

2. Untersuchung der Aggregatbildung von HD Exon 1 Proteinen in Säugetierzellen

2.1 Ergebnisse

2.1.1 Herstellen von stabilen Zelllinien

Für die Untersuchungen des Aggregationsprozesses von mutiertem Huntingtin wurden 293 Tet-Off Zelllinien benutzt, die eine für ein N-terminales Huntingtinfragment mit verschiedenen langen Glutaminketten kodierende DNA zusammen mit einem CMV-Minimalpromotor stabil in das Genom integriert haben. Das Tet-Off System ist Tetracyclin (tet) reguliert (Gossen and Bujard, 1992). Ein tet-kontrollierter Transaktivator (tTA), ein Fusionsprotein aus einem bakteriellen tet-Repressor und der Aktivierungsdomäne des Virionproteins 16 von Herpes Simplex, VP16, wird konstitutiv exprimiert (Abbildung 1). Dieses Regulatorprotein bindet spezifisch an sieben aufeinanderfolgende Kopien der 42 Basenpaare umfassenden tet-Operator Sequenz, das sogenannte tetracyclin-responsive DNA Element TRE, und fördert die Transkription nachfolgend der minimalen frühen Cytomegalovirus-Promotorsequenz. Tetracyclin und dessen Derivative wie Doxycyclin können an den Transaktivator binden, wobei sie eine Konformationsänderung des Transaktivators verursachen, der nun nicht mehr an das TRE Element binden kann. Wird dem Zellkulturmedium Doxycyclin zugesetzt, dann wird die Transkription der rekombinanten HD Exon 1 Konstrukte in 293 Tet-Off Zellen blockiert, wohingegen ohne Doxycyclin im Zellkulturmedium die Expression von HD Exon 1 induziert wird. Es wurden vier verschiedene stabile, induzierbare Zelllinien hergestellt. Darin werden die Proteine HD Exon 1 mit 20 (HDQ20), 51 (HDQ51) und 83 (HDQ83) Glutaminen exprimiert. Als Kontrolle wurde eine Zelllinie hergestellt, die in dem Plasmid mit dem minimalen CMV-Promotor keine zu transkribierende DNA enthält (Vektor).

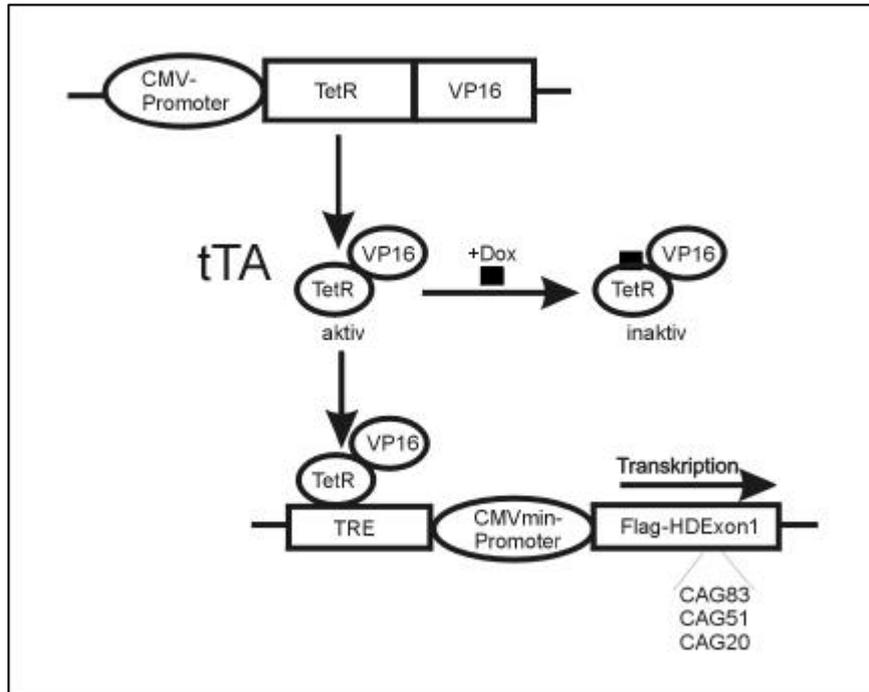


Abbildung 1. Schema der Genregulation im Tet-Off System.

Der Tetracyclin-kontrollierte Transaktivator (tTA) ist ein Fusionsprotein aus dem bakteriellen tet-Repressor (TetR) und der Aktivierungsdomäne des Virionproteins 16 von Herpes Simplex. Das tet-responsive element (TRE) besteht aus 7 Kopien der 42-bp tet-Operator Sequenz und befindet sich 3' der minimalen frühen Cytomegalovirus-Promotorsequenz, die die Transkription ohne Aktivierung nicht initiiert. tTA bindet das TRE in Abwesenheit von Doxycyclin und aktiviert dabei die Transkription von Flag-markierten HD Exon 1 Fragmenten mit 20, 51 oder 83 CAG Wiederholungen in 293 Tet-Off Zellen.

2.1.2 Bestimmung der optimalen Doxycyclinkonzentration

Um die optimale Doxycyclinkonzentration zu bestimmen, bei der die Expression der HD Exon 1 Proteine im nicht-induzierten Zustand möglichst vollständig unterdrückt ist, nach Entfernen des Doxycyclins jedoch sofort beginnt, wurden die 293 Tet-Off Zellen für 14 Tage bei Doxycyclinkonzentrationen von 10 bis 1000 ng/ml kultiviert. Der Hälfte der Zellen wurde dann für 3 Tage das Doxycyclin entzogen, während die andere Hälfte bei der entsprechenden Doxycyclinkonzentration im Zellkulturmedium weiter kultiviert wurde. Es wurden Extrakte aus den Zellen hergestellt, und nach einem Zentrifugationsschritt wurden die lösliche Fraktion (Überstand) und die unlösliche Fraktion (Pellet) durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der Western Blot Technik analysiert. Exemplarisch wird die Versuchsreihe für die Zelllinie HDQ51 gezeigt (Abbildung 2). Dabei wurden von der löslichen Fraktion 30 µg Gesamtprotein aufgetragen, von der unlöslichen 6 µg Gesamtprotein. In der Überstand-

Fraktion von Zellen, die ohne Doxycyclin kultiviert wurden, wurde mit dem CAG53b Antikörper die monomere Form des HDQ51 Proteins auf einer Höhe von 35 kDa detektiert. Dabei ist in Zellen, in denen wenig Doxycyclin (< 100 ng/ml) zur Unterdrückung der Expression eingesetzt wurde, am meisten Protein der monomeren Form zu sehen (Spur 2). In Zellen, bei denen die Expression mit Doxycyclinkonzentrationen von 100 ng/ml und mehr unterdrückt wurde, wird nach dem Entzug von Doxycyclin deutlich weniger HDQ51 Protein exprimiert (Spuren 4, 6, 8 und 10). Die Intensität der Proteinbande, die auch in Gegenwart von Doxycyclin im Zellkulturmedium zu sehen ist, ist jedoch bei allen Doxycyclinkonzentrationen etwa gleich (Spuren 1, 3, 5, 7 und 9).

Unlösliche hochmolekulare Proteinaggregate können nicht in ein SDS-Gel eindringen und bleiben in den Taschen des Gels liegen. Sie werden beim Western Blot aber zumindest teilweise auf die Nitrocellulose transferiert und können mit geeigneten Antikörpern immunologisch nachgewiesen werden. In den Pellet-Fractionen der Zellen, die nach Kultivierung in 10 ng Doxycyclin/ml Medium (Spur 2) bzw. 100 ng Doxycyclin/ml Medium (Spur 4) induziert wurden, liegen HDQ51 Proteinaggregate in den Geltaschen. Die Menge der gebildeten Proteinaggregate ist ebenfalls in den Zellen am höchsten, in denen wenig Doxycyclin (10 ng/ml) zur Unterdrückung der Expression eingesetzt wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die 293 Tet-Off Zellen generell bei der niedrigen Konzentration von 10 ng Doxycyclin/ml Zellkulturmedium kultiviert.

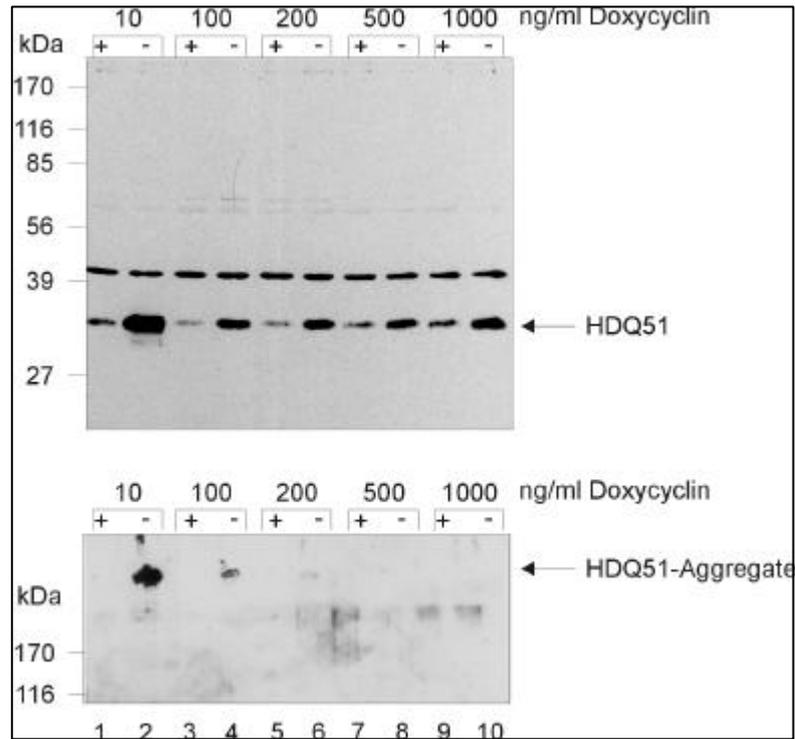


Abbildung 2. Bestimmung der optimalen Doxycyclinkonzentration zur Unterdrückung und Induktion der Expression von HDQ51 in 293 Tet-Off Zellen.

293 Tet-Off Zellen mit pTetCMV-Hyg-CAG51 wurden 14 Tage bei Doxycyclinkonzentrationen von 10-1000 ng/ml kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde anschließend für 3 Tage in Zellkulturmedium ohne Doxycyclin inkubiert. Lösliche (oben) und unlösliche (unten) Proteinfractionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die HDQ51 Proteine mit dem anti-Huntingtin Antikörper CAG53b auf einem Western Blot nachgewiesen. Die Monomerbande des löslichen HDQ51 Proteins ist bei 35 kDa zu sehen. Die Proteinexpression ist nach Entfernen der Doxycyclinkonzentration von 10 ng/ml am stärksten (Spur 2). SDS-unlösliche Proteinaggregate aus HDQ51 bleiben in den Taschen des Gels liegen. Die Menge der gebildeten HDQ51 Proteinaggregate ist ebenfalls nach Entfernen der Doxycyclinkonzentration von 10 ng/ml am höchsten (Spur 2).

2.1.3 Bestimmung der optimalen Induktionszeit

Die Zeit, die benötigt wird, um sowohl das monomere Protein in gut nachweisbaren Mengen zu exprimieren als auch die aggregierte Form des Huntingtinproteins bei entsprechend langen Glutaminketten nachzuweisen, wurde in einem Experiment untersucht, in dem die Expression der Proteine für unterschiedlich lange Zeiträume angeschaltet wurde. Auch hier wird das Ergebnis exemplarisch für das HDQ51 Protein gezeigt (Abbildung 3). Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und anschließendes Western blotting wurden die HDQ51 Proteine mit dem CAG53b Antikörper detektiert. Dabei wurden je 30 µg Gesamtprotein der löslichen und 10 µg Gesamtprotein der unlöslichen Fraktion auf separaten SDS-Gelen analysiert. Eine

35 kDa große Monomerbande, die stärker als die Basalexpression ohne Induktion ist (vergleiche Abbildung 2, Spur 1), ist frühestens nach einer Induktionszeit von 4-5 Stunden zu sehen (Spuren 5 und 6), die Aggregate in den Taschen des Gels nach 2 Tagen schwach, aber nach 3 Tagen sehr deutlich (Spuren 11 und 12). Für die weiteren Experimente wurde mit wenigen Ausnahmen die Expressionszeit von 3 Tagen gewählt.

