

## 1. Einleitung

### ***Chorea Huntington***

Chorea Huntington (HD), auch Morbus Huntington oder Veitstanz genannt, ist eine progressiv verlaufende neurologische Erbkrankheit. Der Erbgang ist autosomal dominant und betrifft 0.01-0.02 % der europäischen Bevölkerung (Harper, 1991). Die ersten Symptome zeigen sich zwischen dem vierzigsten und fünfzigsten Lebensjahr, in seltenen Fällen auch schon im Jugendalter. Die Krankheitsdauer beträgt 15 bis 20 Jahre. Die ersten Zeichen der Krankheitsmanifestation, Reizbarkeit und Unzuverlässigkeit, werden zunehmend schlimmer. Es treten Persönlichkeitsveränderungen, Enthemmung, Gewalttätigkeit, Paranoia, Demenz sowie starke Bewegungsstörungen und Hyperkinese auf. Ein fortschreitendes Absterben von Neuronen führt zum Tod (Beighton und Hayden 1981).

Gehirne von an der Krankheit verstorbenen Patienten zeigen Atrophien im Cortex und im Bereich der Basalganglien. Besonders stark sind die mittelgroßen bedornten Zellen des Striatums betroffen. Die Gehirne von Patienten sind kleiner und untergewichtig im Vergleich mit Kontrollgehirnen (Vonsattel et al., 1985). Die Selektivität mit der die mittelgroßen bedornten Zellen des Striatums absterben und das Auftreten von fibrillären Aggregaten in diesen Zellen sind wichtige Merkmale von HD.

Wahrscheinlich entstehen die Symptome der Krankheit durch ein Ungleichgewicht zwischen den Neurotransmittersystemen der Basalganglien. Es wird postuliert, dass die GABA-ergen und cholinergen Neuronen im Verlauf der Krankheit absterben, während das dopaminerge System weitgehend intakt bleibt. Somit wäre, wie auch bei der Parkinson-Krankheit, die Hyperaktivität des dopaminergen Systems für die Bewegungsstörungen verantwortlich. Bis jetzt gibt es noch keine Methode zur Heilung der Krankheit, lediglich eine Behandlung der Symptome mit Neuroleptika (Dopaminrezeptorblocker) und Antidepressiva ist möglich (Furtado und Suchowersky, 1995).

1993 wurde die Mutation die HD verursacht identifiziert (HDCRG, 1993). Sie liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 im *IT15* Gen, welches für Huntingtin, ein 348 kDa großes Protein kodiert. Im ersten Exon dieses Gens befindet sich ein CAG-Triplet mit einer Wiederholungssequenz, die normalerweise zwischen 8 und 37 CAG liegt. Bei HD-

Patienten ist diese CAG-Wiederholungssequenz verlängert. Da ein CAG-Triplet zu einem Glutamin translatiert wird, führt die Mutation zu einer Verlängerung der N-terminalen Polyglutamindomäne in Huntingtin. Die Polyglutamindomäne von krankhaft verändertem Huntingtin hat zwischen 38 und 182 Glutaminen, während die Polyglutamindomäne von normalem Huntingtin nur zwischen 8 und 37 Glutaminen hat (Rubinsztein et al., 1996; Sathasivam et al., 1997). Man spricht von einem pathologischen Schwellenwert, der bei 37 Glutaminen liegt. Die Länge der Polyglutamindomäne und die Krankheitsmanifestation sind positiv miteinander korreliert. Je länger die Polyglutamindomäne ist, desto früher beginnt die Krankheit und desto stärker sind die Symptome. Nicht mutiertes Huntingtin wirkt anti-apoptotisch in Neuronen des zentralen Nervensystems und reduziert die Toxizität von mutiertem Huntingtin (Leavitt et al., 2000).

Die Funktion von Huntingtin und wie es zum selektiven neuronalen Zelltod kommt ist noch nicht vollständig geklärt. Huntingtin ist phylogenetisch konserviert, was ein Merkmal essentieller Proteine ist. Es ist notwendig bei der Embryonalentwicklung, wie man aus Experimenten mit „knock-out“ Mäusen erkannt hat (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995), außerdem bei der Gastrulation (Zeitlin et al., 1995; Nasir et al., 1995; Duyao et al., 1995), der Neurogenese (White et al., 1997) und es scheint eine wichtige Rolle beim sekretorischen und endozytischen Vesikeltransport zu spielen (Velier et al., 1998; Kegel et al., 2000; Waelter et al., 2001). Huntingtin hat darüber hinaus Einfluss auf die Transkription (Zuccato et al., 2001; Cha et al., 2000).

