

3. Diskussion

HD ist eine dominante Erbkrankheit, deren Ursache eine verlängerte Polyglutamindomäne am N-Terminus von Huntingtin ist, einem Protein mit bislang unbekannter Funktion (HDCRG, 1993). In Gehirnen von Patienten wurden in den betroffenen Nervenzellen amyloide, fibrilläre Aggregate aus N-terminalen Fragmenten von Huntingtin nachgewiesen (Roizin et al., 1974; DiFiglia et al., 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass nur kleine N-terminale Fragmente von Huntingtin mit einer verlängerten Polyglutamindomäne aggregieren, während das komplette (*full-length*) Huntingtin mit einer verlängerten Polyglutamindomäne löslich bleibt und nicht aggregiert (DiFiglia 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 (DiFiglia et al., 1997; Wellington et al., 2000).

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen zu beleuchten, nach denen N-terminale Fragmente von Huntingtin aggregieren. Dazu wurde die Aggregation eines N-terminalen Huntingtinfragmentes, das vom Exon 1 des *IT15* Gens kodiert wird, analysiert. Die untersuchten Huntingtin Exon 1 Proteine haben eine Länge von ca. 90 Aminosäuren und tragen verschieden lange Polyglutamindomänen. Es wurde ein *in vitro* und ein *in vivo* Aggregations-System etabliert. Mit diesen Systemen war es möglich die Aggregation und die Fibrillenbildung von Huntingtin Exon 1 mit toxischer Polyglutamindomäne zu untersuchen. Zudem konnte die Coaggregation von normalem Huntingtin Exon 1 in Aggregate und die Coaggregation von nuklearen Proteinen mit Polyglutamindomänen analysiert werden.

Die *in vitro* Untersuchung von einfachen Peptiden hat bereits früher erste Einsichten über den Aggregationsmechanismus von N-terminalen Huntingtin-Fragmenten ergeben (Perutz et al., 1997; Chen et al., 2001; Scherzinger et al., 1997; Scherzinger et al., 1999). Es wurden synthetische Peptide mit 10-44 Glutaminen untersucht, die von zwei N- und C-terminalen Lysin oder Aspartaten benachbart waren, um die Löslichkeit zu erhöhen (Perutz et al., 1997; Chen et al., 2001). In den zwei Systemen können nur Peptide mit bis zu 44 Glutaminen bearbeitet werden (Perutz et al., 1997; Chen et al., 2001). Zusätzlich wurden die Peptide einem Deaggregationsprotokoll unter Trifluoressigsäure und

Hexafluoroisopropanol bei pH 3 unterworfen, um sie löslich zu erhalten. Ein zusätzlicher Nachteil von Polyglutaminpeptiden ist, im Unterschied zu dem hier etablierten System, dass Aggregation eine zehnfach höhere Proteinkonzentration erfordert und zehnfach längere Aggregationszeiten benötigt werden (Chen et al., 2001).

Der Vergleich der physikalischen Eigenschaften von den oben genannten Polyglutaminpeptiden und von Huntingtin Exon 1 zeigt signifikante Unterschiede. Ein Polyglutaminpeptid mit 20 Glutaminen ist im Vergleich zu Huntingtin Exon 1 mit einer Polyglutaminomäne von 20 Glutaminen saurer (theoretischer pI bei 5,52 im Vergleich zu 6,53) und hydrophiler (*grand average of hydropathicity (GRAVY)* -2.4 im Vergleich zu -1.5 (Kyte und Doolittle, 1982)). Man kann auch berechnen, dass Huntingtin Exon 1 mit einer Polyglutaminomäne von 20 Glutaminen im Vergleich zu einem Polyglutaminpeptid mit 20 Glutaminen *in vivo* um einen Faktor von zehn instabiler ist (Ciechanover et al., 1989). Dies sind die zusätzlichen Schwachpunkte der *in vitro* Systeme, die mit Polyglutaminpeptiden arbeiten. In Proteinaggregaten von HD-Patienten werden N-terminale Fragmente von Huntingtin gefunden, die signifikant größer sind, als die Polyglutaminomäne und auch deutlich mehr als 44 Glutamine in der Polyglutaminomäne haben können (MacDonald et al., 1996). Es ist aufgrund der signifikanten physikalischen Unterschiede wichtig ein System zu etablieren, in dem die Untersuchung der Aggregation des kompletten Huntingtin Exon 1 möglich ist.

Untersuchungen des Aggregationsmechanismus wurden mit GST-HD Exon 1 Fusionsproteinen durchgeführt (Scherzinger et al., 1997; Scherzinger et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass durch eine Fusion mit GST die Löslichkeit vieler Proteine erhöht ist. Auch die Expression sonst toxischer Peptide wird durch die GST-Fusion möglich (Smith und Johnson, 1988). Entsprechend wurde gefunden, dass selbst GST-Huntingtin Exon 1-Fusionsproteine mit Polyglutaminomänen im pathologischen Bereich, das heißt mit mehr als 37 Glutaminen unter nativen Bedingungen löslich sind (Scherzinger et al., 1997).

Im System von Scherzinger werden die Fusionsproteine mit Trypsin, Faktor Xa oder Elastase verdaut und aggregierte nach einer Inkubation von 16-18 h bei 37 °C. Die sequentielle Trennung von Proteolyse und Aggregation war nicht möglich (Scherzinger et al., 1997; Scherzinger et al., 1999).

Mit den bisherigen Systemen konnten keine direkten Aussagen zur Coaggregation von Proteinen mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen gemacht werden. In dem hier vorgestellten System wurde Huntingtin Exon 1 N-terminal mit verschiedenen Epitopen, dem FLAG- bzw. dem *myc*-Epitop fusioniert. Das FLAG- und das *myc*-Epitop können von etablierten, monoklonalen Antikörpern erkannt werden und machen eine immunologische Unterscheidung von Huntingtin Exon 1 mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen möglich. So wird eine Untersuchung der Fibrillogenese, der Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit unterschiedlichen langen Polyglutamindomänen und die Coaggregation anderer Proteine mit Polyglutamindomänen *in vitro* und *in vivo* möglich.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Scherzinger et al. (1999) wurde ein *in vitro* System etabliert, das es erlaubt zwei Serien von gereinigten Fusionsproteinen zu untersuchen. Dabei wurden die Huntingtin Exon 1 Proteine mit Polyglutamindomänen von 20 bis 53 Glutaminen jeweils N-terminal mit einem FLAG- bzw. mit einem *c-myc*-Epitop versehen (siehe Abbildung 3). Das FLAG- bzw. das *c-myc*-Epitop haben 7 bzw. 10 Aminosäuren und bilden besonders kleine Epitope. Alle Proteine konnten nativ gereinigt werden und es ist möglich sie bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 8,7 % Glycerin zu lagern, ohne dass sich Aggregate bilden (siehe Abbildung 8).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass bei den Fusionsproteinen GST spezifisch und quantitativ durch die *PreSission* $\hat{\text{O}}$ Protease abgespalten werden kann. Die proteolytischen Spaltprodukte entsprechen GST und dem kompletten Huntingtin Exon 1. Die *PreSission* $\hat{\text{O}}$ Protease wurde benutzt, da sie einen Verdau von GST-Huntingtin Exon 1-Fusionsproteinen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und damit ohne gleichzeitige Aggregation des Huntingtin Exon 1 Spaltproduktes möglich macht (siehe Abbildung 8). Die Aggregation kann anschließend durch Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ initiiert werden. Dieser sequentielle Ablauf von Verdau und Aggregation erlaubt eine direkte Untersuchung der Aggregationskinetik von Huntingtin Exon 1.

