unter physiologischen

Bedingungen bedeutsam sind, da diese Verknüpfungsart verstärkt in Netzwerken mit biologischer Relevanz auftritt (Milo et al., 2002). Schwikowski *et al.* definierten Netzwerkproteine, die miteinander über höchstens zwei weitere Proteine verbunden sind, als funktionelle Einheiten (Schwikowski et al., 2000). Das Htt-Netzwerk stellt nach dieser Definition eine solche Einheit dar, denn alle Proteine sind auf diese Weise miteinander verknüpft.

Beim Vergleich der Htt-Interaktionsmatrix mit vorhandenen Literaturdaten stellte sich heraus, dass mehr als 89 % der identifizierten Interaktionen unbekannt sind. Für die Qualität des Htt-Netzwerks spricht, dass 21 der 30 bereits publizierten Protein-Interaktionen detektiert wurden. Bei der Analyse der 9 fehlenden Interaktionen zeigte sich, dass entweder die essentiellen Interaktionsdomänen in den verwendeten Proteinfragmenten fehlten oder dass die in der Literatur beschriebenen Interaktionen mit einer anderen Methode wie z.B. Coimmunpräzipitation oder Affinitätschromatographie identifiziert worden sind. So wurde z.B. die Interaktion zwischen p53 und dem hADA3 Protein deshalb nicht gefunden, weil die erforderliche N-terminale Interaktionsdomäne von hADA3 (As 1-214) nicht in dem hier verwendeten hADA3 Fragment (As 235-432) enthalten war (Wang et al., 2001).

Für 16 Netzwerkproteine gab es keine funktionelle Annotierung in der Literatur. Diese Proteine haben aber mindestens einen charakterisierten Interaktionspartner im Htt-Netzwerk und konnten daher mit einem spezifischen zellulären Prozess in Verbindung gebracht werden. So wurden 14 Proteine mit transkriptionalen Vorgängen, ein Protein mit dem zellulären Proteintransport und ein weiteres Protein mit der Proteinbiosynthese assoziiert.

Im Htt-Netzwerk besitzen 15 Proteine nur einen Interaktionspartner während 8 Proteine einschließlich Htt mehr als 15 Interaktionspartner aufweisen. Auch in den bereits publizierten Interaktionsnetzwerken besitzen einige Proteine mehrere und andere nur sehr wenige Interaktionspartner (Giot et al., 2003; Ito et al., 2001b; Li et al., 2004; Uetz and Hughes, 2000). Auffällig ist, dass Proteine, die an vielen Interaktionen beteiligt sind, Zentren, sogenannte Hubs, innerhalb des Netzwerks bilden. Die Evolution begünstigt vermutlich die Entstehung von Hubs, da sie den Aufbau eines mehrstufigen Regulierungssystems für überlebenswichtige Prozesse in der Zelle erlauben.

Proteine, die solche Mittelpunkte in einem Netzwerk bilden, sind mit größerer Wahrscheinlichkeit essentiell für die Zelle als Protein mit nur wenigen Interaktionspartnern (Jeong et al., 2001). Im Einklang damit ist Htt, das innerhalb des Htt-Netzwerks einen Hub ausbildet, ein essentielles Protein.

In der Literatur wurden bereits mehr als 40 mit Htt interagierende Proteine beschrieben. Diese üben hauptsächlich Funktionen bei der Transkription, beim zellulären Transport und bei der Signalübertragung aus, weswegen auch für Htt eine Rolle bei diesen zellulären Prozessen vermutet wird (Harjes and Wanker, 2003; Li and Li, 2004). In dieser Arbeit wurden mit Y2H-Screens 19 direkte Htt-Interaktionspartner identifiziert, wobei HIP1, CA150, SH3GL3 und HYPA bereits früher als Htt-interagierende Proteine publiziert wurden. Insgesamt wurden also 15 neue Htt-Interaktionspartner gefunden, die nun weitere Ansatzpunkte für eine funktionelle Charakterisierung von Htt geben. Ähnlich wie die bereits bekannten Htt-Interaktionspartner sind einige der neuen Partner an transkriptionalen Prozessen (6), am zellulären Transport (4) oder an Signalübertragungsvorgängen (3) beteiligt. Dieses Ergebnis bestärkt daher die Vermutung, dass auch Htt eine wichtige Funktion bei eben diesen Prozessen besitzt. Die restlichen 6 mit Htt interagierenden Proteine sind bislang funktionell nicht annotiert. Aufgrund ihrer Interaktionspartner im Htt-Netzwerk ist jedoch anzunehmen, dass sie an transkriptionalen Prozessen (5) oder an der Proteinbiosynthese (1) beteiligt sind. Diese Arbeit unterstützt somit die Hypothese, dass Htt ein multifunktionelles Protein ist. Vermutlich bildet es ein Gerüst, an dessen Oberfläche sich verschiedene Proteine ansammeln und interagieren können (Harjes and Wanker, 2003).

