

6. Zusammenfassung

Chorea Huntington (HD) ist eine progressiv verlaufende, autosomal dominant vererbte neurodegenerative Krankheit. Sie wird durch eine überlange Polyglutamindomäne im N-Terminus des Huntingtin-Proteins verursacht. Sowohl der Krankheitsmechanismus als auch die Funktion von Huntingtin sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde gezeigt, dass Huntingtin Exon 1 Proteine mit pathologischen Polyglutamindomänen (>37 Glutaminen) *in vitro* unlösliche Proteinaggregate mit fibrillärer Struktur bilden. Außerdem wurden Einschlusskörper mit aggregiertem Huntingtin-Protein in Gehirnen von transgenen Mäusen und von HD Patienten nachgewiesen. Dies führte zur Hypothese, dass die Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten bei der Entstehung der Krankheit eine wichtige Rolle spielen könnte.

In dieser Arbeit wurde die Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit anderen polyglutaminhaltigen Proteinen im Detail untersucht. Mittels Affinitätschromatographie wurden mit myc- bzw. FLAG-Sequenzen markierte GST-Huntingtin Exon 1-Fusionsproteine mit Polyglutamindomänen im normalen (20-32 Glutaminen) und pathologischen Bereich (37-54 Glutaminen) gereinigt. Diese Proteine können auf Grund der Epitopmarkierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Nach der proteolytischen Abspaltung des GST-Anteils bildeten die freigesetzten Huntingtin Exon 1-Proteine mit überlangen Polyglutamindomänen unlösliche Proteinaggregate, während die Proteine mit einer Polyglutamindomäne im normalen Bereich nicht aggregierten. Huntingtin-Aggregate wurden durch einen keimabhängigen Prozess gebildet und haben eine fibrilläre Struktur. Die Fibrillogenese folgt dabei einer Kinetik erster Ordnung. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass immunogold markierte Huntingtin Exon 1-Proteine mit unterschiedlich langen Polyglutaminsequenzen *in vitro* koaggregieren. In Gegensatz dazu bildeten die polyglutaminhaltigen Proteine TBP (TATA-binding protein) und NOCT3 (nerval octamer binding factor 3) mit den Huntingtin-Proteinen keine SDS-resistenten Coaggregate. Das deutet darauf hin, dass die Bildung von polyglutaminhaltigen Proteinaggregaten ein hoch spezifischer Prozess ist.

Die Ergebnisse *in vitro* wurden mit HD Zellkulturmodellsystemen bestätigt. In Säugetierzellen wurde eine Colokalisation von Huntingtin mit den Proteinen TBP, NOCT3 und PQBP1 (polyglutamine binding protein 1) nachgewiesen. Diese Proteine

bildeten mit Huntingtin jedoch keine SDS-stabilen Coaggregate. Eine Colokalisation von mutiertem Huntingtin und den Proteinen NOCT3 und PQBP1 wurde auch in den Nervenzellen von HD transgenen Mäusen detektiert, was darauf hindeutet, dass eine Rekrutierung von Proteinen in polyglutaminhaltige Proteinaggregate eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Krankheit spielt.

7. Abstract

Huntington's disease (HD) is a progressive inherited neurodegenerative disorder caused by an elongated polyglutamine (polyQ) repeat located at the N-terminus of the huntingtin protein. The pathomechanism of HD as well as the normal function of huntingtin are unknown. Huntingtin exon 1 proteins with a polyQ stretch in the pathological range (>37 glutamines) form protein aggregates *in vitro*. Accumulated insoluble polyQ-containing protein aggregates have been found in intra- and perinuclear inclusions of HD transgenic mice and HD patients, suggesting that this disease is caused by high molecular weight protein aggregates.

In this work it is examined whether N-terminal huntingtin exon 1 proteins co-aggregate with other polyQ-containing proteins. Using affinity chromatography, myc- and FLAG-tagged GST-huntingtin exon 1 fusion proteins with polyQ sequences in the normal (20-32 glutamines) and pathological (37-54 glutamines) range were purified. These proteins can be detected with specific antibodies directed against the respective epitope tags. Proteolysis of GST-HD exon 1 fusion proteins with polyQ stretches in the pathological range, but not with polyQ stretches in the normal range resulted in the formation of SDS-insoluble protein aggregates. These aggregates assembled in a nucleation-dependent process and fibrillogenesis followed a first order kinetic. The structures formed exhibited a characteristic fibrillar morphology. Analysis by electron microscopy with immunogold labeling revealed that huntingtin exon 1 proteins with polyQ sequences in the pathological range coaggregate with huntingtin exon 1 proteins containing polyQ repeats in the normal range and form fibrillar structures. In strong contrast, polyQ-containing proteins such as the TATA binding protein (TBP) or the neural octamer binding factor (NOCT3) did not form fibrils with mutant huntingtin exon1 proteins. This indicates that the assembly of fibrillar polyQ-containing structures is a highly specific process.