Mit dem hier etablierten System kann die Aggregation von HD Exon 1 Protein nicht nur unter nativen Bedingungen analysiert werden, sondern es kann auch bei geringen Konzentrationen und minimalen Zeitaufwand gearbeitet werden.

Die gereinigten GST-Fusionsproteine aggregierten nicht unter physiologischen Bedingungen und GST konnte spezifisch abgespalten werden, ohne dass Aggregate nachweisbar wurden (Abbildung 8). Erst nach der spezifischen Abspaltung von GST führte die Erwärmung auf 37 °C und Inkubation für 8h zur Bildung von SDS-unlöslichen Aggregaten aus Huntingtin Exon 1. Proteinaggregate werden nur dann gebildet, wenn die Polyglutamindomäne länger als 37 Glutamine ist. Huntingtin Exon 1 Proteine mit Polyglutamindomänen, die kürzer als 37 Glutamine waren, blieben immer löslich. Die Beobachtung, dass nur Proteine mit pathologischen Polyglutamindomänen aggregieren, wurde auch bei anderen untersuchten Polyglutaminpeptiden gemacht (Perutz et al., 1997; Chen et al., 2001; Scherzinger et al., 1997, Huang et al., 1998). Das Aggregationsverhalten des hier vorgestellten Systems stimmt mit den *in vivo* Beobachtungen in Chorea Huntington Patienten überein (Scherzinger et al., 1997). Die eingeführten Epitope, interferierten dabei nicht, sondern erlaubten die spezifische Detektion von Aggregaten mit den entsprechenden gegen diese Epitope gerichteten Antikörpern.

Die nach der Proteolyse gebildeten Proteinaggregate hatten hohe Molekulargewichte und fibrilläre Struktur (Scherzinger et al., 1997). Der erste Schritt der Aggregation ist nach einer Hypothese von Perutz (2002) eine Strukturänderung der Polyglutamindomäne mit mehr als 40 Glutaminen. Von einer zufälligen Konformation wandelt sie sich in eine β -Faltblattstruktur um. Diese Struktur dient als Keim für die Aggregation. Die Keime werden durch Wasserstoffbrücken stabilisiert (Perutz et al., 2002). Wenn die Polyglutamindomäne mehr als 40 Glutamine hat, wird die Bildung von höhermolekularen Strukturen durch einen Gewinn an Entropie stark begünstigt, da dabei Wassermoleküle freigesetzt werden (Perutz et al., 2002). Wenn sich einmal ein Keim gebildet hat und die kritische Proteinkonzentration überschritten ist, können sich Fibrillen, mit hohem Molekulargewicht bilden (Perutz et al., 2002).

Hier konnte gezeigt werden, dass auch mit Epitop fusionierte Huntingtin Exon 1 Proteine erst aggregieren, wenn die Polyglutamindomäne mehr als 37 Glutamine hat (Abbildung 10). Dieses entspricht dem pathologischen Schwellenwert von HD der zwischen 38-41 Polyglutaminen liegt. Es wurde bisher kein Fall von HD berichtet, der weniger als 38 Polyglutaminen hatte. Alle Patienten mit mehr als 41 Polyglutaminen bekamen HD-

Symptome (Rubinsztein et al., 1996). Diese Korrelation erscheint nicht zufällig und unterstützt die Theorie, dass die Krankheitsursache bei HD und den anderen Polyglutamin-Krankheiten durch die intrinsische Aggregationstendenz von Polyglutamindomänen mit mehr als 40 Glutaminen verursacht wird (Wanker, 2000).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Huntingtin Exon 1 mit Epitopen und mit einer Polyglutamindomäne von 50 Glutaminen zeigen amyloide fibrilläre Strukturen. Sie weisen keine strukturellen Unterschiede zu dem entsprechenden Huntingtin Exon 1 Protein ohne Epitop auf (Abbildung 9, Scherzinger et al., 1997). Huntingtin Exon 1 mit einer Polyglutamindomäne mit 20 Glutaminen mit und ohne Epitop aggregiert nicht und zeigt keine fibrilläre Strukturen (Abbildung 9, Scherzinger et al., 1997). Das deutet daraufhin, dass eine Überlänge vom mehr als 37 Glutaminen für die Bildung von fibrillären Strukturen entscheidend ist.

Weder die an die Polyglutamindomäne angrenzenden Aminosäuren von Huntingtin Exon 1 noch das N-terminale FLAG- bzw. *c-myc*-Epitop interferieren mit der Fibrillenbildung. Die Strukturen entsprechen auch denen, die man *in vivo* bei Mäusen und bei Patienten beobachtet hat (Scherzinger et al., 1997; Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997). Sie haben auch die gleichen Strukturmerkmale, die man bei Aggregaten aus Scrapie-Prionen (Pruisiner et al., 1998), bei α -Synuclein Fibrillen von Parkinson Patienten (Conway et al., 1998) und den β -Amyloid Fibrillen von Alzheimer Patienten (Caputo et al., 1992) beobachtet hat. Huntingtin-Aggregate zeigen nach Kongorotfärbung im polarisierten Licht grüne Birefringenz (Scherzinger et al., 1997; Davies et al., 1997; Huang et al., 1998). Sie werden deswegen als amyloide Fibrillen bezeichnet (Glenner et al., 1980).

Perutz et al. (2002) haben die Röntgenstruktur von amyloiden Fibrillen aus Huntingtin Exon 1, dem Hefeprionenprotein Sup35 und Polyglutaminpeptiden untersucht. Sie haben dabei festgestellt, dass diese Proteine vergleichbare Röntgenstrukturdiagramme bilden, die charakteristisch für Zylinder mit β -Faltblattstruktur sind.