Im Htt-Interaktionsnetzwerk treten mehrere lokale Netzwerke auf, die sich für die funktionelle Annotierung von Proteinen eignen. Ein solches Netzwerk bilden z.B. die Proteine Ku70, hADA3, PIASy, p53 und Htt (Abbildung 30). Die drei Proteine Ku70, hADA3 und PIASy gehören zu einer funktionellen Gruppe (Transkriptionskontrolle und DNA-Stabilität) und sind mit DNA-Reparaturprozessen assoziiert. Bei DNA-Schädigungen wird der Transkriptionsfaktor p53 durch posttranslationale Modifikationen stabilisiert und aktiviert, wodurch dann entweder Apoptose eingeleitet oder der Zellzyklus arretiert wird (Bernstein et al., 2002). In der Zelle bildet Ku70 mit Ku86 ein Heterodimer, das zusammen mit der Protein-Kinase DNA-PK Brüche von

DNA-Doppelsträngen repariert. Falls die Doppelstrangbrüche nicht beseitigt werden können, wird p53 durch DNA-PK phosphoryliert und somit aktiviert (Collis et al., 2005). Das Protein hADA3, ein Bestandteil von Histonacetyltransferase- (HAT-) Komplexen, interagiert mit p53. Spezifische HAT-Komplexe können p53 acetylieren, was auch zu einer Aktivierung von p53 führt (Ito et al., 2001a). Nach DNA-Schädigung interagiert hADA3 verstärkt mit phosphoryliertem p53. Es wurde gezeigt, dass hADA3 essentiell für eine vollständige Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 ist (Wang et al., 2001). PIASy ist eine E3-Ligase, die für die Sumoylierung spezifischer nuklearer Proteine verantwortlich ist. Sumoylierung ist eine posttranslationale Modifikation, bei der das SUMO-Protein auf das Zielprotein übertragen wird. Durch Sumoylierung können die Lokalisation, Aktivität, Stabilität und die diversen Interaktionen eines Proteins beeinflusst werden (Melchior et al., 2003). Auch die bei DNA-Reparaturprozessen involvierten Proteine werden durch Sumoylierung modifiziert (Dohmen, 2004; Gill, 2004). Da PIASy mit p53, Htt und hADA3 interagiert, könnte es die Sumoylierung dieser Proteine katalysieren und somit deren Aktivität beeinflussen. Dass p53 und Htt sumoyliert werden, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Schmidt and Muller, 2002; Steffan et al., 2004). Htt ist also mit den Proteinen Ku70, hADA3 und PIASy assoziiert und interagiert auch direkt mit p53 (Steffan et al., 2000). Um die Funktion von Htt bei Reparaturprozessen sowie das Zusammenspiel von Htt und p53 zu besser verstehen, sind noch weitere Experimente nötig.