Zusätzlich gibt es zahlreiche weitere Hypothesen zur Funktion von Huntingtin. Es könnte eine Rolle in den Signalwegen zwischen Kern und Mitochondrien spielen (Sawa, 2000), auch bei der Bildung der Zellmembranen und bei der Morphogenese der Zelle (Hattula und Peranen, 2000), bei der Eisenaufnahme und der Hämatopoese wurde eine Beteiligung von Huntingtin vermutet (Metzler et al., 2000; Hilditch-Maguire et al., 2000). Aufgrund seiner Größe von ca. 3144 Aminosäuren scheint es plausibel, dass Huntingtin mehrere Funktionen in verschiedenen Zellkompartimenten übernimmt.

### ***Andere Krankheiten mit einer Verlängerung der Polyglutamindomäne***

Das Auftreten von einer Verlängerung der Polyglutamindomäne wird nicht nur bei Chorea Huntington, sondern vielmehr bei einer ganzen Klasse von neurodegenerativen

Erbkrankheiten beobachtet, die in Tabelle 1 aufgeführt sind (Gusella et al., 1995; Lunkes et al., 1995).

<b>Krankheit</b>	<b>Betroffenes Protein</b>	<b>Literatur</b>
Dentaturubrale Pallidolysische Atrophie (DRLPA)	Atrophin	Nagafuchi et al., 1994; Koide et al., 1994
Spinobulbar Muskuläre Ataxie (Kennedy Krankheit)	Androgen-Rezeptor	Igarashi et al., 1992
Spinocerebrale Ataxie-1 (SCA 1)	Ataxin 1	Tilley et al., 1989
Spinocerebrale Ataxie-2 (SCA 2)	Ataxin 2	Sanpei et al., 1996
Spinocerebrale Ataxie-3 (MJD, Machado-Joseph Krankheit) (SCA 3)	Ataxin 3	Kawaguchi et al., 1994
Spinocerebrale Ataxie-6 (SCA 6)	$\alpha_{A1}$ -Untereinheit des Purkinje-Zell spezifischen $Ca^{2+}$ -Kanals	Zhuchenko et al., 1997
Spinocerebrale Ataxie-7 (SCA 7)	Ataxin 7	David et al., 1997
Spinocerebrale Ataxie-17 (SCA 17)	Tata-Binding- Protein	Koide et al., 1999; Nakamura et al., 2001

**Tabelle 1:** Neurodegenerative Erbkrankheiten mit verlängerter Polyglutamindomäne

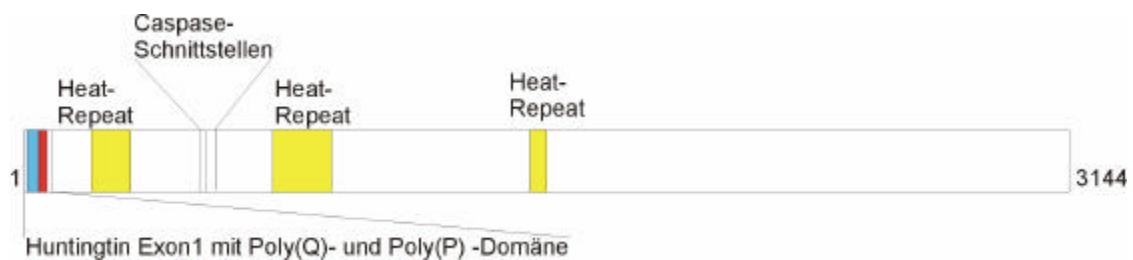
Die klinischen Symptome dieser Krankheiten ähneln einander. Wie bei HD werden die Proteine in fast allen Geweben exprimiert, aber es sterben nur spezifische, jeweils unterschiedliche Unterklassen von Neuronen ab. Als ein allgemeiner zu Grunde liegender Mechanismus dieser Erbkrankheiten wird vermutet, dass die Expression eines Proteins mit verlängerter Polyglutamindomäne zum Zelltod führt. Bei allen diesen Krankheiten ist die Länge der Polyglutamindomäne entscheidend für die Ausprägung der Krankheit

(Perutz et al., 1999). Es konnte sogar in Tierversuchen gezeigt werden, dass eine künstlich eingeführte lange Polyglutamindomäne zu einem ähnlichen Phänotyp führt, wie bei den oben genannten Krankheiten: Gehirne von transgenen Mäusen mit Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase mit 146 eingefügten Glutaminen zeigen nukleare Einschlüsse und Neurodegeneration (Ordway et al., 1997).

### **Molekulare Grundlagen der Krankheit**

Huntingtin ist ein cytosolisches Protein, das vorwiegend im Gehirn und dort besonders stark im Cortex und im Striatum exprimiert wird. Aber es ist auch in fast allen anderen Geweben nachgewiesen worden (Sharp et al., 1995; Trottier et al., 1995; Sharp et al., 1996; Ross et al., 1997; Fusco et al., 1999).