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass Polyglutaminpeptide aggregieren, indem sie eine antiparallele β -Faltblattstruktur ausbilden, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hauptkette und den Seitenketten der Amide zusammengehalten werden (Abbildung 2). So können sich SDS-unlösliche amyloide Strukturen bilden. Die vorhergesagten Fibrillen aus Polyglutamindomänen bilden

möglicherweise α -helikale Fibrillen mit Durchmesser von 31 Å, wobei jede Windung aus 20 Glutaminen besteht. Dabei ist die Struktur mit 20 Glutaminen instabil, erst ab 40 und mehr Glutaminen kann sich die β -Faltblattstruktur über die Seitenketten der Glutamine durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren. Die Hypothese von Perutz, dass Polyglutamindomänen eigenständig Aggregate durch einen *polar zipper* Mechanismus bilden, wird durch die Ergebnisse in dieser Arbeit unterstützt.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aggregation von Huntingtin Exon 1 mit einer Polyglutamindomäne mit mehr als 39 Glutaminen ein keimabhängiger Polymerisationsprozess ist. Diese Kinetik wird auch bei der Bildung amyloider A β Fibrillen und α -Synuclein Fibrillen beobachtet (Harper et al., 1997; Wood et al., 1999). Vier Kriterien sind für eine keimabhängige Polymerisation wichtig: Eine kritische Konzentration muß überschritten werden, um zu einer Aggregation zu führen (1). Die kinetische Analyse zeigt bei der Aggregation einen sigmoiden Zeitverlauf mit einer lag-Periode, in der die Oligomerisierung der Monomere beginnt (2). Die lag-Periode ist abhängig von der Konzentration des löslichen Proteins (3) und kann durch Zugabe exogener Keime verkürzt werden (4). Die Aggregation der Huntingtin Exon 1 Proteine mit *myc*- bzw. FLAG-Epitopen und pathologischen Polyglutamindomänen erfüllt dabei alle der oben genannten Kriterien.

In dem hier etablierten System wurde für eine Aggregation von F-HD-Q 53 eine Inkubationszeit von 16 h und eine Proteinkonzentration von 50 μ g/ml benötigt. Wenn die Proteinkonzentration geringer ist, sind keine Aggregate nachweisbar (Abbildung 10). Die kritische Konzentration für F-HD-Q 53 in dem hier etablierten System liegt somit bei 50 μ g/ml. Die kritische Konzentration ist definiert als die Konzentration des Monomers, bei der die Polymerisation mit der Depolymerisation im Gleichgewicht steht. Während die lag-Phase der Keimbildung ein kinetischer Parameter ist, beschreibt die kritische Konzentration einen thermodynamischen Parameter der keimabhängigen Polymerisation (Timasheff et al., 1993; Harper et al., 1997).

Die Aggregation beginnt mit einer quasi stationären lag-Phase, von der angenommen wird, dass in dieser Zeit Aggregationskeime entstehen (Pruisiner et al., 1998). Wenn sich einmal ein Keim unter zunächst thermodynamisch ungünstigen Bedingungen gebildet hat, ist die Anlagerung von weiteren Monomeren thermodynamisch begünstigt, was zu

einer schnellen Polymerisation führt (Jarrett und Landsbury, 1993). Dieses Stadium ist in Abbildung 11 als exponentielle Phase erkennbar, in der eine Verlängerung der Fibrillen vonstatten geht. Der Aggregationsprozess endet in einer Sättigungsphase, auch *steady-state* genannt, bei der sich das System im Gleichgewicht befindet.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass die Länge der lag-Phase stark von der Konzentration der Huntingtin Exon 1 Proteine und der Länge der Polyglutamindomäne abhängig ist. Eine Verringerung der Proteinkonzentration von 400 µg/ml auf 50 µg/ml führte zu einer Verlängerung der lag-Phase auf über 16 h. Die Aggregation dauert länger, da die Geschwindigkeit der Keimbildung von der Proteinkonzentration abhängig ist (Jarrett et al., 1993).

Man kann diese *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Beobachtungen übertragen. Bei HD sterben Neuronen spezifisch im Striatum ab. Speziell im Striatum wird Huntingtin stark exprimiert und liegt in höheren Konzentrationen, als in anderen Geweben vor (Sharp et al., 1995; Trottier et al., 1995, Fusco et al., 1999). Auch in verschiedenen Zellkompartimenten können unterschiedliche Konzentrationen von Proteinen vorliegen. So kann es zu lokalen Konzentrationserhöhungen und damit zur Keimbildung kommen. Dies wäre ein Erklärungsansatz für die Spezifität der Neurodegeneration bei Chorea Huntington Patienten (Wanker et al., 2000). Nur dort wo hohe Konzentrationen von Huntingtin mit verlängerter Polyglutamindomäne vorliegen, wird die kritische Konzentration, die zur Keimbildung notwendig ist, überschritten.

Die Bildungsrate der Huntingtin Aggregate *in vitro* ist direkt mit der Polyglutamindomänenlänge korreliert (Abbildung 10). Je länger die Polyglutamindomäne ist, desto schneller erfolgt die Bildung der Aggregate. Auch bei diesen *in vitro* Ergebnissen sind Parallelen zu Beobachtungen bei Patienten zu sehen. Bei Patienten mit längeren Polyglutamindomänen erfolgt die Krankheitsmanifestation früher und auch die Schwere der Krankheit nimmt zu (HDCRG, 1993). Die meisten Patienten mit 41 bis 55 Polyglutaminen erkranken im Erwachsenenalter, während die Krankheit bei Patienten mit mehr als 70 Polyglutaminen bereits in der Jugend ausbricht. Die erhöhte Aggregationsbildungsrate bei Polyglutamindomänen mit mehr als 37 Glutaminen (Abbildung 10) legt den Schluß nahe, dass der frühere Ausbruch und das schnellere

Fortschreiten der Krankheit bei jugendlichen Chorea Huntington Patienten auf eine schnellere Aggregatbildung zurückzuführen ist.

Wie auch in den hier gezeigten *in vitro* Ergebnissen, ist die Aggregationsbildung bei Patienten abhängig von der Länge der Polyglutamindomäne. Gusella und Macdonald haben auch festgestellt (Gusella und MacDonald, 2000), dass bei allen acht neurodegenerativen Krankheiten, die durch eine Verlängerung der Polyglutamindomäne verursacht werden, der Beginn der Krankheit in umgekehrter Abhängigkeit zur Länge der Polyglutamindomäne ist. Ein molekulares *in vitro* Modell für HD muß dem späten Beginn der Krankheit, dem pathologischen Schwellenwert, sowie der inversen Korrelation zwischen Polyglutamindomänenlänge und Alter bei der Krankheitsmanifestation Rechnung tragen. Der pathologische Schwellenwert sollte dabei mit der Bildung von fibrillären Aggregaten übereinstimmen (Snell et al., 1993). Diese sollten eine ähnliche Struktur haben, wie die, die in Patientengehirnen gefunden wurden. Nur so kann man mit einem *in vitro* System sinnvoll die natürlichen Vorgänge widerspiegeln. Alle Aspekte werden von dem hier etablierten System erfüllt. Die Aggregation ist zeitabhängig, der pathologische Schwellenwert ist bei 39 Polyglutaminen, die gebildeten Strukturen sind Fibrillen und die Aggregation ist sowohl abhängig von der Länge der Polyglutamindomäne als auch von der Proteinkonzentration. Ein Aspekt einer keimabhängigen Polymerisation ist, dass die lag-Periode durch exogene Aggregationskeime verkürzt werden kann (Biere et al., 2000). In dem hier etablierten *in vitro* System wurden Keime zu einer Aggregation fähigen Lösung von Huntingtin Exon 1 Protein gegeben. Dies führte zu einer Verkürzung der lag-Phase und zu einer schnelleren Aggregation (Abbildung 12). Dadurch wurde bestätigt, dass die Fibrillenbildung von Huntingtin Exon 1 in dem hier etablierten *in vitro* System von der Bildung eines Aggregationskeimes abhängig ist.

Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der Aggregation von Huntingtin-Proteinen mit pathologischen Polyglutamindomänen alle Kriterien für eine keimabhängige Polymerisation erfüllt sind.

Die in dieser Arbeit enthaltenen Experimente können als Erklärungsmodell für den späten Beginn von HD und für den spezifischen Zelltod striataler Neuronen *in vivo* dienen. Man beobachtet *in vivo* sowohl eine Zunahme der Aggregate mit der Zeit, als auch ein

vermehrtes Absterben striataler Neuronen (Harper, 1991). Die Rolle der Aggregate aus N-terminalen Huntingtin Fragmenten wird bei HD kontrovers diskutiert. Zum Einen wurde in Zellkultur- und Mausmodellen das Absterben der Zellen auch ohne die Bildung von Aggregaten nachgewiesen (Skinner et al., 1997; Saudou et al., 1998; Kuemmerle et al., 1999; Carmichael et al., 2000). Zum Anderen werden Experimente gezeigt, die klarlegen, dass der Zelltod von Neuronen mit der Aggregatbildung korreliert ist (Waelter et al., 2001; Hackam et al., 1998; Cooper et al., 1998; Igarashi et al., 1998).

Clarke et al. (2000) untersuchten die Aggregatbildung in 12 Krankheiten mit verlängerten Polyglutamindomänen statistisch. Sie berechneten, dass die Wahrscheinlichkeit des Zelltodes von Neuronen bei Patienten mit HD mit der Lebenszeit konstant bleibt. Sie konnten auch keine erhöhte Wahrscheinlichkeit für den Zelltod der Neuronen in Abhängigkeit von der Zeit finden. Daraus schlossen sie, dass der Zelltod der Neuronen auf einem einzelnen, todbringenden Ereignis beruht, das spontan auftritt. Bei HD dauert es oft 40 bis 50 Jahre bis die ersten Symptome der Krankheit auftreten. Man kann also von einem einzelnen, spontanen Ereignis ausgehen, das statistisch den Krankheitsausbruch verursacht. Perutz et al. (2002) schlugen vor, dass die Bildung von Aggregationskeimen ein solches spontanes Ereignis sein könnte. Sie berechneten, dass die Bildung von Aggregationskeimen ein zufälliges, spontanes Ereignis ist, das stark von physikalischen Parametern wie Oberflächenenergie, molekularem Volumen, Temperatur und Sättigungsgrad der umgebenden Lösung abhängig ist. Die Aggregationskeime und damit die Aggregate würden somit spontan entstehen, wobei aber die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Keime von der Länge der Polyglutamindomäne abhängig ist. Auch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass die Keimbildung spontan ist und ihr eine rasche Aggregation folgt und dass sie abhängig von der Stärke der Expression des mutierten Huntingtins und von der Länge der Polyglutamindomäne des Proteins ist (Narain et al., 1999; Kazantsev et al., 1999; Kazantsev et al., 2002).

Es gibt auch *in vivo* Hinweise darauf, dass die Aggregation zu einer Beschädigung der Zellen, die sie enthalten führt. Transgene Mäuse mit induzierter Expression von Huntingtin zeigen zunächst nukleare Einschlüsse und dann Symptome, die rückgängig werden, wenn die Expression des N-terminalen Huntingtinfragmentes inhibiert wird (Yamamoto et al., 2000). Die Bildung von SDS-unlöslichen Aggregaten ist auch bei

Alzheimer, Parkinson und bei den Prionen Krankheiten mit den Symptomen korreliert. Ob aber die Toxizität durch eine Aggregation ausgelöst wird ist bis heute noch ungeklärt. Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Bildung von SDS-unlöslichen Proteinaggregaten bei der Pathogenese von Chorea Huntington eine wichtige Rolle spielen. Es müssen aber noch weitere Untersuchungen gemacht werden, um die Korrelation zwischen Aggregatbildung und Zelltod zu belegen.

Es wird angenommen, dass Huntingtin durch die Verlängerung der Polyglutamindomäne eine zusätzliche toxische Funktion bekommt, sei es durch veränderte Faltung oder durch neue Protein-Protein-Interaktionen, die zu einem Absterben der Neuronen führen (Gusella und MacDonald, 2000). Man spricht bei der Pathogenese von HD von einem *gain of function*-Mechanismus. Zuccato et al. (2001) zeigten, dass möglicherweise zusätzlich auch Verlust der Huntingtin (*loss of function*) zur Entstehung der Krankheit beiträgt. Viele dominante monogene Erkrankungen werden durch einen *gain of function* Mechanismus verursacht. Bei einem *loss of function* Mechanismus kann die nicht mutierte Kopie die Funktion, des mutierten Proteins meist teilweise ausgleichen (Rubinsztein, 2002). Für HD, als dominante Krankheit, ergibt sich deshalb die Frage, wie sich das mutierte und das nicht mutierte Huntingtin zueinander verhalten, da sie in den Zellen von Patienten als Mischung vorliegen. Das mutierte Huntingtin könnte die Funktion des nicht mutierten Proteins beeinträchtigen und somit zu einem *loss of function* führen. Das könnte zum Beispiel durch Coaggregation von mutiertem und nicht mutiertem Huntingtin verursacht werden. Mit dem hier vorgestellten System kann durch die Epitope *in vitro* der Einfluss von unterschiedlich langen Polyglutamindomänen auf die Huntingtin-Aggregation untersucht werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Huntingtin Exon 1 Protein mit normaler Polyglutamindomäne mit Huntingtin Exon 1 Protein mit pathologischer Polyglutamindomäne coaggregiert (Abbildung 15 und 16). Die gefundenen Aggregate sind selbst nach einer Denaturierung der Proben unlöslich und nachweisbar. Diese SDS-Unlöslichkeit ist ein Hinweis auf eine Integration von Huntingtin Exon 1 mit normaler Polyglutamindomäne in die Aggregate aus Huntingtin Exon 1 mit pathologischer Polyglutamindomäne. Die Bildung der Coaggregate ist dabei abhängig von der Länge der Polyglutamindomäne (Abbildung 15). Elektronenmikroskopisch wurde gezeigt, dass die

gemischten Aggregate aus Huntingtin Exon 1 mit normaler und pathologischer Polyglutamindomäne aus heterologen Fibrillen bestehen (Abbildung 16). Das deutet darauf hin, dass die Fibrillenbildung für die SDS-Unlöslichkeit der heterologen Huntingtin-Aggregate verantwortlich ist.