The results obtained *in vitro* were confirmed using cell culture model systems of HD. In mammalian cells co-localization of huntingtin exon 1 proteins with TBP, NOCT3 and the polyQ-binding protein 1 (PQBP1) was observed. However, these proteins did not co-aggregate with huntingtin into SDS-stable fibrillar structures. Co-localization of mutant

huntingtin exon 1 proteins with NOCT3 and PQBP1 was also observed in neuronal cells of HD transgenic mice, suggesting that depletion of soluble proteins by polyQ-containing protein aggregates may contribute to the pathogenesis in HD.

8. Veröffentlichungen und Präsentationen

Vorstellung der Ergebnisse auf dem Meeting der Huntington's Disease Society of America (HDSA), April 2002. Titel des Vortrags: „Mutant Huntingtin stimulates the fibrillogenesis of *wild-type* Huntingtin“

Veröffentlichung mit dem Titel „Mutant Huntingtin stimulates the fibrillogenesis of *wild-type* Huntingtin and the coaggregation of polyglutamine containing proteins“ in Vorbereitung

9. Abkürzungen

Ω	Ohm
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Bidest.	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CBP	CREB-binding Protein
Cresolrot	m- Cresolsulfonphthalein
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DRLPA	Dentaturubrale Pallidolysische Atrophie
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
GST	Glutathion S- Transferase
HD	Chorea Huntington
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β - D- thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
MEM	Minimum Essential Medium

MES	2- (N- Morpholino)ethansulfonsäure
mF	Millifarad
MJD	Machado- Joseph Krankheit
MOPS	3- (N- Morpholino)- 2- hydroxypropansulfonsäure
OD	optische Dichte
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCA	Spinocerebrale Ataxie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMBA	Spinobulbar Muskuläre Ataxie (Kennedy Krankheit)
TBP	TATA- Binding- Protein
Tc	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Triton X- 100	p- t- Octylphenyl- polyoxyethylen
TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitan- Monolaureat
<i>wt</i>	Wildtyp

10. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Lehrach bedanken für seine Betreuung und für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Doktorarbeit in seiner Abteilung. Herrn Prof. Dr. Hucho danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wanker für die Themenstellung, Betreuung und anregenden Diskussionen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wanker für die vielen methodischen Ratschläge und Hilfestellung bei der Durchführung von Experimenten:

Besonders den Mitgliedern „meines“ Labors 108: Eberhard Scherzinger, Renate Hasenbank, Stephanie Wälter, Annie Sittler, Anja Dröge, Ilona Dunkel und Christina; dem Labor 109 mit Annett Böddrich und Nancy Schugart; dem „Hefelabor“ 115 für's ständige Asyl, Schnorren und Diskussion, dem Labor 139 mit der AG OFP, besonders hier Barbora, Jana und Mehdi.

Besonderer Dank an Stephanie Wälter, Heike Göhler und Anja Dröge ohne deren Ermunterungen, Unterstützung und Freundschaft diese Doktorarbeit bestimmt in dieser Form nicht existieren würde. Besonderen Dank an Anja fürs geduldige und ausgiebige Korrekturlesen und Stephanie für Teile aus Materialien und Methoden.

Bei Rudi Lurz bedanke ich mich für die geduldigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Dank auch an alle nicht namentlich genannten Mitglieder der Arbeitsgruppe und des MPIs für die gute Zusammenarbeit und die gute Arbeitsatmosphäre

An dieser Stelle möchte ich mich bei Georg Pohnert, meiner Familie und bei meinen Freunden für ihre stete Unterstützung bedanken. Besonderer Dank an Georg fürs geduldige und ausgiebige Korrekturlesen.

11. Lebenslauf

Name	Anne Busch
geboren am	5.11.1973 in Krefeld
Schulbildung:	
1980-1984	Grundschule an der Eichendorffstrasse, Krefeld
1984-1993	Arndt-Gymnasium Krefeld
Studium:	
1993-1998	Studium der Biologie an der Universität Konstanz
1994	Vordiplom
1997	Diplom
1997-1998	Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. Dr. Wilfried Boos und Prof. Dr. Peter Maloney an der Johns-Hopkins-Medical School, Baltimore, USA Titel der Arbeit: Purification and Characterisation of GlpT, an membrane transporter
1999-2002	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

12. Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht.

Jena, 1.7.2002

Anne Busch

Erratum:

Abbildung 8, 10, 15, 23: Es wurden ng/ml und nicht µg/ml eingesetzt und auch ng statt µg aufgetragen.

Abbildung 27: Colokalisierungen von NOCT3 und PQBP1 mit neuronalen Einschlußkörpern in Gehirnen von Mäusen wurde von Donna Smith gemacht. Sie ist Mitglied der Gruppe von Gillian Bates, London. Bei ihnen möchte ich mich sehr bedanken.