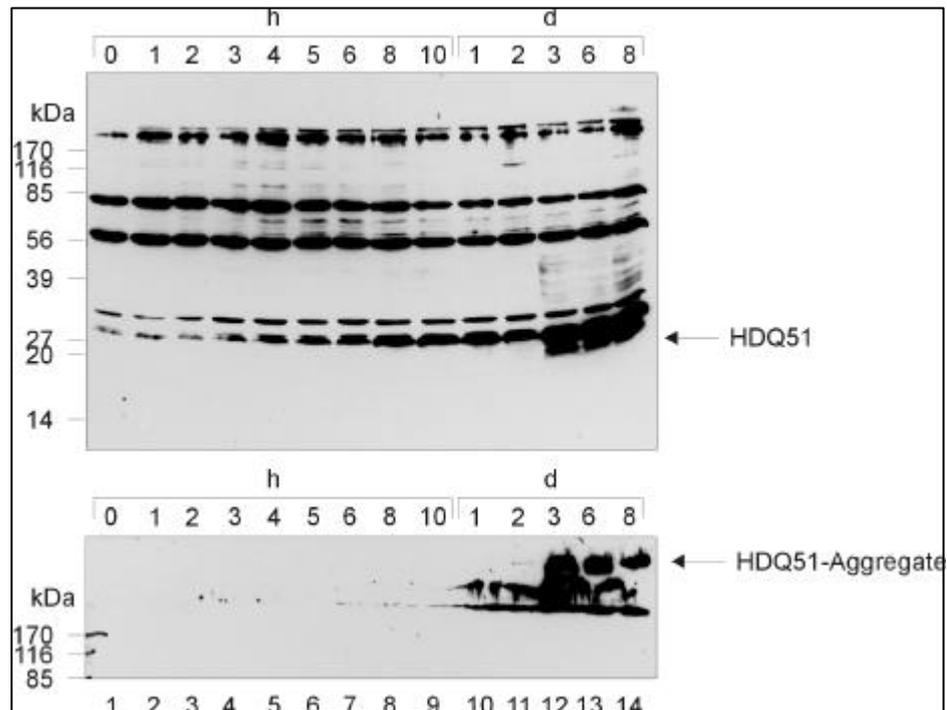


Abbildung 3. Bestimmung der optimalen Induktionszeit für die Expression von HDQ51 in 293 Tet-Off Zellen.

293 Tet-Off Zellen mit pTetCMV-Hyg-CAG51 wurden in Zellkulturmedium mit 10 ng Doxycyclin/ml kultiviert, bevor die Proteinexpression für die angegebenen Zeiten in Medium ohne Doxycyclin induziert wurde. Lösliche und unlösliche Proteinfractionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western blotting mit anti-CAG53b analysiert. Die Monomerbande des löslichen HDQ51 ist nach einer Induktion von 4-5 Stunden zu sehen (oberes Bild, Spuren 5 und 6). Nach 3 Tagen wurden große Mengen an SDS-unlöslichen Proteinaggregaten in den Taschen des Gels detektiert (unteres Bild, Spur 12).

2.1.4 Die Expression von HD Exon 1 Proteinen mit langen Polyglutaminketten führt zur Bildung von ubiquitinierten Aggregaten

Die HD Exon 1 Expression aller vier Zelllinien wurde unter den für HDQ51 ermittelten optimalen Bedingungen miteinander verglichen (Abbildung 4). 293 Tet-Off Zellen wurden für 3 Tage in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 ng Doxycyclin/ml Zellkulturmedium kultiviert. Nach Präparation der Zelllysate wurden diese abzentrifugiert, und die löslichen

sowie die unlöslichen Fraktionen durch SDS-PAGE und nachfolgendes Western blotting analysiert. Von der löslichen Fraktion wurden je 30 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen, von der unlöslichen Fraktion je 10 µg. In den löslichen Fraktionen der Zellen, die ohne Doxycyclin kultiviert wurden, detektierte der anti-Huntingtin Antikörper HD1 prominente Proteinbanden bei ca. 20, 35 und 45 kDa, die den Proteinen HDQ20, HDQ51 und HDQ83 entsprechen (Spuren 4, 6 und 8). Diese Banden sind in den Fraktionen der nicht-induzierten Zellen nur sehr schwach erkennbar (Spuren 3, 5 und 7). In der löslichen Fraktion der Zelllinie, die kein HD Exon 1 Konstrukt enthält, wurde mit dem HD1 Antikörper wie erwartet weder in der Anwesenheit noch in der Abwesenheit von Doxycyclin eine dieser Proteinbanden detektiert (Spuren 1 und 2). Wie Abbildung 4 zeigt, exprimieren die einzelnen Zelllinien unabhängig von der Glutaminkettenlänge die HD Exon 1 Proteine im wesentlichen gleich stark.

Die Pellet-Fractionen der Zellen, die HDQ51 und HDQ83 exprimieren (Spur 6 und 8), nicht aber die Pellet-Fraktion der HDQ20 exprimierenden Zellen (Spur 4), zeigen in den Geltaschen Aggregate, die mit dem anti-Huntingtin Antikörper HD1 detektiert werden. Das bestätigt die Ergebnisse von Scherzinger et al. (1999), die gezeigt haben, daß eine Polyglutaminwiederholung im pathologischen Bereich (> 37 Glutamine) entscheidend für die Bildung von unlöslichen Aggregaten in COS-1 Zellen ist. Auch für die Aggregatbildung von HD Exon 1 Proteinen in 293 Tet-Off Zellen scheint somit eine Polyglutaminwiederholung im pathologischen Bereich notwendig zu sein. Die HDQ51 und Q83 Aggregate werden auch mit einem anti-Ubiquitin Antikörper detektiert, was darauf hinweist, daß sie ubiquitiniert sind (Abbildung 4, unteres Bild).

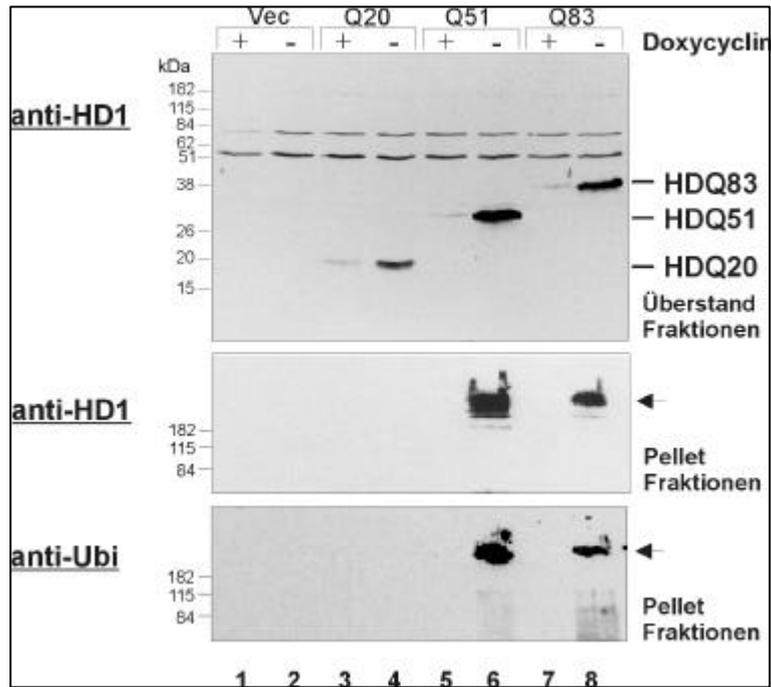


Abbildung 4. Analyse der HD Exon 1 Proteinexpression und -aggregation in 293 Tet-Off Zellen. Immunblots von löslichen (Überstand) und unlöslichen (Pellet) Proteinfractionen, die aus induzierten und nicht-induzierten 293 Tet-Off Zellen hergestellt wurden. Für die Induktion der HD Exon 1 Expression wurden die Zellen für 3 Tage in Abwesenheit von Doxycyclin kultiviert. Die löslichen und unlöslichen Proteinfractionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit dem anti-Huntingtin Antikörper HD1 oder dem anti-Ubiquitin Antikörper inkubiert. Spuren 1 und 2: Proteinfractionen hergestellt aus induzierten und nicht-induzierten Kontrollzellen ohne HD Exon 1 Plasmid; Spuren 3, 5 und 7: Proteinfractionen hergestellt aus nicht-induzierten Zellen; Spuren 4, 6 und 8: Proteinfractionen hergestellt aus induzierten Zellen, die jeweils die Proteine HDQ20, HDQ51 und HDQ83 exprimieren. Pfeile markieren den Anfang der Elektrophorese.

2.1.5 Zeitabhängigkeit der Aggregatbildung

Die Bildung der Huntingtin-Aggregate wurde in Abhängigkeit von der Zeit und der Glutaminsäurekettenslänge untersucht (Abbildung 5). Die Expression der verschiedenen HD Exon 1 Proteine wurde dazu durch Entfernen des Doxycyclins aus dem Zellkulturmedium für einen Zeitraum von 1-6 Tagen induziert. Es wurden Zellextrakte hergestellt, und diese mittels einer Filtrationsmethode auf das Vorhandensein von SDS-unlöslichen Proteinaggregaten untersucht. Dabei wurden je 80 µg Gesamtprotein, das in diesem Fall sowohl die löslichen als auch die unlöslichen Zellproteine beinhaltet, durch eine Celluloseacetatmembran filtriert und die zurückgehaltenen Aggregate mit dem HD1 Antikörper detektiert. HDQ83 bildet schon nach 2-3 Tagen Inkubationszeit SDS-unlösliche Aggregate, während bei HDQ51 diese erst zwei Tage später, nach insgesamt 4-5 Tagen nachweisbar sind. In den HDQ20-

exprimierenden Zellen konnten selbst 6 Tage nach Induktion keine SDS-unlöslichen Aggregate nachgewiesen werden. Die Rate der HD Exon 1 Proteinaggregation ist also abhängig von der Glutaminkettenlänge im Huntingtinfragment: je länger die Glutaminkette, desto früher setzt die Aggregatbildung ein. Dieses Ergebnis stimmt mit den *in vitro* Daten von Scherzinger et al. (1999) überein, die gezeigt haben, daß gereinigte HD Exon 1 Proteine mit einer Polyglutaminlänge im pathologischen Bereich (> 37 Glutamine) schneller aggregieren als solche mit einer Polyglutaminlänge im normalen Bereich (20-32 Glutamine).

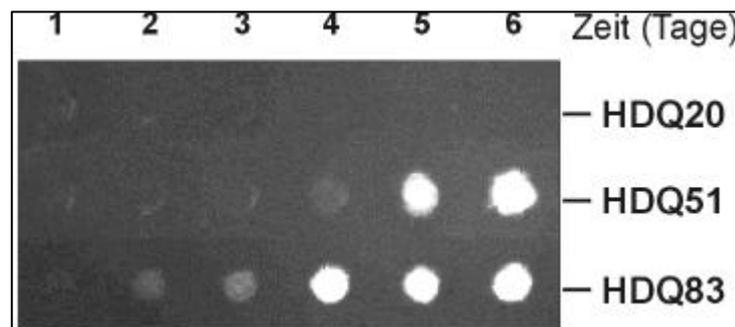


Abbildung 5. Zeitverlauf der HD Exon 1 Aggregation in 293 Tet-Off Zellen.

Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch Entfernen von Doxycyclin aus dem Kulturmedium induziert. An den angegebenen Tagen nach der Induktion wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und diese mit einer Filtrationsmethode analysiert. Die zurückgehaltenen HD Exon 1 Proteinaggregate wurden mit dem anti-Huntingtin Antikörper HD1 nachgewiesen.