Diese *in vitro* Ergebnisse deuten darauf hin, dass Huntingtin Exon 1 mit mutierter Polyglutamindomäne aggregieren würde und so eine neue Funktion gewinnen würde (*gain of function*). Die Bildung von Huntingtin-Aggregaten in Patienten mit HD könnte möglicherweise zu einem *loss of function* des Huntingtin Proteins führen, da dieses Protein mit dem mutierten Protein coaggregiert. Durch die Coaggregation könnte Huntingtin mit normaler Polyglutamindomäne nicht mehr am Zellstoffwechsel teilnehmen. Der *gain of function* würde einen *loss of function* nach sich ziehen.

Man kann annehmen, dass die *in vitro* Ergebnisse, die unter physiologischen Bedingungen erhalten wurden, auch für N-terminale Fragmente von Huntingtin *in vivo* gelten. Normales Huntingtin Protein wird durch die Coaggregation mit pathologischem Huntingtin Protein für die Zellen unzugänglich und geht dem Zellstoffwechsel verloren. Die Diskussion über Verlust oder Gewinn der Funktion von Huntingtin bekommt dadurch einen neuen Aspekt und damit auch die Tatsache, dass HD eine autosomal dominante Krankheit ist.

In vivo ist gezeigt worden, dass nicht mutiertes Huntingtin die Apoptose verhindern kann (O'Kusky et al., 1999; Rigamonti et al., 2000; Dragatsis et al., 2000). Man kann somit spekulieren, dass nicht mutiertes Huntingtin durch die Integration in die Aggregate aus mutiertem Huntingtin im Zellstoffwechsel fehlt. Die Zellen leiten die Apoptose ein. Die zusätzliche Funktion, der *gain of function* ist also primär und verursacht den *loss of function*.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Huntingtin Exon 1 mit pathologischer Polyglutamindomäne Keime für die Aggregation von löslichem Huntingtin Exon 1 mit gleicher Länge der Polyglutamindomäne bilden kann (Abbildung 17). Außerdem wurde gezeigt, dass Huntingtin Exon 1 mit pathologischer Polyglutamindomäne auch Keime für die Aggregation von löslichem Huntingtin Exon 1 mit einer kürzeren Polyglutamindomäne bilden kann (Abbildung 17). Das zeigt, dass Aggregationskeime,

die aus dem pathologischen Huntingtin Protein bestehen auch die Aggregation des normalen Proteins stimulieren können.

Bei Hefe-Prionen wurde festgestellt, dass ein keimabhängiger Polymerisationsprozess abhängig von der Konformation der Keime ist. Dies zeigen Chien und Weissmann *in vitro* aber auch *in vivo* anhand von Proteinchimeren (Chen et al., 2001). *In vitro* entstehen aus reinem Protein ohne kovalente Modifikationen oder Kontaminationen in Gegenwart von unterschiedlichen Keimen Fibrillen mit unterschiedlichen Strukturen. Die Fibrillen haben die gleiche Struktur wie die jeweiligen Keime und pflanzen sich entsprechend fort. Damit ist eine Verbindung zwischen Prionen Konformationen und der Spezifität der Keime etabliert. Dieser neue Aspekt der Abhängigkeit der Aggregate von der Konformation der Keime bei der keimabhängigen Polymerisation wird hier das erste Mal bei HD untersucht.

Wenn Aggregate aus Huntingtin Exon 1 mit pathologischer Polyglutamindomäne Keime für die Polymerisation von löslichem Huntingtin Exon 1 mit kürzerer Polyglutamindomäne bilden können, kann man signifikante Strukturunterschiede und Konformationsunterschiede an den Stellen der Verlängerung der heterologen Huntingtin Exon 1 Fibrillen oder an den Enden der wachsenden Spitze von den Fibrillen ausschließen (Wood et al., 1999). Das ist von besonderem Interesse, da in 3.3.3. elektronenmikroskopisch gezeigt wird, dass F-HD-Q 20 und 53 verschiedene Strukturen ausbilden.

Huntingtin Exon 1 mit einer pathologischen Polyglutamindomäne bildet schneller Keime und aggregiert auch rascher als Huntingtin Exon 1 mit normaler Polyglutamindomäne. Es ist anzunehmen, dass durch Keime aus Huntingtin Exon 1 mit pathologischen Polyglutamindomänen die lag-Phase der Aggregation des normalen Huntingtin Exon 1 signifikant reduziert wird. Somit könnten Huntingtin-Fragmente mit pathologischen Polyglutamindomänen zu einer Beschleunigung der Aggregation des normalen Huntingtins in der Zelle führen. Ausgehend von unseren Ergebnissen vermuten wir, dass die Fibrillen in den Aggregaten der HD Patienten Huntingtin mit normaler und pathologischer Polyglutamindomäne enthalten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Huntingtin-Aggregation von der Konzentration der Keime abhängig ist. Je größer die Konzentration der Keime ist, desto

schneller findet Aggregation statt. In den verschiedenen Kompartimenten der Zellen liegen Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Es erscheint möglich, dass Huntingtin-Fragmente einer zeitweisen Übersättigung in den Zellkompartimenten von neuronalen Zellen vorliegen. Diese wäre an sich nicht pathologisch, da gesunde Menschen mit Huntingtin mit normaler Polyglutamindomäne durch die lange lag-Phase vor einer Keimbildung geschützt sind. Wenn jedoch in den Zellen Huntingtin mit pathologischer Polyglutamindomäne exprimiert wird, könnte die lag-Phase verkürzt werden. Dies würde zu einer größeren Anzahl von Aggregationskeimen führen, die das Wachstum von Fibrillen und großen Aggregate verursachen. In diesem Fall wäre die Keimbildung die Ursache der Krankheit und die Verhinderung der Keimbildung wäre von großem therapeutischen Interesse.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aggregation von der Länge der Polyglutamindomäne abhängig ist. Je länger die Polyglutamindomäne ist, desto schneller aggregiert Huntingtin Exon 1 (Abbildung 17). Man kann spekulieren, dass durch die Verlängerung der Polyglutamindomäne die Aktivierungsenergie für eine Konformationsumwandlung und die Bildung von β -Faltblättern verringert wird (Perutz et al., 2002). Diese Konformationsänderung könnte der limitierende Schritt für die Bildung von Aggregationskeimen sein.