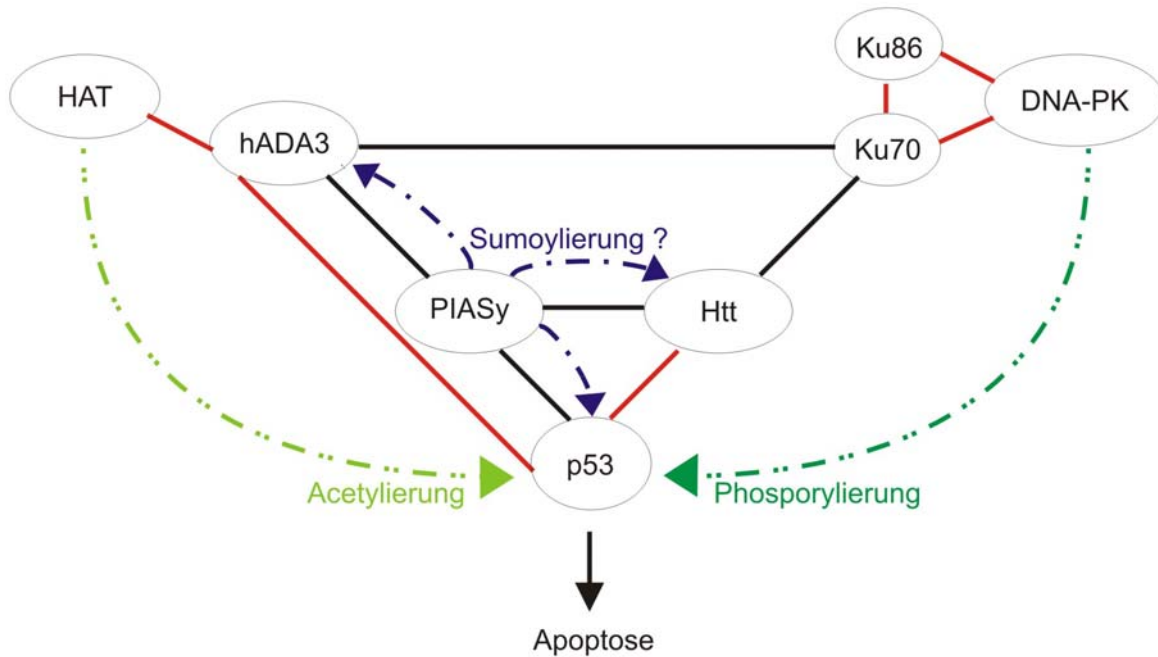


Abbildung 30: Lokales Interaktionsnetzwerk von Htt, p53 und von mit DNA-Reparatur assoziierten Proteinen. Schwarze Verbindungslinien markieren Interaktionen, die in dieser Arbeit identifiziert wurden und rote Linien repräsentieren in der Literatur beschriebene Interaktionen. Die grünen gestrichelten Linien symbolisieren posttranslationale Modifikationen, durch die p53 bei nicht zu reparierenden DNA-Doppelstrangbrüchen aktiviert wird. PIASy könnte die Sumoylierung von Interaktionspartnern katalysieren (blau gestrichelte Linien).

Ein weiteres lokales Interaktionsnetzwerk, an dem Htt beteiligt ist, wird um das Protein HIP5 gebildet (Abbildung 31). HIP5 ist ein nicht näher charakterisiertes Protein und ein direkter Interaktionspartner von Htt. Interessanterweise interagieren HIP5 sowie Htt mit den an neuronalen Differenzierungsvorgängen beteiligten Proteinen GIT1 und FEZ1 (Albertinazzi et al., 2003; Bloom and Horvitz, 1997). HIP5 besitzt vermutlich eine Funktion bei der Regulierung der Transkription, da seine Interaktionspartner HBO1, PLIP, BARD1 und GADD45G an diesem Prozess beteiligt sind (Iizuka and Stillman, 1999; Sheridan et al., 2001; Takekawa and Saito, 1998; Wu et al., 1996). Htt und HIP5 könnten als Vermittler zwischen der GIT1- und FEZ1-abhängigen neuronalen Differenzierung und der damit erforderlichen regulatorischen Anpassung der Genexpression fungieren.

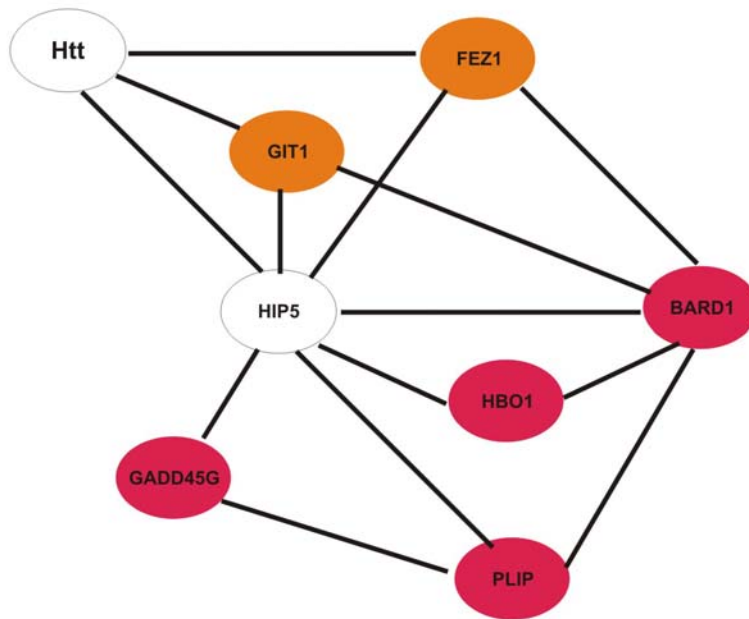


Abbildung 31: Lokales Interaktionsnetzwerk für das uncharakterisierte Protein HIP5. Rot markierte Proteine sind an der Regulierung von transkriptionalen Prozessen beteiligt und orange gekennzeichnete Proteine sind in neuronalen Differenzierungsvorgängen involviert.