Wenige Strukturdomänen sind erkennbar, wenn man Huntingtin mit bekannten Proteindomänen vergleicht (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Proteindomänen von Huntingtin

Neben der für die Krankheit ursächlichen N-terminalen Polyglutamindomäne ist eine Polyprolindomäne lokalisiert. Des Weiteren finden sich zentral im Protein Analogien mit sogenannte HEAT-Domänen, von denen angenommen wird, dass sie bei der Chromatin-Organisation eine Rolle spielen. Huntingtin weist bei den Aspartaten D513, D530, D586 potentielle Schnittstellen für Caspasen auf (Wellington et al., 2000).

Ein besonderes Merkmal von mutiertem Huntingtin ist, dass es unlösliche Proteinaggregate mit fibrillärer Struktur *in vivo* und *in vitro* bilden kann (Davies et al., 1997; Scherzinger et al., 1997). Diese Proteinaggregate lagern sich als intranukleare Einschlüsse in den Kernen von absterbenden Neuronen in Patientengehirnen ab (DiFiglia et al., 1997; Gutekunst et al., 1999; Sierdzan et al., 1999). Elektronenmikroskopische Analysen zeigen, dass sie aus N-terminalen Fragmenten des Huntingtins bestehen und

eine fibrilläre Struktur haben (Davies et al., 1997; Scherzinger et al., 1997). Es wird vermutet, dass durch Proteolyse von Huntingtin, entweder durch Caspasen oder andere Proteasen, ein N-terminales Fragment entsteht, welches Aggregate und Einschlüsse in den Zellen bildet (DiFilglia et al., 1997).

Unlösliche Aggregate aus Proteinen mit Polyglutamindomänen konnten auch in Hefe (Krobitsch et al., 2000; Muchowski et al., 2000), in *Caenorhabditis elegans* (Faber et al., 1999; Satayl et al., 2000), in *Drosophila melanogaster* (Jackson et al., 1998; Kazemi-Esfarjani et al., 2000; Marsh et al., 2000), in transgenen Mäusen (Davies et al., 1997; Li et al., 2000; Schilling et al., 1999) und in unterschiedlichen Zellkulturmodellen (Lunkes et al., 1998; Kazantsev et al., 1999; Martindale et al., 1998; Waelter et al., 2001) nachgewiesen werden. Intranukleare Einschlüsse aus Proteinaggregaten mit Polyglutamindomänen wurden auch bei Patienten mit SCA1 (Matilla et al., 1997; Skinner et al., 1997), SCA3 (Paulson et al., 1997), SCA7 (Holmberg et al., 1998) und DRPLA (Becher et al., 1998; Ross et al., 1998; Igarashi et al., 1998) gefunden. Alle intranuklearen Einschlüsse enthalten neben den Proteinen mit der verlängerten Polyglutamindomäne zusätzlich Ubiquitin (Becher et al., 1998; Cooper et al., 1998; Davies et al., 1997; Gourfinkel-An et al., 1998; Sieradzan et al., 1999). Auch bei der Alzheimerschen Krankheit, der Parkinson-Krankheit, der Amyotrophischen Lateralen Sklerose und bei den Prionenerkrankungen werden unlösliche Proteinaggregate für ursächlich gehalten (Harper et al., 1997; Koo et al., 1999).

Im Gegensatz dazu zeigten Sandou und Kollegen, dass die nukleare Lokalisation, aber nicht die Aggregation von Huntingtin zum Zelltod von Neuronen in Zellkultur führt (Sandou et al., 1998). In dieser Studie führte die Produktion von mutiertem Huntingtin in kultivierten striatalen Neuronen zur Apoptose. Wurde die nukleare Lokalisation des mutierten Huntingtins unterbunden, war keine Aggregation und keine Apoptose zu beobachten. Unter reduzierten Expressionsbedingungen, bei denen sich keine Aggregate bilden können, war dennoch der Zelltod verstärkt. So kommen die Autoren zu dem Schluss, dass die Aggregation eher als ein Mechanismus zum Schutz der Zelle zu sehen ist. Eine weitere Bestätigung für diese Theorie kommt aus Versuchen mit YAC (*yeast artificial chromosome*) Mäusen. Diese exprimieren humanes Huntingtin, welches zusammen mit der kompletten regulatorischen Domäne auf einem YAC kodiert ist. Diese Mäuse zeigen nach der Expression von Huntingtin mit verlängerter Polyglutamindomäne

Neurodegeneration schon in der Abwesenheit von Aggregaten. Kontrollmäuse zeigen diesen Phänotyp nicht (Hodgson et al., 1999).