2.1.6 Die Expression von HD Exon 1 Proteinen mit langen Polyglutaminketten führt zur Bildung von perinuklearen Aggregaten

Die Aggregatbildung in den 293 Tet-Off Zellen wurde auch mit der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 6, a-c). Nach dreitägiger Induktion der HD Exon 1 Expression durch Entfernen des Doxycyclins aus dem Zellkulturmedium wurden die Zellen fixiert und mit einem monoklonalen anti-Flag Antikörper und nachfolgend mit einem sekundären Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff CY3 gekoppelt ist, inkubiert. Die Kerne wurden mit Hoechst gefärbt. In den Zellen, die HDQ20 exprimieren, erkennt man eine homogene Färbung im Cytoplasma (Abbildung 6 a). Im Gegensatz dazu wurden in den HDQ51 und HDQ83 exprimierenden Zellen scharf abgegrenzte cytoplasmatische und nukleare Einschlusskörper detektiert, die aggregiertes Huntingtin Protein enthalten (Abbildung 6 b und c). In den meisten Fällen häuften sich diese HD Exon 1 Proteinaggregate in der perinuklearen Region an und hatten einen Durchmesser von 1-3 µm. Interessanterweise wurde

durch die Bildung perinuklearer Einschlusskörper die Form des Zellkerns erheblich verändert, was nahe legt, daß die Anhäufung der unlöslichen HD Exon 1 Proteinaggregate die Struktur des Zellkerns zerstört.

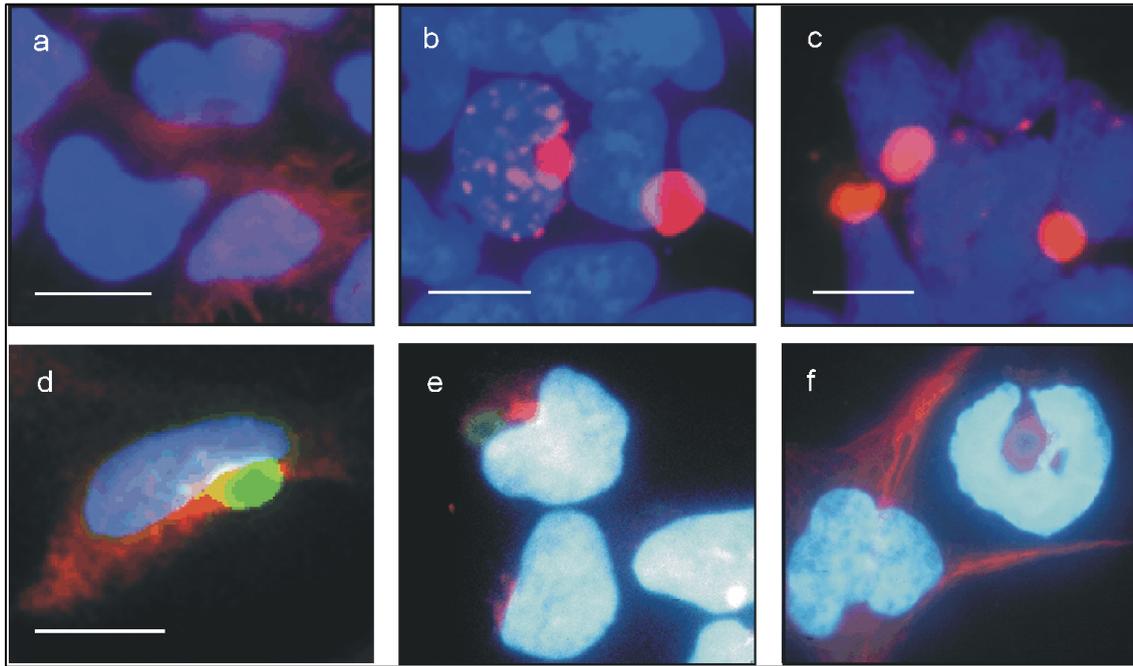


Abbildung 6. HD Exon 1 Proteine mit langen Polyglutaminketten bilden perinukleare Aggregate am Centrosom und verursachen die Umverteilung des Intermediärfilaments Vimentin.

(a-c) Die Expression der Proteine HDQ20, HDQ51 und HDQ83 wurde für 3 Tage durch Entfernen des Doxycyclins aus dem Kulturmedium induziert. Die Zellen wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem anti-Flag Antikörper und einem sekundären CY3-konjugierten Antikörper angefärbt (rot). Die Kerne wurden mit Hoechst gegengefärbt. Zellen, die HDQ20 exprimieren, zeigen homogene, cytoplasmatische Färbung (a), während in Zellen, die HDQ51 (b) oder HDQ83 (c) exprimieren, abgegrenzte Einschlusskörper zu sehen sind. Doppelmarkierungen zeigen, daß FITC-markierte HDQ83 Aggregate (grün) teilweise mit CY3-markiertem γ -Tubulin (rot), einem Centrosomenmarker, colokalisieren (d), aber nicht mit CY3-markiertem α -Mannosidase II, einem bekannten Golgi-Marker (e). Die HDQ83 Expression führt auch zu einer Umverteilung des CY3-markierten Intermediärfilaments Vimentin (f). Vimentin lagert sich ringförmig um die HDQ83 Proteinaggregate an. Im Vergleich dazu breitet sich Vimentin in Zellen ohne HDQ83 Protein bis zur Zellperipherie aus. Querbalken, 10 μ m.

2.1.7 Cytoplasmatische Aggregate colokalisieren mit dem Centrosom und führen zur zellulären Umverteilung von Vimentin

Johnston et al. (1998) haben gezeigt, daß falsch gefaltetes, ubiquitiniertes CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) und PS1 (Presenilin 1) Protein sich in charakteristischen perinuklearen Einschlusskörpern anhäufen, die sie „Aggresomen“ genannt haben. Die Anhäufung von Proteinen in hochmolekularen, vielfach ubiquitinierten und

Detergenzien-unlöslichen Aggregaten tritt auf, wenn die Kapazität des Proteasomenabbauwegs entweder durch einen Überschuß an Substrat oder durch eine Abnahme der Proteasomenaktivität überschritten wird. Diese Aggregate werden zu einer ubiquitinreichen Struktur am Centrosom transportiert, wo sie dann von dem Intermediärfilament Vimentin umhüllt werden. Es wurde gezeigt, daß Aggresomen aus Aggregaten von mehreren verschiedenen integralen Membranproteinen gebildet werden können, und die Hypothese aufgestellt, daß Aggresomen eine allgemeine zelluläre Antwort auf die Anwesenheit von aggregiertem, nicht abbaubarem Protein darstellen. Da auch in den 293 Tet-Off Zellen, die ein mutiertes Huntingtinfragment (51 oder 83 Glutamine) exprimieren, nicht jedoch in den ein normales Huntingtinfragment (20 Glutamine) exprimierenden Zellen, perinukleare Einschlusskörper zu sehen waren, die neben Huntingtin auch teilweise Ubiquitin enthielten, wurde untersucht, ob die HD Exon 1 Proteinaggregate strukturell mit den CFTR Aggresomen verwandt sind. Dazu wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation der Aggregate innerhalb der Zelle durch Co-Immunfärbungen mit Antikörpern gegen Huntingtin und gegen spezifische Zellkompartimente festgestellt (Abbildung 6, d-f). Co-Immunfärbung von HDQ83 exprimierenden Tet-Off Zellen mit dem anti-Huntingtin Antikörper CAG53b und anti- γ -Tubulin, einem als Centrosomenmarker bekannten Protein (Dictenberg et al., 1998), zeigte eine teilweise Überlagerung der HD-Aggregate und der Centrosomen (Abbildung 6 d). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß HD Exon 1 Aggregate, die nicht vom Proteasom abgebaut werden, zum Centrosom gebracht und dort angehäuft werden. Aufgrund der perinuklearen Lage der HD Exon 1 Aggregate lag die Vermutung nahe, daß die Aggregate in einer Region liegen, die auch den Golgi-Apparat enthält. Eine Co-Immunfärbung der HDQ83 Proteinaggregate mit dem Golgi-Marker α -Mannosidase II (Abbildung 6 e) zeigte jedoch, daß sich zwar beide Strukturen an ähnlicher Stelle in der Zelle befinden, sich aber klar voneinander abgrenzen lassen. Huntingtin Exon 1 Aggregate in 293 Zellen sind somit nicht direkt mit dem Golgi-Apparat assoziiert. Schließlich wurde auch die Lokalisation des Intermediärfilaments Vimentin in Zellen mit HDQ83 Proteinaggregaten untersucht. In Kontrollzellen bildet Vimentin ein verzweigtes, cytoskelettartiges Netzwerk, das bis in die Zellperipherie reicht. Wenn sich in der Zelle jedoch HDQ83 Proteinaggregate gebildet haben, wird die Lokalisierung von Vimentin so verändert, daß sich die Vimentinfilamente in einer ringförmigen Struktur um die HDQ83 Proteinaggregate anlagern (Abbildung 6 f).

Diese Befunde zeigen, daß die perinuklearen Einschlußkörper, die aggregiertes HDQ51 oder HDQ83 Protein enthalten, den Aggresomen, die für das Protein CFTR beschrieben wurden, strukturell ähnlich sind.

2.1.8 Colokalisation des Proteasoms mit HD Exon 1 Aggregaten

Das Proteasom ist am Abbau falsch gefalteter Proteine beteiligt. Zum Beispiel werden neu synthetisierte Polypeptidketten, die sich im endoplasmatischen Retikulum nicht richtig falten können, aus dem endoplasmatischen Retikulum ausgeschleust und mit Hilfe des cytoplasmatischen Proteasoms abgebaut (Voges et al., 1999). Ebenso werden nicht gefaltete oder falsch gefaltete Proteine aus dem Cytoplasma in den Proteasomen degradiert.

Um zu prüfen, ob das 26S Proteasom in den perinuklearen Einschlußkörpern vorhanden ist, wurden induzierte 293 Tet-Off Zellen, die das HDQ83 Protein exprimieren, mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 7). In Co-Immunfärbungen wurden die HDQ83 Proteinaggregate mit einem anti-Flag Antikörper detektiert, die proteasomalen Untereinheiten mit anti-20S, anti-11S und anti-19S Antikörpern. In Abbildung 7 ist zu sehen, daß alle drei proteasomalen Untereinheiten mit den HDQ83 Proteinaggregaten colokalisieren, was nahe legt, daß das 26S Proteasom direkt am Abbau des aggregierten HD Exon 1 Proteins beteiligt ist.

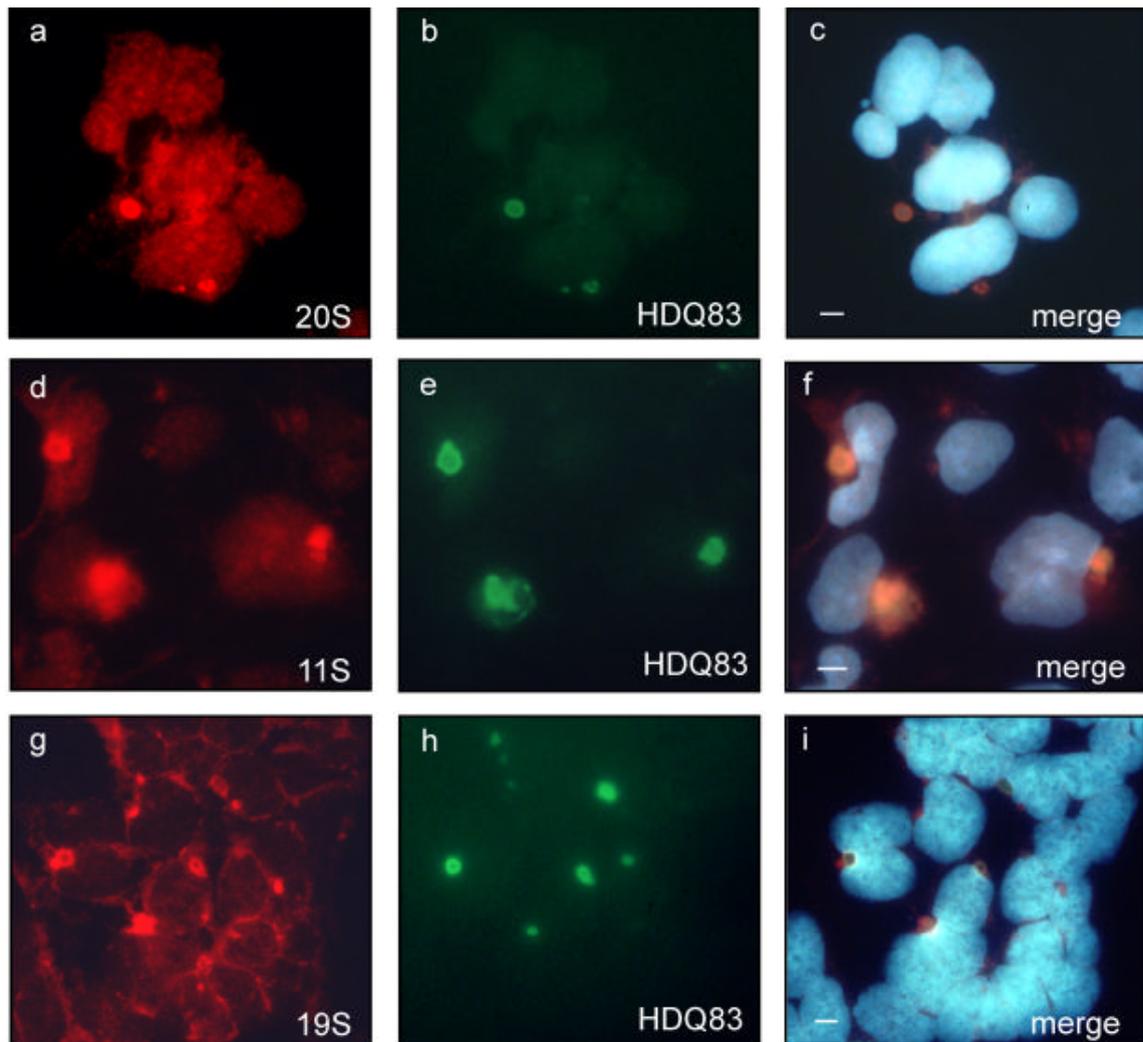


Abbildung 7. Colokalisation von HDQ83 Proteinaggregaten mit den proteasomalen Untereinheiten 20S, 11S und 19S.