Ein in dieser Arbeit identifizierter und verifizierter Interaktionspartner von Htt ist PFN2. Interessanterweise ist PFN2 spezifisch in Neuronen angereichert und moduliert die Actin-Polymerisation *in vitro* und *in vivo* (Pantaloni and Carlier, 1993; Witke et al., 1998). Für PFN2 wurden mehrere Interaktionspartner identifiziert unter anderem Dynamin I und die Synapsine IA, IB, IIA und IIB (Witke et al., 1998). Dynamin I spielt eine wichtige Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose (Damke et al., 1994) und die Synapsine bilden die Hülle von synaptischen Vesikeln (Ferreira and Rapoport, 2002). Somit ist PNF2 also nicht nur an der Polymerisierung von Actin sondern auch über seine Interaktionspartner an endozytotischen Prozessen beteiligt (Witke et al., 1998). Für Htt wird aufgrund seiner bereits publizierten Interaktionspartner HIP1, PACSIN1, SH3GL3 und HIP14 eine Rolle bei der Endocytose vermutet. Die Interaktion zwischen PFN2 und Htt deutet auf eine wichtige Verbindung zwischen der Polymerisation des Actin-Cytoskeletts und endozytotischen Prozessen an der Zelloberfläche hin.

Htt besitzt eine Vielzahl von Interaktionspartnern und ist an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Eine Herausforderung für die Zukunft ist, unter den identifizierten Htt-Interaktionen die tatsächlich biologisch relevanten herauszufiltern. Das Htt-Netzwerk bildet dabei eine gute Grundlage für weiterführende Experimente. So könnten z.B. größere Proteinkomplexe, an denen Htt oder ein anderes Netzwerkprotein beteiligt ist, aus der Zelle isoliert und mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden analysiert werden. Solche Experimente könnten zeigen, mit welchen Proteinen Htt unter bestimmten physiologischen Bedingungen assoziiert ist.

Das hier vorgestellte Htt-Netzwerk wurde auch zur Identifizierung von Proteinen genutzt, die möglicherweise den Krankheitsverlauf von HD beeinflussen. Ein potentieller Auslöser für die Pathogenese von HD ist die Aggregation von mutiertem Htt (Wanker, 2000). Zelluläre Proteine, die das Aggregationsverhalten von mutiertem Htt modulieren, haben vermutlich auch Auswirkungen auf die Krankheitsentwicklung. Mit Hilfe einer Filtrationsmethode wurden 20 Netzwerkproteine darauf hin untersucht, ob sie die Aggregation eines N-terminalen mutierten Htt-Fragments (HD169Q68) beeinflussen. Von allen getesteten Proteinen stimulierte nur das Protein GIT1 die Htt-Aggregation. Darüber hinaus konnte GIT1 auch als integraler Bestandteil der Htt-Aggregate in den Gehirnen von transgenen Mäusen und von verstorbenen Patienten nachgewiesen werden (Abbildung 27 und 28).

Die Analyse der Interaktion von dem C-terminalen GIT1-Protein (GIT-CT) und Htt zeigte, dass diese unabhängig von der Polyglutaminsequenz ist. GIT-CT bindet nicht direkt an die Polyglutamine, sondern an die darauffolgenden Aminosäuren von Htt (Abbildung 19). Der C-Terminus von GIT1 (As 376-761) enthält ein Leucin-Zipper Motiv, das für die Dimerisierung des Proteins und die Bildung von GIT1-Oligomeren *in vivo* und *in vitro* verantwortlich ist (Kim et al., 2003; Paris et al., 2003). Möglicherweise werden durch die Oligomerisierung von GIT1 vermehrt Htt-Proteinmoleküle in direkte Nachbarschaft gebracht, wodurch die Ausbildung von polaren Zippeln begünstigt und somit die Htt-Aggregation gefördert wird (Perutz et al., 1994). Die Ergebnisse der Aggregationsexperimente deuten darauf hin, dass neben der Bildung von GIT1-Oligomeren auch noch ein anderer Mechanismus für die Förderung der Htt-Aggregation verantwortlich sein könnte. Sowohl GIT-CT als auch full-length GIT1 besitzen das für die Oligomerisierung wichtige Leucin-Zipper Motiv. Jedoch wurden

bei vergleichbarer Proteinkonzentration in Gegenwart von GIT-CT mehr Htt-Aggregate gebildet als in Gegenwart von full-length GIT1 (Abbildung 26).