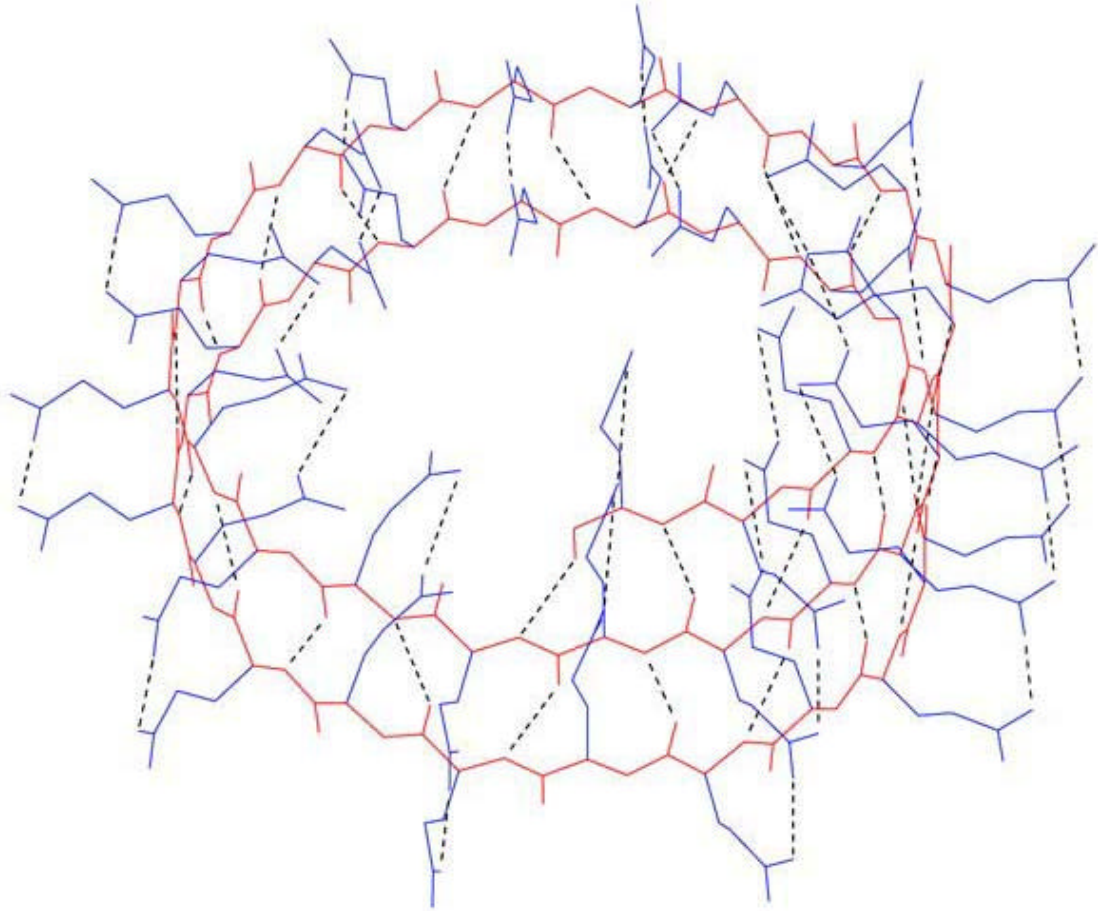
Die unlöslichen Aggregate werden über Ubiquitinierung und über das Proteasom abgebaut (Kim et al., 1998; Tanzi et al., 1998). Es wird auch diskutiert, dass das Proteasom dadurch in seinen anderen Funktionen eingeschränkt wird. Die essentielle Proteindegradation im Stoffwechsel der Zelle kann nicht mehr gewährleistet werden und führt zum Zelltod (Kopito et al., 2000). Auch wenn der genaue Mechanismus wie die verlängerten Polyglutamindomänen in Huntingtin zur Neurodegeneration führen nicht bekannt ist, scheint die Aggregation von Huntingtin eine zentrale Rolle bei HD zu spielen. Hinweis dafür kommen aus einem Drosophila-Modell, bei dem das Auftreten von Aggregaten in Photorezeptorneuronen mit der Pathologie verknüpft ist und eine Inhibition der Aggregation zu einem Schutz der Neuronen führt.

### **Strukturen der Aggregate aus Huntingtin**

Proteinaggregate, die sich aus Huntingtin bilden, sind amyloide Fibrillen, die selbst durch Erwärmen auf 98 °C in SDS stabil bleiben. Dies läßt darauf schließen, dass die Proteine untereinander kovalent oder durch sehr starke nicht kovalente Wechselwirkungen verbunden sind (Perutz et al., 1994; Scherzinger et al., 1997). Diese strukturelle Besonderheit führt zu zwei verschiedenen diskutierten Mechanismen der Aggregation.

Als erstes ist vorgeschlagen worden (Green et al., 1993), dass die verlängerte Polyglutamindomäne des Huntingtins ein Substrat für Transglutaminasen sein kann. Diese Transglutaminasen katalysieren die Bildung von kovalenten Isopeptidbindungen zwischen Glutaminen und Lysinen. So wäre es möglich, dass sich kovalente Bindungen zwischen den Polyglutamindomänen und Lysinen benachbarter Proteine bilden und sich große Proteinaggregate bilden. Es gibt mehrere indirekte Hinweise für eine Beteiligung von Transglutaminasen bei der Proteinaggregation: *In vitro* konnte gezeigt werden, dass synthetische Peptide und Proteine mit Polyglutamindomänen Substrate für Transglutaminasen sind (Kahlem et al., 1996; Karpuj et al., 1999). Auch in Patientengehirnen gibt es neuerdings Nachweise für eine erhöhte Aktivität von Transglutaminasen (Jeitner et al., 2001). Mäuse, die transgen für Huntingtin sind, überleben länger und zeigen weniger unkontrollierte Bewegungen als Kontrollen, wenn sie mit Cystamin, einem Inhibitor von Transglutaminasen, behandelt werden (Karpuj et al., 2002).