Drei Tage nach Induktion der HDQ83 Expression wurden die Zellen mit Antikörpern gegen 20S/HDQ83 (a-c), 11S/HDQ83 (d-f) und 19S/HDQ83 (g-i) immunmarkiert. HDQ83 Proteinaggregate wurden mit dem Flag-Antikörper und einem sekundären, FITC-konjugierten Antikörper markiert (grün); die proteasomalen Untereinheiten wurden mit den anti-20S, anti-11S und anti-19S Antikörpern und einem sekundären, CY3-konjugierten Antikörper detektiert (rot). Die Kerne wurden mit Hoechst gefärbt. Querbalken, 5 µm.

2.1.9 Die Inhibierung des Proteasoms verstärkt die Aggregationsbildung

Um festzustellen, ob die Inhibierung des Proteasoms die Aggregation der HD Exon 1 Proteine beeinflusst, wurden die 293 Tet-Off Zellen mit dem spezifischen Proteasomeninhibitor Lactacystin inkubiert (Abbildung 8). Dazu wurde die HDQ51 Expression für einen Tag induziert, und die Zellen wurden anschließend für 48 Stunden mit Lactacystin inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, und 40 µg der Gesamtzellextrakte, die sowohl das lösliche als auch das

unlösliche Protein enthielten, mit der Filtrationsmethode analysiert. Zur Kontrolle wurden HDQ51 exprimierende 293 Tet-Off Zellen entweder gar nicht behandelt, oder nur mit dem Lösungsmittel DMSO, in dem das Lactacystin gelöst war. Abbildung 8 A zeigt, daß in den Kontrollzellen etwa um die Hälfte weniger HDQ51 Proteinaggregate gebildet wurden als in den mit Lactacystin behandelten. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Colokalisationsstudien und zeigt, daß das 26S Proteasom direkt am Abbau der HD Exon 1 Proteinaggregate beteiligt ist.

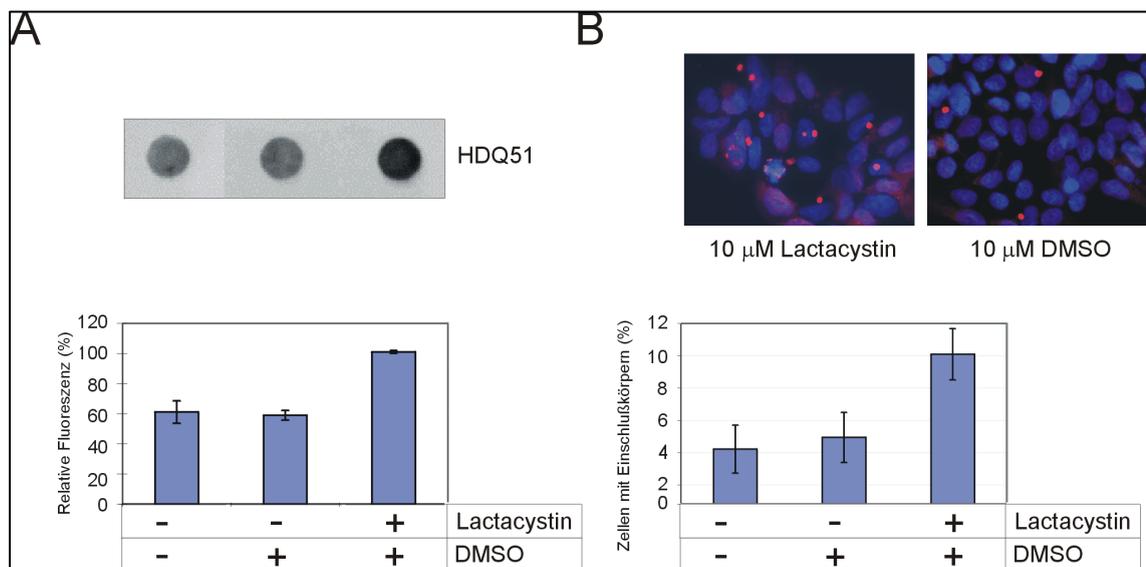


Abbildung 8. Die Menge der HD51Q Aggregate in 293 Tet-Off Zellen steigt als Antwort auf Proteasomeninhibition.

(A) Nach Induktion der HDQ51 Expression für 1 Tag wurden die Zellen für 48 Stunden mit Lactacystin (10 µM) oder DMSO (10 µM) inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde ohne Behandlung für insgesamt 3 Tage induziert. Gesamtzellextrakte wurden mit der Filtrationsmethode analysiert und zurückgehaltene Aggregate mit dem anti-Huntingtin Antikörper HD1 detektiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Experimente. (B) Nach Induktion der HDQ51 Expression für 8 h wurden die Zellen für 24 h mit Lactacystin (10 µM) oder DMSO (10 µM) inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde ohne Behandlung für insgesamt 32 h induziert. Die Anzahl der Zellen mit Einschlusskörpern wurde mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskops nach Färbung mit dem anti-Huntingtin Antikörper CAG53b bestimmt. In jedem Experiment wurden etwa 6000 Lactacystin-behandelte und unbehandelte Zellen ausgezählt.

In einem weiteren Experiment wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die Anzahl der entstehenden HD Exon 1 Proteinaggregate in den mit Lactacystin behandelten oder unbehandelten 293 Tet-Off Zellen bestimmt. Dazu wurden HDQ51-exprimierende 293 Tet-Off Zellen für 8 Stunden induziert und anschließend für weitere 24 Stunden mit 10 µM Lactacystin inkubiert. Zur Kontrolle wurden HDQ51-exprimierende Zellen nur mit dem

Lösungsmittel DMSO behandelt oder ohne Behandlung für insgesamt 32 Stunden induziert. Die Anzahl der gebildeten Einschlusskörper wurde im Fluoreszenzmikroskop nach Färbung der Huntingtinproteine mit dem anti-Huntingtin Antikörper CAG53b und einem sekundären CY3-konjugierten Antikörper, festgestellt. Es wurden etwa 6000 Lactacystin-behandelte und unbehandelte Zellen ausgewertet, wobei die Zellen mit mikroskopisch erkennbaren Einschlusskörpern prozentual in Bezug auf die Gesamtzellzahl berechnet wurden. In den Lactacystin-behandelten Zellen war der Prozentsatz der Zellen mit Einschlusskörpern, die HD Exon 1 Protein enthalten, etwa doppelt so hoch wie in den unbehandelten Zellen (Abbildung 8 B). Das Ergebnis stimmt mit den Resultaten der Filtrationsmethode überein.

2.1.10 Rekrutierung des ER-Chaperons BiP/Grp78 in die perinuklearen Einschlusskörper

Für die Polyglutaminkrankheit Spinocerebellare Ataxie Typ I (SCA-1) wurde gezeigt, daß molekulare Chaperone die Aggregatbildung des Ataxin-1 Proteins mit einer verlängerten Polyglutaminkette im pathologischen Bereich unterdrücken können (Cummings et al., 1998). Auch in Fliegenmodellen unterdrücken molekulare Chaperone die durch ein Polyglutaminprotein vermittelte Toxizität und verlangsamen die fortschreitende Degeneration in Nervenzellen (Warrick et al., 1999), wobei die Aggregation des Polyglutaminproteins selbst in diesem Falle jedoch nicht verhindert wird. Der molekulare Mechanismus, durch den Chaperone die Neurodegeneration abschwächen, ist also noch unklar. In Hefe wiederum verhindern Hsp70 und Hsp40 die Bildung von SDS-unlöslichen, Polyglutamin-enthaltenden Fibrillen (Muchowski et al., 2000). Stattdessen werden kleinere, SDS-lösliche Einschlusskörper gebildet.

Hier wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie verschiedene Klassen von Chaperonen daraufhin untersucht, ob sie in den 293 Tet-Off Zellen mit den HDQ83 Aggregaten assoziieren können (Abbildung 9). Als erstes wurde die Lokalisation von einem Chaperon des endoplasmatischen Retikulums, GRP78 (Glucose reguliertes Protein), auch BiP (Bindeprotein) genannt, im Zusammenhang mit den perinuklearen Einschlusskörpern untersucht. BiP ist ein Hsp70 molekulares Chaperon im Lumen des endoplasmatischen Retikulums, das neu synthetisierte Proteine bindet, sobald sie in das ER gelangen, und diese dort in einem Zustand hält, in dem sie sich falten und oligomerisieren können (Gething, 1999). BiP ist auch am retrograden Transport von falsch gefalteten Proteinen aus dem ER ins

Cytoplasma beteiligt, wo sie durch das Proteasom abgebaut werden (Voges et al., 1999). BiP könnte aufgrund seiner Lokalisation als Marker für das ER angesehen werden. In Colokalisierungsstudien mit 293 Tet-Off Zellen, die HDQ83 exprimieren, wurde hier jedoch überraschenderweise entdeckt, daß BiP mit etwa 40-50% der Einschlußkörper colokalisiert (Abbildung 9, a-c). Diese Colokalisierung konnte schon in einem sehr frühen Schritt des Aggregationsprozesses nachgewiesen werden; nach 2 Tagen Induktion der Tet-Off Zellen, einem Zeitpunkt, in dem die perinuklearen Einschlußkörper in der Immunfluoreszenz erstmals detektiert werden können, sieht man schon eine Colokalisation von HDQ83 Aggregaten und BiP. Anscheinend wird BiP als eine der frühesten Zellantworten bei dem Versuch, die Anhäufung von falsch gefalteten Proteinen zu verhindern, in die Aggregate rekrutiert.

Im Gegensatz dazu konnten nach 2 Tagen Induktion der Tet-Off Zellen weder das cytoplasmatische Chaperon Hsp70 noch Hsp40 in den Aggregaten nachgewiesen werden. Erst nach 5 bis 7 Tagen Induktion der HDQ83 Expression wurde eine erhebliche Anreicherung dieser beiden Chaperone in den Einschlußkörpern beobachtet (Abbildung 9, d-i). Die Rekrutierung der cytoplasmatischen Chaperone Hsp70 und Hsp40 scheint somit eher ein später Vorgang bei der Bildung der Einschlußkörper zu sein.