Anhand von immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen in COS-1-Zellen konnte gezeigt werden, dass bei Coexpression von HD169Q68 und GIT-CT beide Proteine fast ausschließlich in extrem großen vesikelartigen Strukturen in der perinuklearen Region konzentriert sind (Abbildung 24). Somit wird HD169Q68, das normalerweise diffus verteilt im Cytoplasma vorliegt, bei Coexpression mit GIT-CT in spezielle Strukturen Kompartimente rekrutiert. Solche Strukturen werden bereits bei der Überexpression von GIT-CT alleine gebildet, wobei GIT-CT sowohl innerhalb dieser Strukturen als auch im Cytoplasma vorliegt (Abbildung 23). Matafora *et al.* zeigten, dass das Fehlen der N-terminalen ARF-GAP Domäne in GIT1 die Ursache für die Bildung der vesikelartigen Strukturen ist (Matafora *et al.*, 2001). Da GIT1-CT mit dem endosomalen Marker Protein Rab11 in den vesikelähnlichen Kompartimenten colokalisiert, handelt es bei diesen wahrscheinlich um abnormale Recycling-Endosomen (Matafora *et al.*, 2001). Vermutlich entstehen bei der Coexpression von GIT1-CT und HD169Q68 mehr Htt-Aggregate als bei der Coexpression von GIT1 und HD169Q68 (vgl. Abbildung 26), weil GIT1-CT die Bildung von vesikelartigen Strukturen verursacht, in denen mutiertes Htt akkumuliert. Die starke lokale Erhöhung der Htt Konzentration in diesen Strukturen könnte zu einer gesteigerten Aggregation von mutiertem Htt führen. Es sind jedoch noch weitere Experimente nötig, um den genauen Mechanismus der durch GIT1 stimulierten Aggregation von Htt aufzuklären.

Nachdem die Interaktion von Htt und GIT1 unter physiologischen Bedingungen durch Coimmunpräzipitation beider Proteine aus humanen Gehirngewebe bestätigt werden konnte, wurde die Verteilung von GIT1 im Gehirn eines verstorbenen HD-Patienten und einer Kontrollperson vergleichend untersucht. Dabei zeigte sich, dass beim HD-Patienten GIT1 sowohl in nuklearen Einschlusskörpern als auch in cytoplasmatischen Aggregaten von Neuronen lokalisiert ist, während bei der Kontrollperson das Protein diffus im Zellkern und Cytoplasma verteilt war. Bei HD liegt also eine anormale Verteilung von GIT1 in der Zelle vor. Darüber hinaus stellte sich bei der vergleichenden Analyse von Kortexgeweben heraus, dass GIT1 bei HD-Patienten prozessiert wird. In HD-Patienten wurden fast ausschließlich C-terminale GIT1-Fragmente

mit einer Größe von 30-40 kDa nachgewiesen. Dagegen wurden bei der gesunden Kontrollperson hauptsächlich das komplette GIT1-Protein mit 95 kDa sowie ein 64 kDa großes GIT1-Fragment detektiert. Das Phänomen der GIT1-Prozessierung scheint spezifisch für HD zu sein, da ein ähnlicher Effekt im Gehirn eines unter SCA3 leidenden Patienten nicht auftrat (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für die Entstehung von C-terminalen GIT1-Fragmenten bei HD konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Mutiertes Htt löst vielleicht eine zelluläre Kaskade aus, die am Ende zur Spaltung von GIT1 führt. Durch die Delokalisation und Prozessierung von GIT1 sowie durch die Coaggregation von GIT1 und Htt kommt es bei HD möglicherweise zu einem Verlust von funktionellem GIT1-Protein.