Im Gegensatz zu dieser Hypothese berechnet Perutz (Perutz et al., 2002), dass sich aus Polyglutamindomänen mit mehr als 40 Glutaminen wassergefüllte Fibrillen mit  $\beta$ -Faltblattstruktur bilden, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Haupt- und der Seitenkette stabilisiert sind.



**Abbildung 2:** Struktur der  $\alpha$ -Helix einer Polyglutamindomäne; Peptidrückrad in rot, Seitenketten in blau, Wasserstoffbrücken gepunktet (Perutz et al., 2002).

Diese Strukturen können Keime für die Aggregation bilden und es ist möglich, dass auch andere Proteine mit Polyglutamindomänen in die Aggregate integriert werden. Sowohl elektronenmikroskopische Untersuchungen der Aggregate aus Polyglutamindomänen, als auch die Brechung von polarisiertem Licht nach Färbung der Aggregate mit Kongorot

(Birefringenz) zeigen Merkmale von  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Scherzinger et al., 1997). Scherzinger et al. haben *in vitro* gezeigt, dass sich SDS-stabile Aggregate aus Huntingtin-Fragmenten mit mehr als 37 Glutaminen formen können (Scherzinger et al., 1997; Scherzinger et al., 1999). Diese Strukturen werden auch in Abwesenheit von Transglutaminasen gebildet. Außerdem zeigen die Autoren, dass in Mäusegehirnen, die ein Huntingtin Exon 1 Protein mit 118-156 Glutaminen exprimieren, fibrilläre Strukturen gefunden werden (Bates et al., 1997; White et al., 1997). Diese fibrilläre Strukturen finden sich auch bei Prionen, wie zum Beispiel Scrapie (Merz et al., 1981), BSE (Hope et al., 1988), dem Prionenäquivalent aus der Hefe Sup35 (Balbirnie et al., 2001), aber auch bei  $\alpha$ -Synuclein von Parkinson Patienten (Spillantini et al., 1998) oder  $\beta$ -Amyloid von Alzheimer Patienten (Merz et al., 1983).

Analog zu  $\beta$ -Amyloid,  $\alpha$ -Synuclein und Transthyretin wird vermutet, dass die Aggregation von Huntingtin ein keimabhängiger Polymerisationsprozess ist. Scherzinger et al. (1997) konnten für ein verkürztes Huntingtin-Fragment nachweisen, dass eine kritische Konzentration überschritten werden muß, um zu einer Aggregation zu führen. Die kinetische Analyse zeigte, dass die Aggregation zunächst eine lag-Phase durchläuft, und dann nach einer exponentiellen Wachstumsphase in einer Sättigungsphase endet. In der lag-Periode beginnt die Oligomerisierung der Monomere. Die lag-Periode ist abhängig von der Konzentration und kann durch Zugabe exogener Keime übersprungen werden. In dieser Arbeit wird der keimabhängige Polymerisationsprozeß und die Kinetik der Fibrillenbildung von Huntingtin Exon 1 untersucht.

### ***Gewinnt oder verliert Huntingtin durch die Mutation eine Funktion?***

Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene Theorien darüber, wie die verlängerte Polyglutamindomäne zu einem Ausbruch von HD führt. Bei der ersten Theorie wird angenommen, dass die Verlängerung der Polyglutamindomäne zu einer neuen pathologischen Funktion führt, einem „*gain of function*“ (MacDonald und Gusella 1996). HD hat den typischen Phänotyp einer „*gain of function*“ Mutation, mit einer Antizipation, d.h. Zunahme der CAG- Wiederholungen von einer Generation zur nächsten.

Molekulare Hinweise dazu gibt es aus Tiermodellen. Mäuse, die transgen für das erste Exon des humanen Huntingtins mit einer Polyglutamindomäne mit acht Glutaminen sind, bleiben gesund (Mangiarini et al., 1996). Mäuse, die transgen für das erste Exon des



humanen Huntingtins mit verlängerter Polyglutamindomäne von 118-156 Glutaminen sind, zeigen jedoch neurologische Symptome, die denen von HD ähneln (Bates et al., 1997; White et al., 1997). Da diese Mäuse auch ihr eigenes funktionelles Mäuse-Huntingtin exprimieren folgert man, dass die mutierte humane Form des ersten Exon 1 von Huntingtin alleine für den Phänotyp verantwortlich ist. Darüber hinaus zeigen „*knock-out*“ Mäuse für Huntingtin, das heißt Mäuse die kein Huntingtin exprimieren, einen wesentlich anderen Phänotyp. Die Embryos sterben nach 7,5 Tagen mit schweren Defiziten bei der Entwicklung des Ektoderms (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Die „*gain of function*“ Theorie wird durch mathematische, biophysikalische, strukturelle und *in vitro* Studien zur Aggregation von Huntingtin und von Polyglutaminpeptiden unterstützt (Scherzinger et al., 1997; Perutz et al., 1994; Cha et al., 2000).