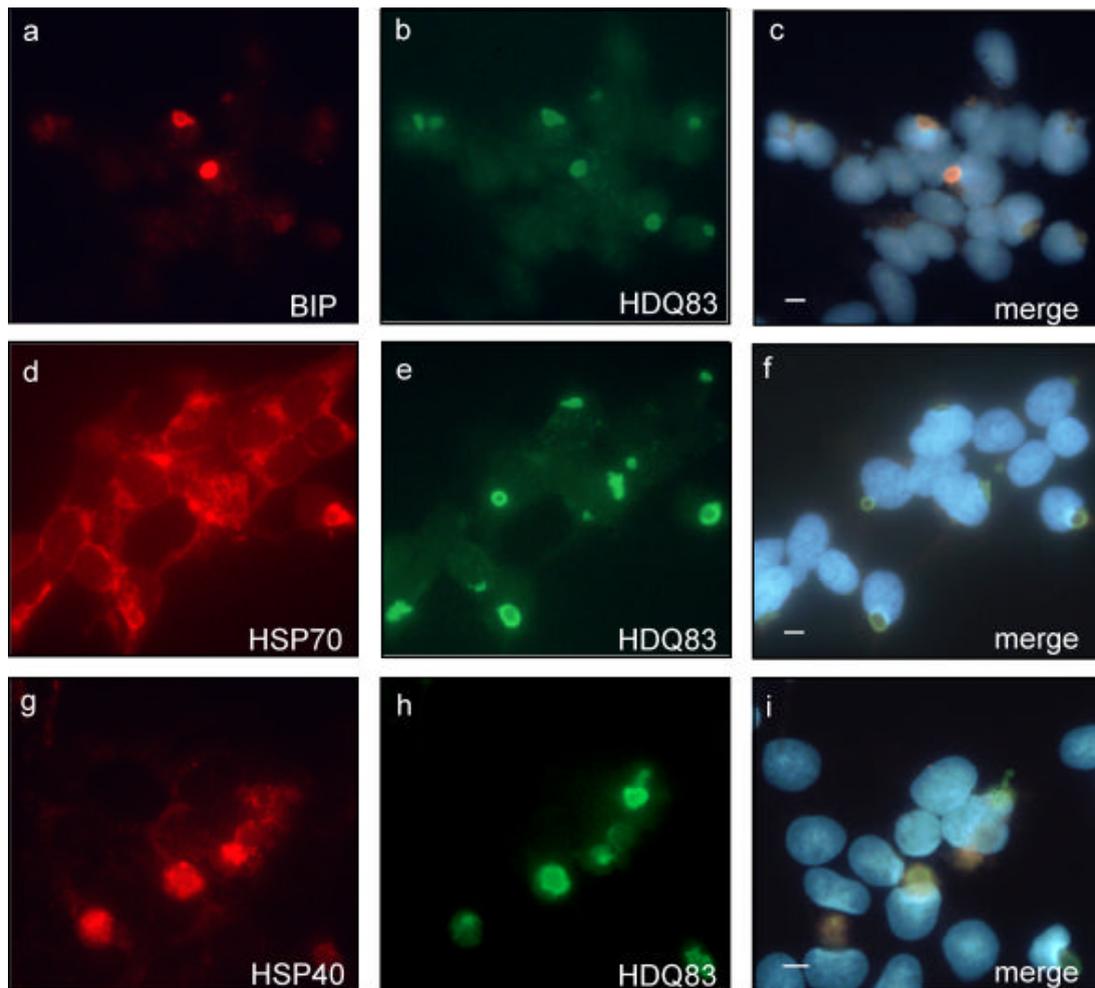


Abbildung 9. Chaperone werden in HD Exon 1 Proteinaggregate rekrutiert.

3 Tage nach Induktion der HDQ83 Expression wurden die Zellen mit Antikörpern gegen BiP und HDQ83 (a-c) markiert. Doppelmarkierungen der Zellen mit Antikörpern gegen Hsp70 und HDQ83 (d-f) und Hsp40 und HDQ83 (g-i) wurden 6 Tage nach Induktion der HDQ83 Expression durchgeführt. HDQ83 Proteinaggregate wurden mit dem anti-Huntingtin Antikörper CAG53b und einem sekundären, FITC-konjugierten Antikörper markiert (grün); die Chaperone wurden mit Antikörpern gegen BiP, Hsp70 und Hsp40 und einem sekundären, CY3-konjugierten Antikörper gefärbt (rot). Kerne wurden mit Hoechst gegengefärbt. Die Colokalisation der HDQ83 Aggregate mit BiP, Hsp70 und Hsp40 ist jeweils in c, f und i gezeigt. Querbalken, 5 μ m.

2.1.11 Colokalisierung von TIA-1, 14-3-3 ϵ und α -Synuclein mit den perinuklearen Einschlußkörpern

Um festzustellen, ob zusätzlich zu den bereits gezeigten Chaperonen und den Komponenten des Ubiquitin-Proteasom Systems noch andere Chaperone bzw. Streßproteine in die Einschlußkörper gezogen werden, wurde untersucht, ob die Proteine TIA-1, 14-3-3 ϵ und α -Synuclein mit den HDQ83 Proteinaggregaten colokalisieren (Abbildung 10). TIA-1 ist ein Protein, das untranslatierte mRNA als Antwort auf Streß wie z.B. Hitzeschock in Streßgranula

rekrutieren kann, wo sie nicht abgebaut, sondern nach Erholung von dem sublethalen Streß translatiert wird. Für 14-3-3 ϵ und α -Synuclein, die auch als Chaperone wirken können, soll untersucht werden, ob sie die Bildung von Proteinaggregaten beeinflussen können. Untersuchungen mit der Immunfluoreszenzmikroskopie ergaben, daß 2-3 Tage nach Induktion der HDQ83 Expression das RNA-bindende Protein TIA-1 (Kedersha et al., 1999), das Chaperon 14-3-3 (Shaw, 2000) und auch α -Synuclein (Souza et al., 2000) in den perinuklearen Einschlußkörpern vorhanden sind (Abbildung 10). Dieses Ergebnis legt nahe, daß auch diese Proteine als Teil einer frühen Anstrengung der Zelle, falsch gefaltetes Protein zu entfernen, in die Aggregate gezogen werden. Nach längeren Induktionszeiten (5-7 Tage) konnten auch Amyloid- β (Masters et al., 1985) und Presenilin 1 (Sherrington et al., 1995) in den Einschlußkörpern nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das deutet darauf hin, daß die Rekrutierung dieser Proteine ein relativ spätes Ereignis im Prozeß der Einschlußkörperbildung zu sein scheint.

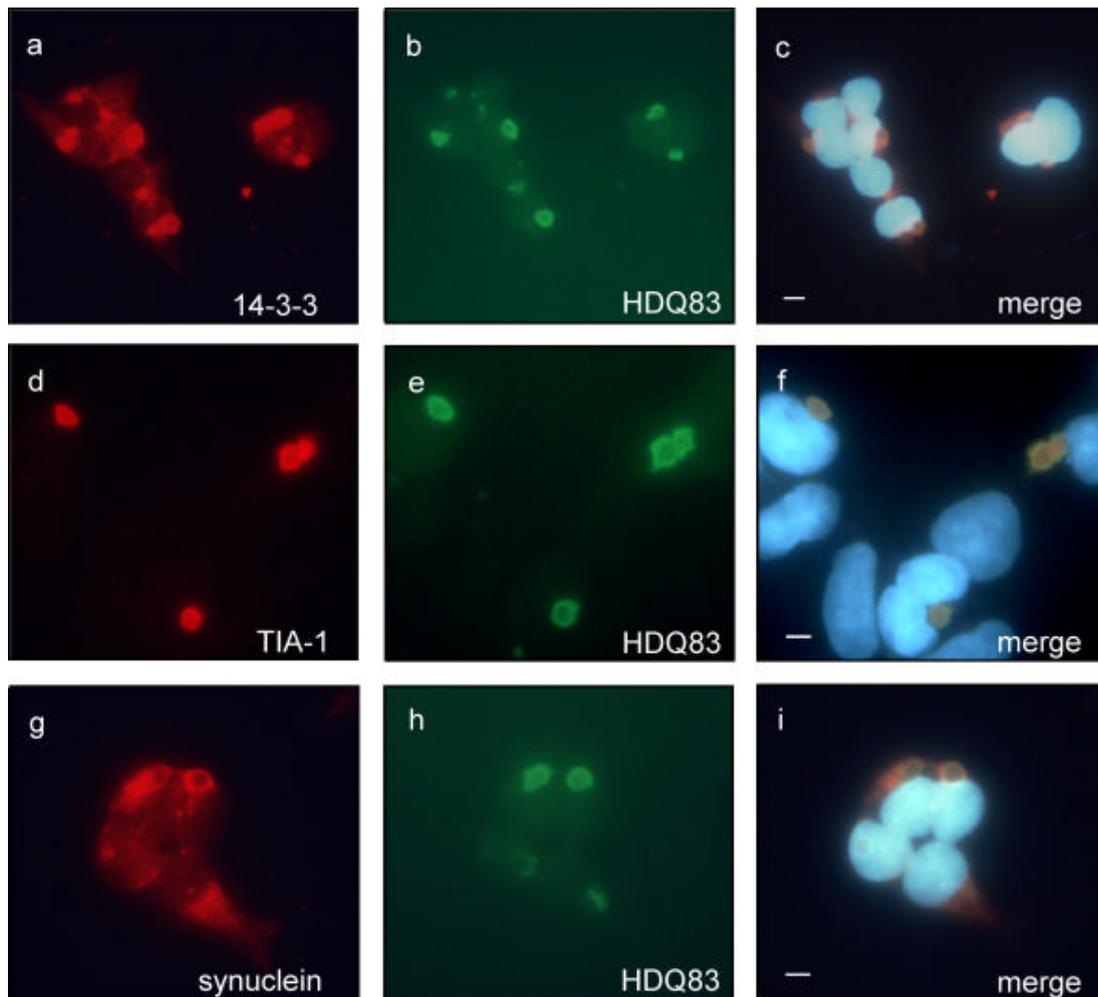


Abbildung 10. Colokalisation von endogenem 14-3-3 ϵ , TIA-1 und α -Synuclein mit HD Exon 1 Aggregaten.

Die Expression von HDQ83 wurde für 3 Tage induziert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen 14-3-3 ϵ /HDQ83 (a-c), TIA-1/HDQ83 (d-f) und α -Synuclein/HDQ83 (g-i) gefärbt. HDQ83 Aggregate wurden mit einem anti-Flag und einem FITC-konjugierten Antikörper (a-c, g-i, grün) oder dem CAG53b Antikörper und einem FITC-konjugierten Antikörper (d-f, grün) markiert. Die Proteine 14-3-3 ϵ , TIA-1 und α -Synuclein wurden mit Antikörpern gekoppelt und mit einem sekundären CY3-konjugierten Antikörper detektiert (rot). Kerne wurden mit Hoechst gefärbt. Querstrich, 5 μ m.

2.1.12 Ultrastruktur der perinuklearen Einschlußkörper

Neben der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Zellen der transgenen 293 Tet-Off Linien auch mit Hilfe der Elektronenmikroskopie hinsichtlich der subzellulären Organisation sowie der Ultrastruktur und Proteinzusammensetzung der Einschlußkörper untersucht (Abbildung 11). Dazu wurden die Zellen für 2 bis 5 Tage in Abwesenheit von Doxycyclin kultiviert, fixiert und nach Einbettung in LR Gold oder Spurr's Harz mit der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Zellen, die das Protein HDQ20 exprimierten, erschienen in ihrer zellulären Organisation normal, während in den Zellen, die das mutierte HD Exon 1

Protein mit 83 Glutaminen exprimierten, charakteristische morphologische Veränderungen zu beobachten waren. Diese Zellen enthielten relativ große, membranfreie, kugelförmige Strukturen mit einem Durchmesser von 1-5 μm , die aus elektronendichtem, filamentösen Material bestehen (Abbildung 11, a und b). Bei einer höheren Vergrößerung konnte man feststellen, daß die faserartigen Bereiche aus einzelnen Filamenten mit einem Durchmesser von etwa 10 nm bestehen (Abbildung 11, c und d). Diese Filamente ähneln den HD Exon 1 Fasern, die *in vitro* aus rekombinanten GST-HD Exon 1 Proteinen nach proteolytischer Abspaltung der GST-Hälfte produziert werden (Scherzinger et al., 1997) und auch in transgenen Mausmodellen beobachtet worden sind (Davies et al., 1997). Um nachzuweisen, daß die beobachteten Fasern aus Huntingtinprotein bestehen, wurde eine Immunfärbung mit dem anti-Huntingtin Antikörper HD1 und einem sekundären, mit Gold markierten Antikörper durchgeführt. Bei hoher Vergrößerung ist die Markierung der Fasern mit den 10 nm großen Goldpartikeln deutlich erkennbar (Abbildung 11 d).