In der Zelle spielt GIT1 eine Rolle bei der Endozytose von Membranbestandteilen und Rezeptoren. Es zirkuliert zwischen der Zellmembran, den zellulären Fokalkontakten sowie den endosomalen Recycling-Kompartimenten und ist essentiell für den Transport von diversen Proteinen wie z.B. PIX und FAK (de Curtis, 2001). Es wurde gezeigt, dass C-terminale GIT1-Fragmente übergroße endosomale Vesikel bilden, die nicht mehr zur Zellmembran gelangen (Matafora et al., 2001). Bei HD könnte es aufgrund der Entstehung von C-terminalen GIT1-Fragmenten zu Störungen bei endozytotischen Prozessen kommen, an denen GIT1 beteiligt ist.

GIT1 ist in den Zellmembranregionen lokalisiert, an denen sich Actinfilamente neu strukturieren und somit neue Ausbuchtungen der Zelle entstehen. Das aus Hühnerembryonen isolierte homologe Protein zu GIT1, p95-APP1, ist wichtig für das Wachstum von Neuriten. Die Expression eines C-terminalen p95-APP1 Fragmentes in Neuronen führte zur Inhibierung des Neuritenwachstums (Albertinazzi et al., 2003; Di Cesare et al., 2000; Matafora et al., 2001). Da beim HD-Patienten hauptsächlich C-terminale GIT1-Fragmente auftreten, kommt es möglicherweise zu einer Störung im neuronalen Wachstum. Im HD-Patienten sind besonders die striatalen Neuronen, die selektiv absterben, in ihrer Form und Größe verändert und ihre Neuriten zeigen stark abgerundete Endigungen (Graveland et al., 1985). Möglicherweise ist bei HD die Entstehung von GIT-CT Fragmenten ursächlich für diese abnormale Morphologie der striatalen Neuronen.

GIT1 spielt eine Rolle bei der Ausbildung von Synapsen, indem es die Aktivierung von Rac1 über seinen Interaktionspartner PIX moduliert. Die Aktivierung von Rac1 hat zur Folge, dass sich Actinfilamente an der Zellmembran anreichern und reorganisieren (Ridley et al., 1992). Es wird vermutet, dass die synaptische Plastizität auf der Umlagerung von Actinstrukturen beruht (Matus, 2000). GIT1 wird aufgrund einer spezifischen Signalsequenz (SLD) sowohl im prä- als auch im postsynaptischen Teil der Synapsen angereichert. Interagiert PIX mit GIT1, so wird PIX in die Synapsen transportiert und kann dort Rac1 aktivieren. Wird die normale Lokalisation von GIT1 in Neuronen gestört, so werden weniger Synapsen, stattdessen aber abnormal dendritische Fortsätze gebildet (Zhang et al., 2003). Vor kurzem wurde gezeigt, dass GIT1, PIX, Rac und PAK einen Signalübertragungskomplex bilden, der die Ausbildung von Synapsen steuert. In diesem Komplex ist GIT1 mit den Proteinen α PIX und PAK3 assoziiert (Zhang et al., 2005). Interessanterweise führen Mutationen in α PIX und PAK3 zu mentaler Retardierung sowie zum Verlust von kognitiven Wahrnehmungen (Ramakers, 2002). Bei HD-Patienten könnte die Assemblierung des GIT1-Signalübertragungskomplexes aufgrund der starken Prozessierung von GIT1 beeinträchtigt sein, wodurch möglicherweise einige der HD-typische Krankheitssymptomen ausgelöst werden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen des somatischen Kortex der Ratte zeigten, dass GIT1 in einem Komplex mit α -Liprin, GRIP und AMPA-Rezeptoren postsynaptisch angereichert ist. Bei Expression eines C-terminalen GIT1-Fragmentes wurde die α -Liprin/GIT1 Interaktion durch einen dominant negativen Effekt inhibiert. Dies reduzierte drastisch die Anzahl von AMPA-Rezeptoren in der synaptischen Membran, während die Anzahl von NMDA-Rezeptoren konstant blieb (Ko et al., 2003). Interessanterweise ist neben GIT1 ein weiterer direkter Interaktionspartner von Htt, nämlich HIP1, am Transport von AMPA-Rezeptoren beteiligt (Metzler et al., 2003). Die Analyse von symptomatischen R6/2-Mäusen ergab, dass auch in HD transgenen Mäusen die Konzentration an AMPA-Rezeptoren stark reduziert war, während die der NMDA-Rezeptoren unverändert blieb (Cha et al., 1998). In Gehirnen verstorbener HD-Patienten wurde ebenfalls eine reduzierte Anzahl an AMPA-Rezeptoren nachgewiesen (Dure et al., 1991; Wagster et al., 1994).