Humane Erbkrankheiten können auch durch einen Verlust der Funktion eines Proteins, einer „*loss of function*“ Mutation, ausgelöst werden. Typisch ist für den humanen Phänotyp einer „*loss of function*“ Mutation eine im Stammbaum sichtbare zunehmende Penetranz von einer Generation zur nächsten. Ein Beispiel hierfür ist das Fragile-X-Syndrom, auch eine neurodegenerative und neuromuskuläre Erkrankung, mit einer Verlängerung einer Trinukleotid-Wiederholung. Es wird durch eine CGG-Wiederholung in einer nicht kodierenden Region des *fragile X* Genes verursacht. Diese verlängert sich von Generation zu Generation. Patienten haben mehr als 200 Wiederholungen und eine abnormal methylierte CGG Sequenz, wodurch das FMR1 Gen nicht in mRNA transkribiert werden kann (für einen Überblick siehe Oostra et al., 2001).

Trotz des bei HD zu beobachtenden „*gain of function*“, wird neuerdings diskutiert, dass auch der Verlust von wichtigen Funktionen des normalen Huntingtins zum Krankheitsbild beiträgt. Zuccato und Kollegen zeigen, dass nicht mutiertes Huntingtin die Proteinsynthese des BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) verstärkt. BDNF wird schwächer exprimiert, wenn Huntingtin eine verlängerte Polyglutamindomäne hat. Striatale Neuronen brauchen BDNF zum Überleben und zur Differenzierung. Wird BDNF nicht mehr in ausreichenden Mengen synthetisiert, sterben die Neuronen ab. Demnach wäre der Beginn der Krankheit auf einen Verlust der Funktion von normalem Huntingtin zurückzuführen (Zuccato et al., 2001).

### ***Huntingtin mit normalen und verlängerten Polyglutamindomänen***

In der Regel wird sowohl die paternale als auch die maternale Kopie autosomaler Gene in Zellen exprimiert. In allen Zellen von Patienten liegt Huntingtin mit normaler und verlängerter Polyglutamindomäne gleichzeitig vor. Auch wenn man davon ausgeht, dass die verlängerte Polyglutamindomäne von Huntingtin toxisch ist, kann man nicht ausschließen, dass zusätzlich ein Verlust der Funktion von Huntingtin mit normaler Polyglutamindomäne bei HD eine Rolle spielt. Es gibt auch Hinweise *in vitro* und *in vivo* darauf, dass Huntingtin mit normaler Polyglutamindomäne in die Aggregate aus Huntingtin mit verlängerter Polyglutamindomäne rekrutiert wird (Huang et al., 1998; Wheeler et al., 2000; Kazantsev et al., 1999). Dies legt nahe, dass die Toxizität von Huntingtin mit verlängerter Polyglutamindomäne durch die Rekrutierung von Huntingtin mit normaler Polyglutamindomäne verursacht werden könnte. Ona et al. berichten von einer Verarmung des endogenen, kompletten Huntingtins in einem Mausmodell von HD, nicht aber in den Kontrollmäusen (Ona et al., 1999).

Für diese Theorie spricht auch, dass transgene Mäuse und Zellen der Zellkultur in Abwesenheit von Huntingtin mit normaler Polyglutamindomäne geringere Überlebensfähigkeit zeigen (O'Kusky et al., 1999; Rigamonti et al., 2000; Dragatsis et al., 2000). In dieser Arbeit wird die Rolle von nicht mutiertem Huntingtin bei der Aggregation untersucht. Bis jetzt ist wenig darüber bekannt, ob und wie es in die Aggregate rekrutiert wird. Ein *in vitro* System soll dafür etabliert werden und die entstehenden Resultate auch *in vivo*, in Zellkultur, untersucht werden.