Es wäre interessant die frühen Stadien der Keimbildung zu studieren, genauso wie die Größe der Aggregationskeime. Scherzinger et al. (1997) konnten zeigen, dass HD Exon 1 Proteine mit 53 Glutaminen unter denaturierenden Bedingungen Dimere bilden. Es wurde postuliert, dass diese die Aggregationskeime für die hochmolekularen Aggregate bilden. In dem hier gezeigten System konnten keine Oligomere im SDS-Gel und im nativem Gel nachgewiesen werden. Es sind aber noch andere Untersuchungen notwendig, um die Bildung von oligomeren Strukturen im Detail zu untersuchen.

Vergleichbar verhält sich auch α -Synuclein bei der Parkinson Krankheit. Bei einer familiären Form der Parkinson Krankheit sind auch fibrilläre Aggregate nachgewiesen worden, die durch die Mutation A53T in α -Synuclein hervorgerufen werden. Keime aus A53T α -Synuclein können mit *wild-type* α -Synuclein Aggregate bilden, ein Phänomen, welches als *cross-seeding* bezeichnet wird. Es wird postuliert, dass die Keime A53T mit *wild-type* α -Synuclein zu Fibrillen verlängert werden. Wood et al. (1999) postulieren

daher, dass dies signifikante Unterschiede an den Stellen der Verlängerung A53T α -Synuclein Keime ausschließt.

Zusätzlich zu *in vitro* Untersuchungen ist eine Analyse *in vivo* nötig, um zu sehen, ob die beobachtete Coaggregation von Huntingtin Exon 1 mit verschiedenen langen Polyglutamindomänen auch in der zellulären Umgebung eine Rolle spielt. Eine Coaggregation von endogenem löslichen Huntingtin mit normaler Polyglutamindomäne in Aggregate aus N-terminalen Huntingtin-Fragmenten wurde von Martindale et al. (1998) in der Immunofluoreszenz beobachtet. Rajan et al. (2001) zeigen mit FRET-Analysen in einem Zellkultursystem, dass Polyglutaminpeptide mit 25 Glutaminen mit GFP-Epitop in Aggregate aus Polyglutamindomänen mit 103 Glutaminen mit GFP-Epitop coaggregieren.

In dieser Arbeit wurde ein *in vivo* System etabliert, indem COS 1 Zellen transient mit verschiedenen Plasmidkonstrukten cotransfiziert, die für Huntingtin Exon 1 mit verschiedenen langen Polyglutamindomänen kodieren. Diese waren, parallel zu dem *in vitro* System, entweder durch das HA-Epitop oder dem GFP-Epitop spezifisch zu unterscheiden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Proteine gut exprimierten und mit Epitop immunologisch nachgewiesen werden konnten (Abbildung 18, 19). In der Immunofluoreszenzmikroskopie zeigten die Huntingtin Exon 1 Proteine mit weniger als 37 Polyglutaminen eine homogene cytoplasmatische Färbung. Nur Huntingtin Exon 1 Protein mit pathologischer Polyglutamindomäne (von 72 Glutaminen) bildete sichtbare Aggregate, die auch im Filtrationsassay nachweisbar sind (Abbildung 20). Im Filtrationsassay lassen sich keine Aggregate mit 17, 20 oder 32 Polyglutaminen nachweisen (Abbildung 20). Im Unterschied zu F-HD-Q 37 bzw. M-HD-Q 37 *in vitro* aggregiert HA-HD-Q 37 *in vivo*, trotz gleicher Länge der Polyglutamindomäne (Abbildung 15, 20). Das kann auf die lokalen Konzentrationsschwankungen in der Zelle zurückzuführen sein, aber auch auf die zelluläre Umgebung, wie zum Beispiel das Vorhandensein des Proteasom/Ubiquitin Systems (Waelter et al., 2001; Kopito et al., 2000).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Huntingtin-Exon 1 mit pathologischer und normaler Polyglutamindomäne coaggregieren und gemeinsame SDS-unlösliche Strukturen bilden. Man könnte postulieren, dass auch *in vivo* N-terminale Huntingtin Fragmente mit pathologischer Polyglutamindomäne Aggregate bilden und dabei N-terminale Fragmente von Huntingtin mit normaler Polyglutamindomäne in gemeinsamen Aggregaten coaggregieren. Dieses fügt sich in *in vitro* Ergebnisse ein und kann als ein weiterer Hinweis auf einen *gain of function* Mechanismus bei von HD gewertet werden.

In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von Huntingtin Proteinen mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen in COS1 Zellen mit Immunofluoreszenzmikroskopie untersucht. Sowohl Huntingtin mit normaler Polyglutamindomäne als auch Huntingtin mit pathologischer Polyglutamindomäne lokalisieren, wenn sie löslich sind, im Cytoplasma. Nur Huntingtin mit pathologischer Polyglutamindomäne formt zusätzlich nukleare und cytoplasmatische Aggregate (Abbildung 20).

In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde eine Colokalisation von Huntingtin Exon 1 mit normalen und pathologischen Polyglutamindomänen in perinukleare Einschlüsse durch Immunofluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass Einschlusskörper durch die Expression eines Huntingtin Exon 1 Proteins mit pathologischer Polyglutamindomäne induziert werden (GFP-HD-Q 72, HA-HD-Q 37, Abbildung 19). Huntingtin Exon 1 mit normalen Polyglutamindomänen aggregieren nicht und sind im Cytoplasma homogen verteilt (Abbildung 19). Außerdem wird in der Literatur berichtet, dass nicht mutierte Huntingtin-Fragmente in Präparaten aus transgenen Mäusegehirnen und aus Patientengehirnen auch im Cytoplasma lokalisieren und dass Huntingtin-Fragmente mit pathologischer Polyglutamindomäne in intranuklearen, perinuklearen und cytoplasmatischen Aggregaten zu finden sind (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997). Kim et al. (1999) zeigen, dass nukleare Huntingtin-Aggregate zumeist aus N-terminalen Fragmenten bestehen, während sich in den cytoplasmatischen Aggregaten sowohl intaktes Huntingtin als auch dessen N-terminale Fragmente nachweisen lassen. Auch wurde gezeigt, dass kurze N-terminale Fragmente von Huntingtin mit höherer Wahrscheinlichkeit im Zellkern vorhanden sind (Martindale et al., 1998). Diese Beobachtungen entsprechen denen aus den *in vitro* Ergebnissen. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass Huntingtin Exon 1 mit

normaler Polyglutamindomäne in perinukleare Aggregate aus Huntingtin Exon 1 mit pathologischer Polyglutamindomäne coaggregieren.