Die Prozessierung von GIT1 könnte die Neurodegeneration bei HD begünstigen. Im Krankheitsverlauf von HD nimmt die zelluläre Konzentration von GIT1 ab und N-terminal verkürzte GIT1-Fragmente entstehen. Diese beschleunigen höchstwahrscheinlich die Aggregation von mutiertem Htt und modulieren vermutlich die Morphologie von Neuronen und Synapsen, was dann zu einer Störungen bei der chemischen Signalübertragung führen könnte (Abbildung 32).

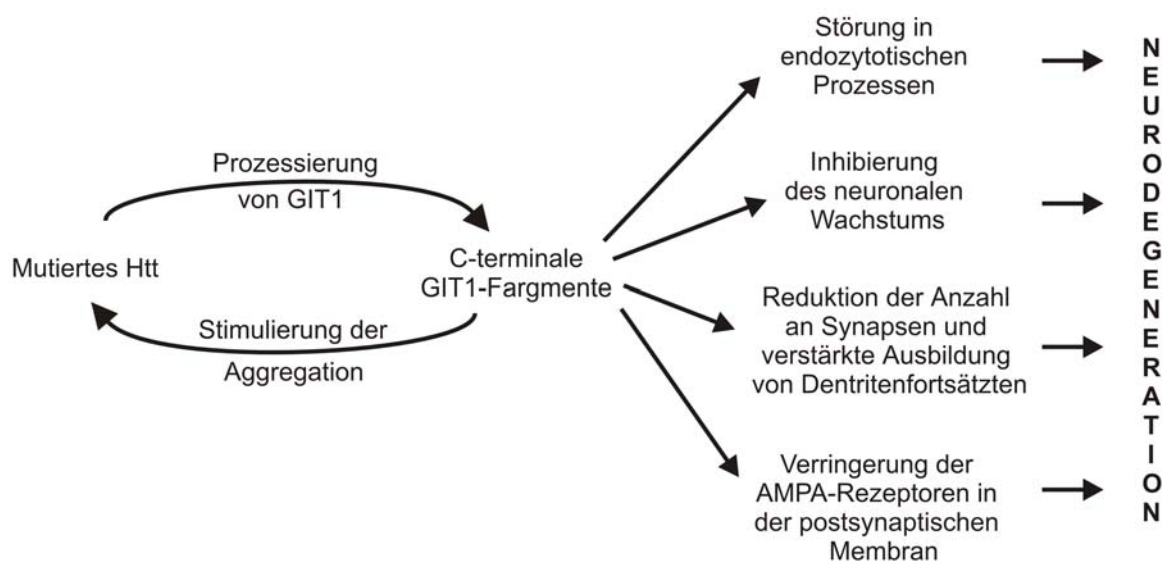


Abbildung 32: Modell zur Entstehung der Neurodegeneration bei HD durch Prozessierung von GIT1. In HD-Patienten löst möglicherweise mutiertes Htt eine zelluläre Kaskade aus, bei der C-terminale GIT1-Fragmente entstehen. Diese Fragmente könnten dann die Aggregation von mutiertem Htt beschleunigen, was wiederum die Prozessierung von GIT1 stimuliert. Die Bildung von C-terminalen GIT1-Fragmenten könnte zu Störungen bei der Endocytose und bei neuronalen Wachstumsprozessen führen, wodurch dann die Neurodegeneration bei HD hervorgerufen wird.

GIT1 ist nur ein Protein aus dem Htt-Netzwerk, für das ein direkter Zusammenhang mit der HD-Pathogenese nachgewiesen werden konnte. Durch die Charakterisierung weiterer Netzwerkproteine können wahrscheinlich noch andere Hinweise auf den molekularen Mechanismus, der HD zu Grund liegt, erhalten werden. Die für die Erstellung des Htt-Interaktionsnetzwerks angewandte Strategie kann prinzipiell auch für andere monogenetische oder multifaktorielle Krankheiten eingesetzt werden. Bis heute wurden 1 000-2 000 menschliche Gene mit Mutationen identifiziert, die

Krankheiten auslösen. Von den meisten mit Krankheiten assoziierten Proteinen ist weder die Funktion noch der Mechanismus, der zur Entstehung und zum Fortschreiten der Krankheiten führt, bekannt (Jimenez-Sanchez et al., 2001).