### ***Die Aggregation von Proteinen***

Die Aggregation von Proteinen in unlösliche intrazelluläre Komplexe und Einschlüsse ist im Zusammenhang mit vielen neurodegenerativen Krankheiten bei Menschen zu finden, wie zum Beispiel bei der Alzheimer-Krankheit, der Parkinson-Krankheit, den Spinocerebralen Ataxien, der Amyotrophischen Lateralen Sklerose und bei den Prionenerkrankungen (Fink, 1998). Es wird angenommen, dass Proteine aggregieren indem sie unspezifisch coagulieren, solange die Polypeptidketten noch nicht oder erst teilweise gefaltet sind. Zu diesem Zeitpunkt exponieren sie hydrophobe Oberflächen, die dann miteinander interagieren können. Die Produktion von zu vielen ungefalteten oder denaturierten Polypeptiden wird toxisch für die Zelle, denn mit diesen Proteinen coaggregieren andere zelluläre Proteine, die eigentlich keine Beziehung zu den

Polypeptiden haben, sondern nur zeitweise interagierende Oberflächen aufweisen (Trojanowski et al., 2000; Perutz et al., 1994; Bruijn et al., 1998). In *in vitro* Studien der Faltung und Interaktion von chemisch denaturierten Polypeptiden hat man festgestellt, dass die Aggregation von spezifischen intermolekularen Wechselwirkungen abhängig ist. Dabei interagieren nur bestimmte Domänen innerhalb der sich faltenden Zwischenstufen zu einer definierten Tertiärstruktur (Wetzel et al., 1996). Die Spezifität der Interaktion wurde bei der keimabhängigen Polymerisation von amyloiden Proteinen (Jarret et al., 1992) und bei der Selektivität der Bildung von Aggregaten aus Modellproteinen untersucht (Speed et al., 1996). Die Ergebnisse dieser Versuche beziehen sich auf die Aggregation von gereinigten, denaturierten Proteinen in stark verdünnten Lösungen. Wenige Studien sind bis jetzt bekannt, die sich auf den Mechanismus und auf die Spezifität der Proteinaggregation *in vivo* beziehen (Chien et al., 2001; Rajan et al., 2001). In Zellen können sehr viele Faktoren die Proteinaggregation beeinflussen, wie zum Beispiel die Proteinsynthese, die Proteinkonzentration, molekulare Chaperone (Faltungshelfer) und Proteasen. Posttranslationale Modifikationen wie Glykolisierungen von Proteinen und Effekte durch Unterschiede in den Zellkompartimenten können ebenfalls eine Rolle spielen (Minton et al., 2001).

In Zellen bilden aggregierte Proteine Einschlüsse mit konkreten Grenzen. Diese Einschlüsse bestehen bei Bakterien oft nur aus einer aggregierten Proteinart. Dort werden in der Regel keine anderen zellulären Proteine in die Aggregate einbezogen. Im Gegensatz dazu haben solche Einschlüsse in Säugetieren oft eine sehr komplizierte Struktur. Sie bestehen aus mehreren Proteinen, z.B. aus Chaperonen, Proteinen des Ubiquitin-Proteasom-Abbauweges, Proteinen des Zentrosoms und Zytoskeletts (Kopito et al., 2001; Waelter et al., 2001). Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei den Signalkaskaden, der Zellteilung und bei der Apoptose. Eine Ursache für das Absterben der Neuronen könnte also sein, dass falsch gefaltete, beschädigte oder mutierte Proteine mit normalen, zellulären Proteinen aggregieren und so zelluläre Einschlüsse bilden. Diese können für die beobachtete Toxizität solcher Proteinaggregate verantwortlich sein, die oft mit neurodegenerativen Erkrankungen einher gehen (Perutz et al., 1994; Steffan et al., 2000; Nucifora et al., 2001, Waelter et al., 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass intakte Mikrotubuli für die Entstehung der Einschlüsse wichtig sein können (Muchowski et al., 2002).

Eine wesentliche Rolle wird dabei dem Dynein/Dynactin abhängigen retrograden Vesikeltransport zugeschrieben. Durch Anhäufung von aggregierenden Proteinen in der Nähe des Zentrosoms, welches die Mikrotubuli organisiert, entstehen perinukleare (kernnahe) Einschlüsse (Notterpek et al., 1999; Gracia-Mata et al., 1999; Kabore et al., 2001; Waelter et al., 2001; Johnston et al., 1998). Wie diese komplexen Einschlüsse durch das Coaggregieren von verschiedenen Proteinen entstehen und welche Rolle die fibrilläre Struktur von Aggregaten aus Huntingtin dabei spielt ist ungeklärt.