Es wurde gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren die eine überlange Polyglutamindomäne enthalten coaggregieren (Holbert et al., 2001; Kegel et al., 2002; Steffan et al., 2000; Bouttell et al., 1999; Jones et al., 1999). Es wird angenommen, dass durch Coaggregation mit z.B. intranuklearen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten mit Transkriptionsfaktoren die Genexpression verändert wird (Nucifora et al., 2001; Steffan et al., 2000; Li et al., 1998; Luthi-Carter et al., 2000; Cha et al., 1998). Die Coaggregation von CBP (Steffan et al., 2000) als auch von TBP mutierten mit Huntingtin-Protein ist *in vivo* nachgewiesen (Huang et al., 1998; Nucifora et al., 2000; Perez et al., 1998; Steffan et al., 2000). In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse mit TBP bestätigt. Außerdem wurde festgestellt, dass die Proteine NOCT3 und PQBP1 mit Huntingtin Exon1 Proteinen *in vitro* und *in vivo* coaggregieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass F-TBP, F-NOCT3 und F-PQBP1 *in vitro* nicht in die SDS-unlöslichen Aggregate aus M-HD-Q 52 coaggregieren (Abbildung 24). Nur F-HD-Q 20 Proteine bilden mit M-HD-Q 52 SDS-unlösliche Coaggregate. Alleine das Vorhandensein von Polyglutamindomänen mit mehr als 37 Glutaminen bewirkt also keine Coaggregation mit Huntingtin Exon 1.

Dieses Ergebnis zeigt auch, dass nicht nur eine pathologische Polyglutamindomäne für die Bildung von SDS-unlöslichen Aggregaten notwendig ist, sondern auch N- und C-terminal angrenzende Aminosäuresequenzen. Das F-TBP hat eine Polyglutamindomäne von 38 Glutaminen und bildet keine Coaggregate mit M-HD-Q 52. F-HD-Q 20 dagegen coaggregiert mit M-HD-Q 52. Es ist anzunehmen, dass sich die Polyglutamindomänen und / oder die angrenzenden Sequenzen von F-TBP und F-NOCT3 von Huntingtin Exon 1 strukturell so stark unterscheiden, dass sie nicht Coaggregate mit M-HD-Q 52 bilden können. Sie könnten aber auch so gefaltet sein, dass eine Bildung von β -Faltblattstrukturen nicht möglich ist, da die Polyglutamindomäne nicht zugänglich ist.

Auch F-PQBP1 bildet keine Coaggregate mit M-HD-Q 52. Das deutet darauf hin, dass auch eine Bindung an eine Polyglutamindomäne nicht zu Coaggregaten führt. Eine Interaktion, die zu Coaggregation *in vitro* führt, kann also ausgeschlossen werden. Die

Wichtigkeit der benachbarten Aminosäuren bei der Aggregation wurde unter anderem auch durch *in vitro* Versuche mit synthetischen Peptiden von Nozaki (Nozaki et al., 2001) gezeigt. Sie zeigen, daß die Aggregation durch angrenzenden Aminosäuren der Polyglutamindomäne beeinflusst wird. Je hydrophiler die angrenzenden Aminosäuren sind, desto schwächer aggregiert das Polyglutaminpeptid.

Die *in vitro* Ergebnisse konnten *in vivo*, in Säugetierzellen bestätigt werden. Die Proteine HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 wurden mit HA-Epitop in Zellkultur exprimiert und konnten im Western Blot spezifisch nachgewiesen werden (Abbildung 24). In der zellulären Umgebung ließen sich HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 nicht in SDS-unlöslichen Aggregaten mit GFP-HD-Q 72 nachweisen (Abbildung 25). Sie bildeten im Unterschied zu HA-HD-Q 20 und 32 keine Coaggregate mit GFP-HD-Q 72 (Abbildung 20).

Auch in der Zelle scheinen sich die Polyglutamindomänen von HA-TBP und HA-NOCT3 von Huntingtin Exon 1 so zu unterscheiden, dass sie nicht in die SDS-unlöslichen Aggregate integriert werden können. Es kann allerdings auch sein, dass durch die Interaktion mit anderen Proteinen eine Bildung von β -Faltblattstrukturen verhindert ist, da die Polyglutamindomäne von TBP und NOCT3 innerhalb des Proteins verdeckt wird. Ein zusätzlicher Aspekt ist die Bildung von SDS-unlöslichen Aggregaten durch Transglutaminasen. Diese verbinden Polyglutamindomänen durch Isopeptidverbindungen kovalent mit Lysinen (Green, 1993). Die hier gezeigten Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass selbst in Säugetierzellen, also in Anwesenheit von Transglutaminasen, die untersuchten Proteine mit GFP-HD-Q 72 keine SDS-unlöslichen Aggregate durch kovalente Vernetzung bilden. Dabei verfügen sowohl HA-TBP, als auch HA-NOCT3 und HA-PQBP1 über Lysine, die für eine Bildung von Isopeptiden benötigt werden. Die Bildung von Aggregaten durch Transglutaminasen wie sie Green (1993) vorschlägt, müßte noch experimentell untersucht werden.

In Hefe wurde die Aggregation des Prionprotein Sup 35 untersucht (Chen und Weissmann, 2001). Insbesondere wurde analysiert, wie sich Aggregate aus den Sup35 Proteinen unterschiedlicher Hefestämme bilden. Chen und Weissmann (2001) zeigen in ihren Experimenten mit Proteinchimären, dass Aggregationskeime einer Art nur Aggregate der selben Art bilden können. Man könnte annehmen, dass ähnliche

strukturelle Unterschiede bei Huntingtin, TBP, NOCT3 und PQBP1 vorliegen. Huntingtin mit pathologischer Polyglutamindomäne könnte mit Huntingtin mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen SDS-unlösliche Aggregate bilden, nicht aber mit TBP, NOCT3 und PQBP1.

Die Lokalisation von TBP, NOCT3 und PQBP1 *in vivo* in Anwesenheit von Huntingtin Exon 1 war überraschend. Alle untersuchten Proteine waren in Abwesenheit von Huntingtin Exon 1 im Kern lokalisiert. Wenn sie allerdings mit Huntingtin Exon 1 mit normaler Polyglutamindomäne coexprimiert wurden, zeigten sie eine diffuse cytoplasmatische Lokalisation. Nach der Coexpression der Proteine mit Huntingtin Exon 1 mit pathologischer Polyglutamindomäne wurden sie jedoch in den perinuklearen Einschlußkörpern nachgewiesen. Diese Untersuchungen zeigen, dass HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 *in vivo* mit Huntingtin-Protein colokalisieren. Sie coaggregieren aber nicht in die SDS-unlöslichen Fibrillen. Kazantsev et al. (1999) haben gezeigt, dass durch die Aggregation von TBP ein Polyglutaminpeptid mit 104 Glutaminen im Cytosol relokalisiert. Sie schließen daraus, dass die Lokalisation der Aggregate nicht von den Polyglutamindomänen, sondern von den flankierenden Aminosäuren abhängt (Kazantsev et al., 1999). Auch Hackman et al. (1999) postulieren, dass durch eine neue, nukleare Lokalisation Huntingtin aggregiert.