Zur weiteren Charakterisierung der Einschlusskörper wurden HDQ83 exprimierende Zellen auch mit Antikörpern gegen Ubiquitin und 14-3-3 ϵ markiert. Wie aus Abbildung 11, h und i, ersichtlich ist, werden die Einschlusskörper spezifisch mit diesen Antikörpern markiert, was die Anwesenheit von Ubiquitin und 14-3-3 ϵ im Kernbereich der Einschlusskörper bestätigt. Vielfach haben die Kerne von Zellen, die Einschlusskörper besitzen, große Einbuchtungen in ihrer Kernmembran (Abbildung 11, a und e). Ähnliche Veränderungen wurden auch in neuronalen Zellen von HD transgenen Mäusen und Patienten gesehen (Davies et al., 1997) und (Roizin et al., 1979). Bei hoher Vergrößerung sieht man eindeutige Unterbrechungen der Kernmembran (Abbildung 11 f), was vermuten läßt, daß die Entstehung der Einschlusskörper nicht nur die Form der Kerne verändert, sondern auch den normalen Transport von Material durch die Poren der Kernmembran zumindest teilweise stört. Häufig wurde in Zellen mit großen Einschlusskörpern auch eine Umverteilung von Organellen wie Mitochondrien, Vakuolen und Vesikeln beobachtet. Besonders Mitochondrien scheinen an den Rand der Einschlusskörper gezogen zu werden (Abbildung 11 g). Im Randgebiet, aber nicht im Inneren der Einschlusskörper, wurden auch Bündel des Intermediärfilaments Vimentin detektiert, was die Ergebnisse aus der Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abbildung 6 f). In Zellen, die das normale HDQ20 Protein exprimieren, wurde keine dieser Veränderungen beobachtet.

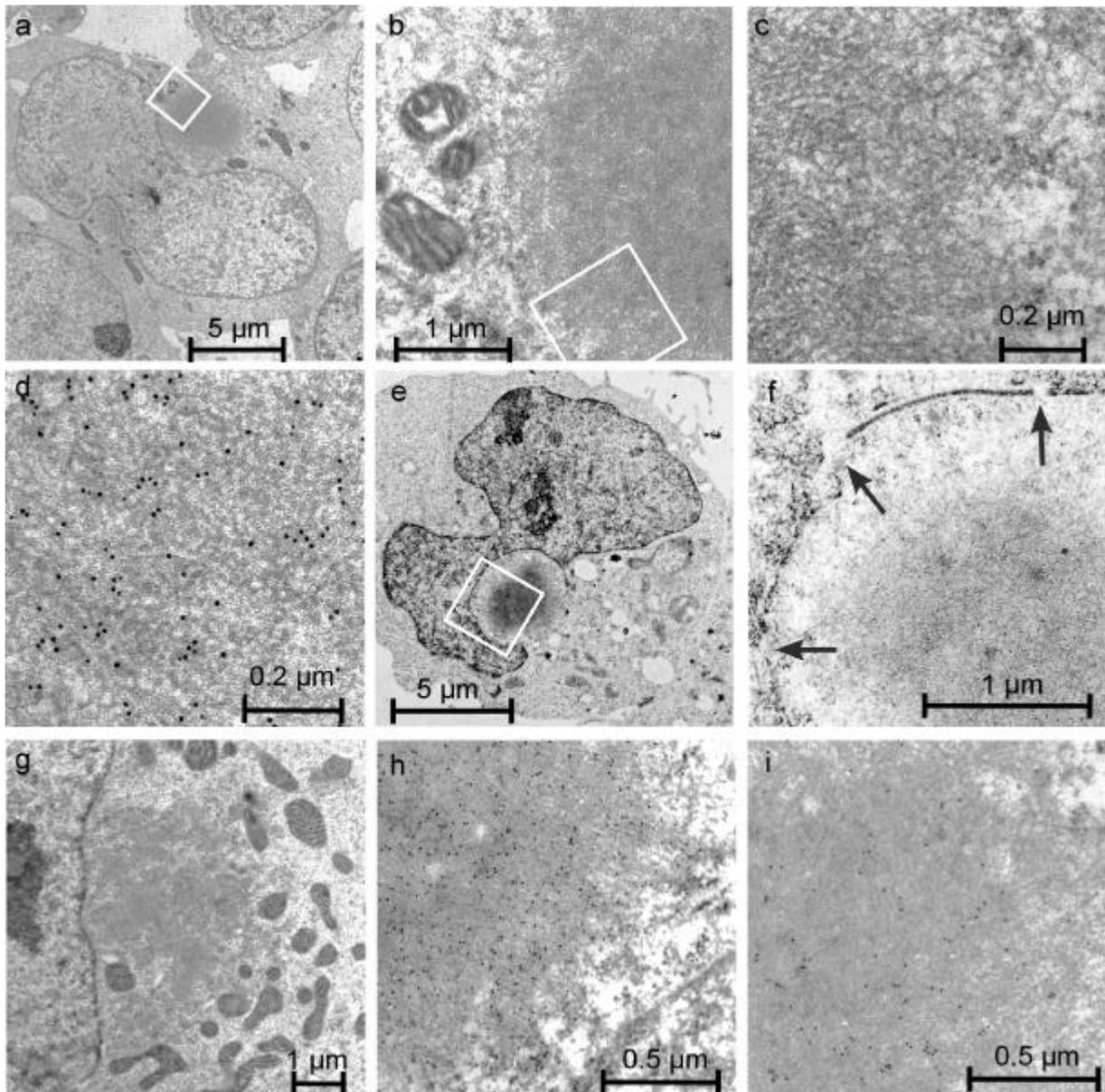


Abbildung 11. Elektronenmikroskopische Analysen von 293 Tet-Off Zellen mit HDQ83 Aggregaten.

Nach Expression von HDQ83 für 3-5 Tage wurden die Zellen fixiert und wie unter Materialien und Methoden beschrieben für elektronenmikroskopische Untersuchung vorbereitet und analysiert. (a-c) Verschiedene Vergrößerungen einer Zelle, die einen typischen, perinuklearen Einschlusskörper enthält. Bei hoher Vergrößerung können HDQ83 Fibrillen mit einem Durchmesser von ~ 10 nm beobachtet werden. Immungold-Markierungen der Zellen mit dem anti-Huntingtin Antikörper HD1 bestätigen die Identität der HDQ83 Fibrillen (d). Immungold-Markierungen der Zellen zeigen, daß die Proteine Ubiquitin (h) und 14-3-3ε (i) im Inneren der Einschlusskörper vorhanden sind. In Zellen mit perinuklearen Einschlusskörpern werden ebenso strukturelle Veränderungen wie große Einbuchtungen in der Kernhülle (e), Unterbrechungen der Kernmembran (f) und Konzentrierung von Mitochondrien in der Nähe der Einschlusskörper (g) beobachtet. In f sind die Veränderungen der Kernhülle mit Pfeilen markiert.

2.1.13 Die Expression von mutierten Huntingtinproteinen ist toxisch für 293 Tet-Off Zellen

Die Lebensfähigkeit der Zellen, die HDQ20, HDQ51 und HDQ83 exprimieren, wurde mit dem XTT-Test (Roehm et al., 1991) untersucht. In diesem Experiment wurde die Expression der HD Exon 1 Proteine für insgesamt 4 Tage induziert. Abbildung 12 zeigt, daß die Lebensfähigkeit der 293 Tet-Off Zellen mit steigender Glutaminkettenlänge abnimmt. So ist die Lebensfähigkeit der HDQ51 und HDQ83-exprimierenden Zellen um den Faktor 1,76 bzw. 2,38 geringer als die der HDQ20-exprimierenden Zellen. Nach 4 Tagen Induktion der Expression enthalten 30–50% der Zellen, die HDQ51 oder HDQ83 exprimieren, große, perinukleare Einschußkörper, die nicht in den HDQ20-exprimierenden Zellen beobachtet werden können. Zellen mit Einschußkörpern, die aggregiertes Huntingtin enthalten, scheinen somit bedeutend weniger lebensfähig zu sein als Zellen ohne Einschußkörper. Das läßt den Schluß zu, daß der Vorgang der Aggregatbildung in den 293 Tet-Off Zellen toxisch ist.

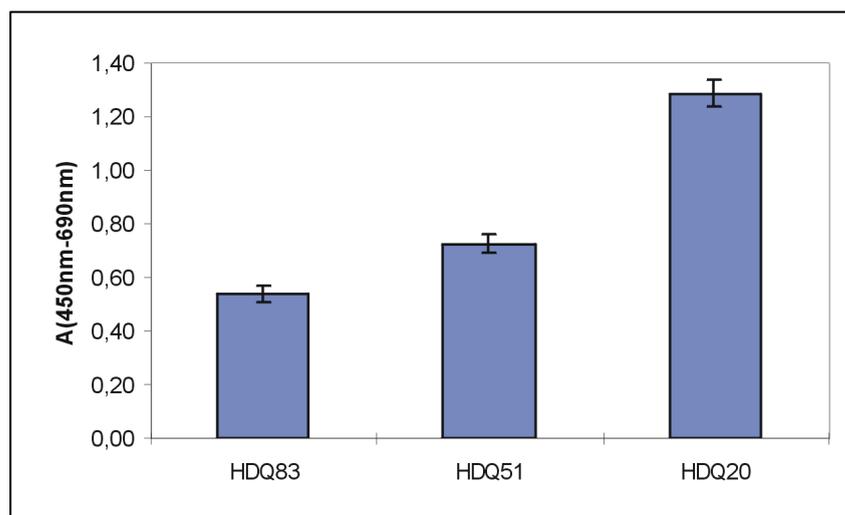


Abbildung 12. Expression des mutierten HD Exon 1 Proteins ist für 293 Tet-Off Zellen toxisch. Die Expression von HD Exon 1 Proteinen mit 20, 51 und 83 Glutamine wurde für 4 Tage induziert, und die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit dem XTT-Test, wie unter Materialien und Methoden beschrieben, bestimmt. Die gezeigten Meßwerte sind der Mittelwert von 9 Bestimmungen.

2.2 Diskussion

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Aggregation des Huntingtinproteins in Säugetierzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden stabile, induzierbare 293 Tet-Off Zelllinien hergestellt, die ein Huntington Exon 1 Protein mit 20, 51 oder 83 Glutaminen exprimieren. Die nach der

Selektion erhaltenen Zelllinien wurden hinsichtlich ihres Expressionsmusters untersucht. Dazu wurden zunächst die optimale Doxycyclinkonzentration für das An- und Ausschalten der 293 Tet-Off Zellen und die optimale Induktionszeit ermittelt. Am meisten Protein, sowohl in der löslichen monomeren als auch im Fall von HDQ51 und HDQ83 in der SDS-unlöslichen aggregierten Form, wurde bei der Induktion nach Kultivierung der Zellen in einer geringen Doxycyclinkonzentration (10 ng/ml) exprimiert (Abbildung 2). Vermutlich ist die Doxycyclinkonzentration von 10 ng/ml auf der einen Seite ausreichend, um die Expression zu unterdrücken, und auf der anderen Seite gering genug, um nach Wechsel des Zellkulturmediums zu Medium ohne Doxycyclin vollständig aus dem Medium und den Zellen entfernt zu werden. Das monomere Protein ist frühestens nach einer Induktionszeit von 4-5 Stunden zu sehen, während die Aggregate erst nach 2-3 Tagen sichtbar sind. Da in den nachfolgenden Experimenten die Aggregationsbildung und die Aggregate selbst untersucht werden sollten, wurde mit wenigen Ausnahmen die Expressionszeit von 3 Tagen gewählt.