### ***Rekrutierung von anderen Proteinen in die Huntingtin-Aggregate***

Die Aggregate die sich bei HD bilden, bestehen nicht nur aus Huntingtin, sondern auch andere Proteine colokalisieren mit Huntingtin in den Aggregaten. Neben Ubiquitin finden sich auch Untereinheiten des Proteasoms, sowie Chaperone und Transkriptionsfaktoren in den Huntingtin-Aggregaten. Proteine, die an der Transkription und an deren Regulation beteiligt sind, liegen in der Zelle oft in sehr geringen Konzentrationen vor. Eine Einbindung in die Aggregate und damit der Verlust für den Zellstoffwechsel hat Auswirkungen auf die Proteinsynthese und meist den Zelltod zur Folge. Verschiedene Transkriptionsfaktoren sind in den Aggregaten aus Huntingtin gefunden worden, zum Beispiel CA150 (Holbert et al., 2001), das CtBP (Kegel et al., 2002), p53 (Steffan et al., 2000), CBP (Steffan et al., 2000) sowie mSin3A (Bouttell et al., 1999) und N-CoR (Bouttell et al., 1999; Jones et al., 1999). Steffan et al. und Zuccato et al. haben gezeigt, dass Huntingtin mit verschieden langen Polyglutamindomänen einen unterschiedlichen Einfluß auf die Transkription hat (Steffan et al., 2000; Zuccato et al., 2001). Einige Transkriptionsfaktoren verfügen über Polyglutamindomänen, von denen angenommen wird, dass sie bei DNA-Interaktionen oder bei Protein-Protein-Interaktionen während der Bildung von aktiven Transkriptionskomplexen eine Rolle spielen (Cha et al., 2001). Es wird angenommen, dass Proteine durch die Polyglutamindomäne in Aggregate aus Huntingtin rekrutiert werden. Beispiele sind das TATA-Bindungsprotein, ein Transkriptionsfaktor mit 38 Glutaminen oder das CBP-Protein, ein Coaktivator der Transkription mit 18 Glutaminen (Suhr et al., 2001; Steffan et al., 2000)

In dieser Arbeit wurde analysiert, wie Transkriptionsfaktoren in die Aggregate aus Huntingtin rekrutiert werden. Aus Datenbanken wurden humane Transkriptionsfaktoren gesucht, die eine Polyglutamindomäne von mehr als 15 Glutaminen haben. Die Auswahl

wurde zusätzlich auf solche, die in neuronalen Geweben exprimiert werden beschränkt. Diese Kriterien wurden von TBP und N-OCT 3 erfüllt.

TBP verfügt über eine C-terminale Polyglutamindomäne mit 38-42 Glutaminen und ist essentiell für die Transkription fast aller Proteine. In eukaryotischen Zellen wird die Transkription von Genen durch die Bildung der RNA-Polymerase-spezifischen Initiationskomplexe mit TBP reguliert. TBP bindet an die Promotoren, rekrutiert Transkriptions-Coaktivatoren und reguliert so die wesentlichen Mechanismen der Transkription während der Initiation und Elongation (Hernandez, 1993; Burley, 1996; Lee et al., 1998; Albright et al., 2000). Zusätzlich ist TBP bei der Organisation des Chromatins in der Zelle und bei Umstrukturierung des Chromatins während der Mitose wesentlich beteiligt (Aalfs et al., 2000; Chen et al., 2002). Es ist gefunden worden, dass auch in TBP die Polyglutamindomäne mit bis zu 65 Glutaminen krankhaft verlängert sein kann. Bei diesen Patienten mit Spinocerebraler Ataxie 17 zeigen sich ähnliche Symptome wie bei Patienten mit anderen Spinocerebralen Ataxien (Koide et al., 1999; Nakamura et al., 2001).

NOCT3 hat eine Polyglutamindomäne mit 18 Glutaminen und wird auch Brn-2 genannt (Schreiber et al., 1993; Thomson et al., 1995). NOCT3 ist ein Mitglied der POU-Domänen Proteine, welche spezifisch die DNA-Sequenz ATGCAAAT binden und eine Familie von Transkriptionsregulatoren bilden (Schreiber et al., 1990; Schreiber et al., 1993). Interessant ist, dass ein POU-Domänen Protein, Skn-1a, an CBP bindet (Sugihara et al., 2001), welches mit Huntingtin-Aggregaten colokalisiert. NOCT3 aktiviert die Transkription besonders im neuronalen Gewebe von Eukaryoten. Es ist für die Entwicklung und das Überleben des endokrinen Hypothalamus und der Kernbildung in der hinteren Hypophyse notwendig (Schonemann et al., 1995). Neueste Ergebnisse zeigen, dass es eine Rolle bei der neuronalen Migration und der Entwicklung des Gehirns spielt (McEvelly et al., 2002).

An die Polyglutamindomäne von NOCT3 bindet PQBP1. Es wurde gezeigt, dass es verstärkt an verlängerte Polyglutamindomänen von Huntingtin und an den Androgen Rezeptor in Hefe assoziiert (Waragai et al., 1999). Es bindet an einen Teil des Spliceosoms und kann nukleare Aggregate bilden. PQBP1 inhibiert die Transkription durch NOCT3 und verringert das Überleben von Zellen (Waragai et al., 1999). Dieses

Protein bindet auch an das Proteinmotiv PPGPPP, welches ähnlich nach der Polyprolindomäne in Huntingtin Exon 1 gefunden wurde (Komuro et al., 1999).

Sowohl TBP und NOCT3 als auch PQBP1 wurden ausgewählt, um ihre Rolle bei der Aggregation von Huntingtin Exon 1 *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Dabei wurde analysiert, ob ein Coaggregationsmechanismus über Polyglutamindomänen vorliegt.