Verschiedene Modelle wurden vorgeschlagen, um die Bildung von Polyglutamindomänenhaltigen Aggregaten *in vitro* und *in vivo* zu erklären. Perutz et al. (1994) postulieren, dass Polyglutamine β -Faltblätter bilden und sich über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren. Es könnten sich sogenannte polare Reißverschlüsse (*polar zipper*) bilden, die spezifische Transkriptionsfaktoren binden. Die Verlängerung der Polyglutamindomäne im Huntingtin Protein könnte die Affinität für Transkriptionsfaktoren erhöhen und dadurch zu einer langsamen Coprezipitation der betroffenen Proteine in Neuronen führen. In einem anderen Modell werden Proteine mit langen Polyglutamindomänen durch eine Transglutaminase mit anderen Proteinen verbunden (Burke et al., 1996; Pawson et al. 1992). Green (1993) postuliert, dass Huntingtin mit verlängerter Polyglutamindomäne ein besonders gutes Substrat für Transglutaminasen sein könnte. Polyglutamindomänen werden dabei kovalent mit Lysin verbunden. Diese Ergebnisse wurden *in vitro* und neuerdings auch *in vivo*

bestätigt (Kahlem et al., 1996; Jeitner et al. 2001). Ein weiteres Modell schlägt vor, dass über Protein-Protein-Interaktionen von Huntingtin mit anderen zellulären Proteinen, wie zum Beispiel HIP1 oder SH3GL3, die Aggregation beeinflusst wird. Durch die verlängerte Polyglutamindomäne verändert sich die Faltung von Huntingtin. Dadurch wird die Affinität der Proteine zueinander und damit deren Interaktion verändert (Wanker et al., 1997; Sittler et al., 1998). In noch einem weiteren Modell wird postuliert, dass bereits eine Relokalisation eines Proteins mit Polyglutamindomäne vom Cytosol in den Kern ausreicht, um zu einer Aggregation zu führen (Hackam et al., 1998; Cooper et al., 1998).

Das hier vorgestellte *in vitro* und *in vivo* System erlaubt es, die Coaggregation von Transkriptionsfaktoren mit Huntingtin Exon 1 im Detail zu untersuchen und die verschiedenen Modelle zu überprüfen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Coaggregation von polyglutaminhaltigen Proteinen in die SDS-unlöslichen Aggregate aufgrund des *polar zipper*-Mechanismus erfolgt. Eine Beteiligung von Transglutaminasen erscheint unwahrscheinlich. Offensichtlich spielen bei diesem Vorgang die strukturellen Eigenschaften der Proteine eine wichtige Rolle. Das Modell, in dem postuliert wird, dass sich durch eine verlängerte Polyglutamindomäne Protein-Protein-Interaktionen verändern, bleibt noch durch Bindungsstudien zu überprüfen. Dieses Modell erklärt nicht die SDS-Unlöslichkeit der gemischten Huntingtin-Aggregate, die *in vitro* zu beobachten ist. Im einem weiteren Modell wird postuliert, dass Lokalisation und Coaggregation zusammenhängen. In einer Studie wird der Einfluß von einer NLS (*nuclear leading sequence*) auf die Aggregation von Huntingtin-Proteinen untersucht und eine Verstärkung der Aggregation durch die NLS gezeigt. Es wird in der Literatur auch gezeigt, dass die aktive Form von MEKK1, eine Proteinkinase, die an mehreren Signalkaskaden beteiligt ist, mit Huntingtin-Aggregaten colokalisiert (Meriin et al., 2001). Der genaue Mechanismus der Aggregationsstimulation die in dieser Arbeit beobachtet wurde muß aber noch genauer untersucht werden.

Die Ergebnisse in Abbildung 27 zeigen, dass PQBP1 und NOCT3 nicht nur in Zellkultur, sondern auch in Mäusegehirnen mit Huntingtin-Aggregaten colokalisieren. Das zeigt, dass die Ergebnisse der Zellkultur nicht nur aufgrund von Artefakten entstanden sind. Es

gibt mehrere Möglichkeiten, wie diese beiden Proteine in die Aggregate aus Huntingtin hineingezogen werden. Dies geschieht entweder direkt über eine Bindung an Huntingtin oder indirekt, indem NOCT3 und PQBP1 über andere Proteine an Huntingtin-Aggregate binden. Die direkte Bindung der Proteine an Huntingtin ist noch mit *in vitro* Bindungsstudien nachzuweisen. Mit dem *Two-Hybrid-System* wurde keine Bindung von NOCT3 und PQBP1 an Huntingtin Exon 1 detektiert. Die Coaggregation von NOCT3 mit Huntingtin in striatalen Neuronen könnte die Konzentration von löslichen NOCT3 in der Zelle verringern. Es ist möglich, dass die Funktion von NOCT3 im Gehirn von anderen POU-spezifischen Transkriptionsfaktoren übernommen werden kann, eine Verringerung der Konzentration könnte aber dennoch für die Zellen toxisch sein. Die Aggregation und das Absterben der Neuronen ist ein sehr langsamer Prozeß. Deshalb könnte eine Verringerung der Konzentration von NOCT3, selbst wenn sie gering sind, diese Prozesse beeinflussen. Unsere Untersuchungen könnten helfen zu etablieren warum besonders striatale Neuronen bei HD absterben (HDRG, 1993)

Das PQBP1 mit Huntingtin Exon 1 coaggregiert ist äußerst interessant. PQBP1 beeinflusst die Transkription der gleichen Gene, die auch von NOCT3 reguliert werden. Die Coaggregation mit Huntingtin könnte zu einer veränderten Transkription führen, und so die Effekte des fehlenden NOCT3 verstärken. Bindungsstudien müßten durchgeführt werden um zu klären, ob und an welche Domäne von Huntingtin-Exon 1 PQBP1 bindet. Nach Komuro et al. (1999) könnte PQBP1 auch an die Polyprolindomäne von Huntingtin binden. Weitere Untersuchungen sind aber notwendig, um diese Hypothese zu überprüfen. Mit Bindungsstudien könnte man außerdem feststellen, ob NOCT3 über PQBP1 oder PQBP1 über NOCT3 an die Aggregate aus Huntingtin Exon 1 bindet, oder ob die beiden Proteine jeweils direkt an Huntingtin binden.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Zellproteine NOCT3 und PQBP1 mit Huntingtin coaggregieren und somit möglicherweise für die Zellhomöostase verloren gehen.