Die Induktion der 293 Tet-Off Zellen, die HD Exon 1 mit 20, 51 oder 83 CAG-Repeats ins Genom integriert hatten, führte zur Expression der Huntingtinproteine HDQ20, HDQ51 und HDQ83 mit einer molekularen Masse von 20, 35 bzw. 45 kDa. Die Zelllinie, die nur den Vektor integriert hatte, exprimiert weder im induzierten noch im nicht-induzierten Zustand detektierbares Huntingtinprotein. Die 293 Tet-Off Zellen exprimieren also offensichtlich kein mittels Western Blot oder Immunfluoreszenz nachweisbares endogenes Huntingtin. Somit konnten alle weiteren beobachteten Effekte in den induzierten Zellen auf die Überexpression des HD Exon 1 Proteins zurückgeführt werden. In den nicht-induzierten HD Exon 1-exprimierenden Zellen ist im Vergleich zu den induzierten Zellen im Western Blot nur sehr wenig und in der Immunfluoreszenz kein immunreaktives monomeres Huntingtinprotein zu sehen, und aggregierte HDQ51 und HDQ83 Proteine sind in nicht-induzierten Zellen nicht nachweisbar. Das zeigt, daß die Proteinexpression in den nicht-induzierten Zellen auf jeden Fall zu gering ist, um die Bildung von Einschlusskörpern auszulösen.

Das Expressionsniveau in allen induzierten Zelllinien ist relativ hoch (vergleiche Abbildung 4, Spuren 3, 5 und 7 mit 4, 6 und 8), was frühere Berichte in der Literatur über die gute Regulierbarkeit des Tet-Off Systems bestätigt.

Die Produktion von HDQ51 und HDQ83 Protein, nicht jedoch die des HDQ20 Proteins, ist toxisch für die Zellen, wie im XTT-Test gezeigt wurde. Im Gegensatz zu HDQ20, das nicht aggregiert, bilden HDQ51 und HDQ83 cytoplasmatische Einschlusskörper, was den Schluß nahe legt, daß die Bildung von Einschlusskörpern toxisch ist. Diese enthalten aggregiertes,

ubiquitiniertes Huntingtin Exon 1 Protein mit einer fibrillären Morphologie. Strukturell gleichen sie den neuronalen Einschlusskörpern, die in den Gehirnen von HD Patienten (DiFiglia et al., 1997) und transgenen Mäusen (Davies et al., 1997) detektiert wurden. In Gehirngewebe von HD-Patienten werden neuronale, vorwiegend intranukleare Einschlusskörper gefunden, die ein N-terminales Huntingtinfragment noch nicht genau definierter Länge und teilweise auch Ubiquitin enthalten. In den transgenen Mäusen, die wie die Tet-Off Zellen HD Exon 1 Protein mit einer verlängerten Glutaminkette (141-157 CAG-Repeats) exprimieren, bilden sich die Einschlusskörper, die oft größer als der Nucleolus sind, ebenfalls im Kern. Dabei zeigt die Kernmembran häufig Einbuchtungen und weist eine erhöhte Dichte an Kernporen auf. Der Grund dafür, daß die Einschlusskörper in den Tet-Off Zellen im Gegensatz zu HD Patienten und transgenen Mäusen außerhalb des Kerns im Cytoplasma gebildet werden, ist nicht offensichtlich, könnte aber auf die massive Überproduktion der HD Exon 1 Proteine in den induzierbaren Tet-Off Zellen zurückzuführen sein. Dabei kann die für die Aggregation notwendige Konzentration der HD Exon 1 Proteine bereits auf ihrem Weg vom Ort der Synthese zum Kern erreicht werden und so zur vorzeitigen Aggregation der Proteine im Cytoplasma führen.

Wigley et al. (1999) haben gezeigt, daß das Centrosom oder eine damit eng verbundene Struktur eine Rolle beim Abbau von falsch gefalteten Proteinen in der Zelle spielt. In Colokalisationsstudien wurde gezeigt, daß sich am Centrosom neben der proteasomalen Maschinerie Hitzeschockproteine und Ubiquitin konzentrieren. Das Centrosom liegt perinuklear und ist benachbart zum Golgi-Apparat. In Untersuchungen, in denen die proteasomale Aktivität gehemmt und ein mutiertes CFTR überexprimiert wurde, konnte außerdem gezeigt werden, daß sich die Centrosomen-assoziierte Struktur vergrößert und sich große, perinukleare Einschlusskörper mit nicht-abgebautem Protein bilden (Johnston et al., 1998), die sogenannten „Aggresomen“. Säugetierzellen scheinen somit ein „Organell“ zu enthalten, das falsch gefaltete Proteine und Peptide, die für die Aggregation vorbestimmt sind, abgelagert. Da die Huntingtinproteine mit einer verlängerten Glutaminkette ebenfalls in der Nähe des Zellkerns abgelagert werden, wurde diese Hypothese anhand der 293 Tet-Off Zellen, die HDQ51 oder HDQ83 exprimieren, überprüft.

Colokalisationsstudien mit dem centrosomenspezifischen Protein γ -Tubulin zeigten, daß sich die perinuklearen Einschlusskörper aus aggregiertem HDQ83 Protein im Centrosom oder in dessen unmittelbarer Nähe befinden. Außerdem steigerte sich die Menge an ubiquitinierten HDQ51 Proteinaggregaten um den Faktor 2, wenn die Proteasomenaktivität mit Lactacystin inhibiert wurde. Das legt nahe, daß die Menge des Huntingtinproteins, das sich in den

Einschlußkörpern ansammelt, stark von der Aktivität des Proteasoms abhängig ist. Somit stimmen die Beobachtungen mit den 293 Tet-Off Zellen, die Huntingtinproteine mit einer verlängerten Glutaminkette exprimieren und diese als Einschlußkörper am oder in der Nähe des Centrosoms ablagern, mit den Beobachtungen überein, die bei mutiertem CFTR gemacht wurden (Wigley et al., 1999), (Johnston et al., 1998). Ausgehend vom Modell des „Aggresoms“ habe ich das Modell des „Degrasoms“ entwickelt. In diesem Modell, das in Abbildung 13 gezeigt ist, werden unter normalen Bedingungen falsch gefaltete zelluläre Proteine sowie normale und mutierte HD Exon 1 Proteinfragmente zum Degrasom transportiert, um dort nicht nur, wie im Modell des Aggresoms, abgelagert zu werden, sondern um proteolytisch verdaut und damit für die Zelle unschädlich gemacht zu werden. HD Exon 1 Protein mit einer Kette aus nur 20 Glutaminen ist löslich und kann mit Hilfe des Ubiquitin-Proteasom Systems, das im Degrasom anreichert ist, abgebaut werden. HD Exon 1 Proteine mit einer verlängerten Glutaminkette polymerisieren jedoch in unlösliche Fibrillen, die resistent gegen proteolytischen Abbau sind. Sobald sich die ersten Mikroaggregate und fibrillären Strukturen gebildet haben, reagiert die Zelle daraufhin mit der Rekrutierung von zusätzlichen Proteinen wie Ubiquitin, Hitzeschockproteinen und proteasomale Untereinheiten, die sich dann mit dem aggregierten Huntingtinprotein zusammenlagern. Die resultierenden Einschlußkörper enthalten außer aggregiertem Huntingtinprotein noch eine Vielzahl anderer Proteine wie z.B. BiP, 14-3-3 ϵ , α -Synuclein und die 19S, 20S und 11S-Untereinheiten des Proteasoms (Abbildungen 7, 9 und 10). Das legt nahe, daß die sich anhäufenden Huntingtinfibrillen die proteasomale Aktivität inhibieren und damit die normale zelluläre Stressantwort auf ein falsch gefaltetes Protein blockieren. So häufen sich nach einer bestimmten Zeitspanne zusätzlich zu den mutierten Huntingtinfragmenten noch andere falsch gefaltete, zelluläre Proteine, die normalerweise vom Degrasom abgebaut werden, an. Nach 5 bis 7 Tagen der Induktion der HDQ83 Expression finden sich beispielsweise noch Polypeptide wie Amyloid- β oder Presenilin-1 in den perinuklearen Einschlußkörpern. Die Umverteilung der cytoplasmatischen Hitzeschockproteine Hsp40 und Hsp70 und des Intermediärfilaments Vimentin sind eine weitere Reaktion auf die Anhäufung der unlöslichen Huntingtinfibrillen. Man kann vermuten, daß die Zelle nach einer gewissen Zeit „erkennt“, daß sie den Kampf gegen die sich anhäufenden Proteinaggregate verlieren wird und beginnt, diese von ihrer natürlichen Umgebung abzukapseln. Die Umhüllung der Huntingtinaggregate durch das Intermediärfilament Vimentin könnte Teil einer solchen Strategie sein.

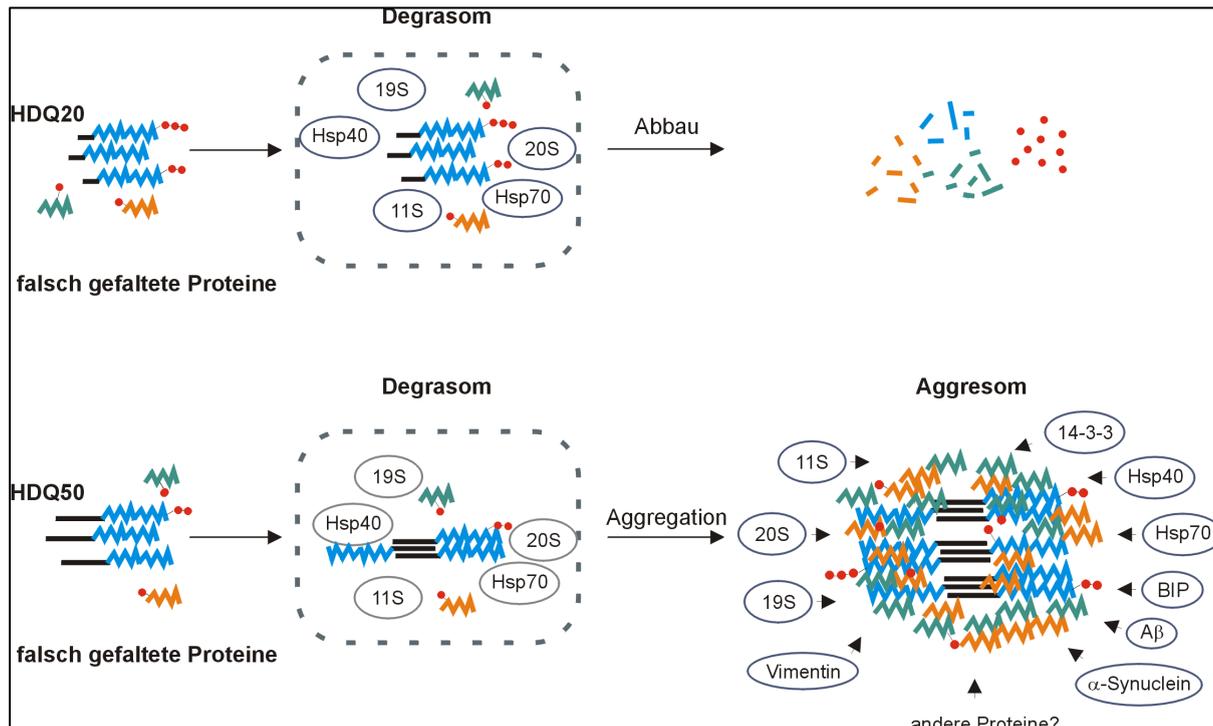


Abbildung 13. Modell für die Bildung von perinuklearen Einschlusskörpern.

Oben: falsch gefaltete Proteine, einschließlich N-terminale Huntingtinfragmente mit 20 Glutaminen (HDQ20, blau), werden ubiquitiniert (rote Kreise) und in einem hypothetischen Organell, dem Degrasom, das die proteasomalen Untereinheiten 11S, 19S und 20S sowie die Hitzeschockproteine Hsp40 und Hsp70 enthält, abgebaut. Unten: Huntingtinfragmente mit 51 Glutaminen (HDQ51, blau) bilden unlösliche Aggregate, die der Proteolyse widerstehen und sich im Degrasom anhäufen. Als Antwort werden weitere Proteine wie die potentiellen Chaperone BiP und 14-3-3 ϵ , α -Synuclein, A β und vermutlich viele andere rekrutiert und mit Vimentin umhüllt. Dabei bilden sie das Aggresom.

