

5. Zusammenfassung

Chorea Huntington (HD) ist eine vererbare, progressiv verlaufende neurodegenerative Erkrankung, die durch eine verlängerte Polyglutaminsequenz in dem Protein Huntingtin (Htt) verursacht wird. Aufgrund dieser Veränderung aggregiert mutiertes Htt und lagert sich in Form von neuronalen Einschlusskörpern im Gehirn von HD-Patienten ab. Bis heute ist weder die zelluläre Funktion von Htt, noch der Pathomechanismus von HD vollständig aufgeklärt. Da Htt mit Proteinen interagiert, die bekanntermaßen eine Rolle bei der Transkriptionsregulation, bei der Endozytose sowie bei der Signalübertragung spielen, ist wahrscheinlich, dass auch Htt an diesen Prozessen beteiligt ist. Um die Funktion von Htt weiter aufzuklären, wurde in dieser Arbeit ein Protein-Interaktionsnetzwerk für Htt mit Hilfe von Hefe Two-Hybrid cDNA-Bank- und Array-Screens erstellt. Das Htt-Netzwerk setzt sich aus 64 Proteinen, die 186 Interaktionen ausbilden, zusammen. 165 dieser Interaktionen waren bisher nicht in der Literatur beschrieben. Um die Qualität des Datensatzes zu belegen, wurden 54 Protein-Interaktionen anhand von *in vitro* Bindungsexperimenten überprüft und in 35 Fällen (65 %) bestätigt. Durch Y2H-Screens wurden insgesamt 19 direkte Interaktionspartner von Htt identifiziert, von denen die meisten in transkriptionale Prozesse involviert sind. Das Htt-Netzwerk gibt neue Einblicke in die Funktion von Htt und kann als Ausgangspunkt für die Untersuchung von Proteinen genutzt werden, die möglicherweise mit der Pathogenese von HD assoziiert sind.

Ein neu identifizierter Interaktionspartner von Htt ist GIT1, ein mit einer G-Protein gekoppelten Rezeptor-Kinase interagierendes Protein. *In vitro* durchgeführte Aggregationsexperimente zeigten, dass GIT1 die Aggregation von mutiertem Htt fördert. C-terminale GIT1-Fragmente rekrutierten mutiertes Htt in vesikelartige perinukleare Strukturen, wodurch möglicherweise die Htt-Aggregation beschleunigt wird. In Gehirnen von verstorbenen HD-Patienten wurde GIT1 in den von Htt gebildeten neuronalen Einschlusskörpern nachgewiesen. Interessanterweise konnte in geschädigten Gehirngewebe von HD-Patienten kaum vollständiges GIT1 detektiert werden. Stattdessen traten dort überwiegend C-terminale GIT1-Fragmente auf. Dies deutet darauf hin, dass GIT1 bei HD proteolytisch prozessiert wird. Eine veränderte zelluläre Verteilung und eine Beeinträchtigung der Funktion von GIT1 tragen möglicherweise zur Pathogenese von HD bei.

Zur Familie der neurodegenerativen Krankheiten gehören neben HD auch die Prienerkrankungen. Diese werden durch ein einziges falsch gefaltetes Protein, dem sogenannten Prionenprotein PrP, hervorgerufen. Der Mechanismus, der zur Falschfaltung von PrP führt, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde die spontane Entstehung von Prionen in *S. cerevisiae* untersucht, da diese Hefe ein einfaches und gut etabliertes Modellsystem für die Charakterisierung von Prionen darstellt. Das Hefepriion $[PSI^+]$ entsteht durch Falschfaltung und der daraus resultierenden Aggregation des an der Translation beteiligten Terminationsfaktors Sup35. Ein besonderes Merkmal von $[PSI^+]$ ist, dass seine spontane Entstehung die Präsenz anderer Prionen wie z.B. $[PIN^+]$ voraussetzt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass $[PSI^+]$ auch unabhängig von präexistierenden Prionen induziert werden kann, wenn Sup35 mit Htt-Exon1 Fragmenten mit 54 oder 92 Glutaminen fusioniert ist. Die entsprechenden Fusionsproteine bildeten bei Expression in Hefe Aggregate und stimulierten die Aggregation von endogenem Sup35. Auch bei Expression von PrD-Htt Fusionsproteinen, die aus der N-terminale Domäne von Sup35 und Htt-Exon1 Fragmenten mit 54 oder 92 Glutaminen bestehen, wurde der $[PSI^+]$ -Phänotyp induziert. Die Effizienz der *de novo* Induktion von $[PSI^+]$ war sowohl von der Polyglutaminlänge als auch von der Aggregationsgeschwindigkeit der Fusionsproteine abhängig. Die Beobachtung, dass der durch Expression von Sup-Htt entstandene $[PSI^+]$ Phänotyp, auch nach Verlust der für die Fusionsproteine kodierenden Plasmide stabil von der Mutter- auf die Tochterzelle vererbt wird, weist darauf hin, dass Sup-Htt Aggregate nur für die *de novo* Entstehung nicht aber für die Vererbung von $[PSI^+]$ erforderlich sind. In Übereinstimmung mit den *in vivo* Daten zeigten *in vitro* Versuche mit aufgereinigten Proteinen, dass PrD-Htt Fusionsproteine spontan amyloidartige Fibrillen bilden und dass diese Aggregate die Polymerisation von aufgereinigtem löslichen Sup35-Protein initiieren können. Die polyglutaminabhängige *de novo* Induktion des Hefepriions $[PIN^+]$ zeigt, dass sich durch die Fusion mit aggregationsfördernden Polyglutaminsequenzen auch andere Prionen erzeugen lassen. Somit weisen die hier präsentierten Ergebnisse darauf hin, dass die spontane Aggregation des löslichen Prionenäquivalents die molekulare Basis für die Entstehung von Hefepriionen ist.