Die vorliegenden Befunde zeigen jedoch, daß die Zelle unter den hier erfolgten experimentellen Bedingungen diesen Kampf verliert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß der Vorgang der Aggregation den normalen zellulären Aufbau dramatisch verändert (Abbildung 11). So verändert die Einschlusskörperbildung nicht nur die Form des benachbarten Zellkerns, sondern zerstört teilweise sogar die Kernhülle. Weiterhin werden Mitochondrien in das Areal gezogen, das die Einschlusskörper umgibt; es scheint, als ob sie von den fibrillären Strukturen eingefangen würden. Die Gründe für die Anreicherung von Mitochondrien rund um die Einschlusskörper sind unklar. Es ist bekannt, daß Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Aktivierung spezifischer apoptotischer Wege spielen. Als einer der ersten Ereignisse bei der durch den Tumornekrosefaktor ausgelösten Apoptose werden sie z.B. in der perinuklearen Region angehäuft (Desagher and Martinou, 2000). Weiterhin gibt es Hinweise, daß eine Dysfunktion der Mitochondrien mit der Pathogenese von neurodegenerativen Krankheiten wie Huntington Disease einhergeht (Beal, 2000). Es ist möglich, daß sich die Mitochondrien in der Nähe der Einschlusskörper

anreichern, um das Ubiquitin-Proteasom-System, das versucht, die aggregierten Huntingtinproteine abzubauen, mit zusätzlichem ATP zu versorgen. Der Energiehaushalt von Zellen mit Einschlusskörpern muß aber näher erforscht werden, um dieses Erscheinungsbild zu verstehen.

Die Anreicherung der Proteine BiP, 14-3-3 ϵ , α -Synuclein und TIA-1 in den Einschlusskörpern zählt zu den ersten Antworten einer Zelle auf Streß. Es gibt Hinweise, daß BiP, 14-3-3 und α -Synuclein als Chaperone wirksam sind (Bonifacino and Weissman, 1998), (Shaw, 2000), (Souza et al., 2000), während TIA-1 als ein stressinduziertes, RNA-bindendes Protein charakterisiert worden ist (Kedersha et al., 1999). Chaperone binden an falsch gefaltete Polypeptide und verringern dadurch deren Aggregationsbildung (Hartl, 1996). In diesem Fall könnten sich die Chaperone in den Einschlusskörpern anhäufen, um falsch gefaltete Proteine neu zu falten oder um die Polypeptide komplett für ihren effizienten Abbau zu entfalten. Daß sich das Bindeprotein BiP, ein Chaperon des endoplasmatischen Retikulums, an die Einschlusskörpern anlagert, war unerwartet. Normalerweise assoziiert BiP mit falsch gefalteten Proteinen im Lumen des endoplasmatischen Retikulums und verhindert dadurch die Ausschleusung dieser Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. Der retrograde Transport dieses Proteins vom endoplasmatischen Retikulum ins Cytosol wurde noch nicht gezeigt. Möglicherweise wird BiP mit Hilfe des Sec61 Proteinkomplexes (Plempner et al., 1997) ins Cytoplasma transportiert, oder aber befindet sich dort, weil die Huntingtinfibrillen die Membran des endoplasmatischen Retikulums unterbrochen und dadurch für BiP durchlässig gemacht haben.

Für α -Synuclein wurde gezeigt, daß es zum Teil homolog zur 14-3-3 Proteinfamilie ist und an diese bindet (Ostrerova et al., 1999). Außerdem bindet es ebenfalls an andere 14-3-3-bindende Proteine, wie zum Beispiel die Proteinkinase C und BAD, ein Bcl-2 Homolog, das den apoptotischen Zelltod reguliert. Es interagiert jedoch nicht mit allen 14-3-3-bindenden Proteinen, so daß die Bindung von α -Synuclein an seine Partner unabhängig von seiner Assoziation mit 14-3-3 geschieht. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß α -Synuclein und die 14-3-3 Proteine als Chaperone fungieren können (Souza et al., 2000). In anderen Untersuchungen wurde ebenfalls die Beteiligung dieser Proteine in Signaltransduktionswegen sowie bei der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten wie Parkinson, Alzheimer und Chorea Huntington nachgewiesen (Polymeropoulos et al., 1997), (Layfield et al., 1996), (Charles et al., 2000). Bei Chorea Huntington wurde α -Synuclein in den Einschlusskörpern mit aggregiertem, ubiquitinierten Huntingtinprotein sowohl in Patienten als auch transgenen Mausmodellen nachgewiesen, was nahe legt, daß die Rekrutierung von α -Synuclein in die

Einschlußkörper vielleicht den Krankheitsverlauf beeinflusst (Charles et al., 2000). Daß α -Synuclein ebenfalls in dem 293 Tet-Off Zellkulturmodell mit HDQ83 in den Einschlußkörpern nachgewiesen werden konnte (Abbildung 10), ist im Einklang mit den *in vivo* Befunden.

Normales und mutiertes α -Synuclein wurde ebenfalls in den „Lewy“ Körpern von Parkinson Patienten gefunden. In genetischen Studien wurden auch Punktmutationen im α -Synuclein-Gen identifiziert, die eine familiäre, vererbare Form der Parkinson Krankheit auslösen und die die Aggregation von α -Synuclein verstärken (Polymeropoulos et al., 1997), (Conway et al., 1998). Für die Alzheimer Krankheit wurde berichtet, daß sich 14-3-3 Proteine an das neurofibrilläre Gewirr (NFT) anlagern, das aus dem hyperphosphorylierten, Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau besteht (Layfield et al., 1996). Tau wird zumindest teilweise von der Kinase p42 aus der Mitogen-aktivierten Proteinkinasefamilie (MAP-Kinasefamilie) phosphoryliert (Drewes et al., 1992). 14-3-3 Proteine sind im Gehirn hoch exprimiert und spielen eine zentrale Rolle in der Signalkaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (Xing et al., 2000). Sie werden als anti-apoptotische Faktoren betrachtet, da sie unter anderem die Aktivierung der MAP-Kinase p38 inhibieren. 14-3-3 Proteine binden an ihre Zielproteine in Abhängigkeit von deren Phosphorylierung an spezifischen Serin/Threonin Resten (Aitken, 1996). 14-3-3 bindet ebenfalls an phosphoryliertes Vimentin (Tzivion et al., 2000). Weiterhin wurde die Assoziation von 14-3-3 Proteinen mit dem Centrosom gezeigt (Pietromonaco et al., 1996). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die 14-3-3 Proteine intrazelluläre Signalkaskaden mit der Proteindegradationsmaschinerie am Centrosom verbinden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, ob die 14-3-3 Proteine ebenso bei HD Patienten in den cytoplasmatischen oder intranuklearen Einschlußkörpern angereichert sind.

Das Protein TIA-1 ist eine weitere Komponente der perinuklearen Einschlußkörper in den 293 Tet-Off Zellen, die HDQ83 exprimieren (Abbildung 10, d-f). TIA-1 bindet an poly(A)⁺ RNA und pendelt normalerweise zwischen Kern und Cytoplasma. Damit ist es vielleicht an dem Transport von mRNA zwischen Kern und Cytoplasma beteiligt. Kürzlich wurde in COS-Zellen gezeigt, daß TIA-1 und sein Homolog TIAR den translationalen Stillstand regulieren, der mit Streß aus der Umgebung verbunden ist (Kedersha et al., 1999). Nach Streßinduktion rekrutieren die beiden Proteine untranslatierte mRNA zu abgegrenzten, cytoplasmatischen Zentren, den sogenannten Streßgranula. Dadurch wird die Translationsinitiation dieser mRNAs verhindert. Sie werden jedoch nicht abgebaut, und die Synthese der Proteine kann später wieder aufgenommen werden. TIA-1 und TIAR können somit nicht nur die Translation zum Stillstand bringen, sondern ebenfalls die Dauer des streßinduzierten translationalen

Stillstands bestimmen. Als weiteren Beweis für diese Hypothese konnte in Mausmodellen gezeigt werden, daß TIA-1 die Expression des Tumornekrosefaktors α unterdrückt (Piecyk et al., 2000). Durch die Kontrolle des translationalen Stillstands könnten TIA-1 und TIAR festlegen, ob gestreßte Zellen weiterleben und den streßinduzierten Schaden beheben, oder ob sie letztlich durch Apoptose sterben. Der Grund für die Anhäufung von TIA-1 in HD Exon 1 Proteinaggregaten ist noch unklar. Es wäre interessant zu untersuchen, ob zusätzlich zu TIA-1 ebenfalls mRNAs in den Einschußkörpern angereichert sind. Eine streßinduzierte Anhäufung von mRNAs könnte die Expression der Proteine in Säugetierzellen entscheidend beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist eine Studie erwähnenswert, in deren Rahmen Veränderungen im Expressionsmuster von etwa 6000 striatalen mRNAs in Abhängigkeit von einer verlängerten Polyglutaminkette im Huntingtinprotein bei transgenen Mäusen untersucht wurden (Luthi-Carter et al., 2000). Verschiedene Neurotransmitterrezeptoren und Proteine, die bei der Calciumregulation eine Rolle spielen, sind in Mäusen mit dem mutierten Huntingtinprotein im Vergleich zu Mäusen mit dem normalen Huntingtinprotein vermindert. Bemerkenswert ist weiterhin, daß die Expression der proteasomalen Untereinheit P28 α in transgenen Mäusen ansteigt.

Es gab in den letzten Jahren mehrere voneinander unabhängige *in vitro* und *in vivo* Studien, die gezeigt haben, daß die Bildung von intranuklearen Einschußkörpern aus Proteinen mit einer verlängerten Polyglutaminkette nicht toxisch oder sogar nützlich für Säugetierzellen ist. So konnte für das Protein Ataxin-1 gezeigt werden, daß transgene Mäuse mit einem mutierten Ataxin-1 Protein, in dem eine funktionelle Kernlokalisierungsstelle mutiert wurde, keine Aggregate im Kern bilden und ebenso keinen Krankheitsphänotyp entwickeln. Wenn Ataxin-1 Protein mit einer verlängerten Polyglutaminkette im Cytoplasma exprimiert wird und auch nur dort verbleibt, ist es weder pathogen noch aggregiert es (Klement et al., 1998). Saudou et al. (Saudou et al., 1998) haben in Zellkulturmodellen mit dem Huntingtin Protein gezeigt, daß die Bildung von intranuklearen Einschußkörpern allein nicht ausreicht, um Zelltod zu induzieren. Hier wurde sogar die Hypothese aufgestellt, daß die intranuklearen Einschußkörper Teil einer zellulären Strategie sein könnten, mit der toxische Formen von Huntingtin abgebaut oder inaktiviert werden können, und daß die Einschußkörper daher die Zelle vor schädlichen Einflüssen des mutierten Huntingtins schützen.

Die Ergebnisse der 293 Tet-Off stabilen, induzierbaren, Huntingtin-exprimierenden Zelllinien, die hier untersucht wurden, unterstützen diese Resultate nicht. Hier wird im Gegenteil gefunden, daß die Entstehung der Einschußkörper mit einer signifikanten Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen einhergeht. So ist die Lebensfähigkeit der Zellen,

die HD Exon 1 mit 51 und 83 Glutaminen exprimieren, um ~ 40% bzw ~60% im Vergleich zu Zellen, die HD Exon 1 mit nur 20 Glutaminen exprimieren, herabgesetzt (Abbildung 12). Der molekulare Mechanismus, durch den die Aggregatbildung Toxizität verursacht, ist nicht klar. Die hier gezeigten Daten legen jedoch nahe, daß die Bildung der unlöslichen, fibrillären Strukturen die proteasomale Aktivität beeinträchtigt. So ist es zwar möglich, daß die regulatorischen Untereinheiten des 26S Proteasoms, 19S und 11S, das falsch gefaltete HD Exon 1 Protein erkennen und binden. Aufgrund ihrer speziellen fibrillären Struktur können die ubiquitinierten, Polyglutamin-enthaltenden Proteine aber nicht ausreichend abgebaut werden. Das hätte zur Folge, daß die Freisetzung von Ubiquitinmolekülen von den Huntingtinfibrillen durch die zellulären Deubiquitinierungsenzyme blockiert ist. Das könnte längerfristig zu einer Verminderung des freien Ubiquitins in der Zelle führen, besonders dann, wenn die Menge des unlöslichen HD Exon 1 Proteins in der Zelle ansteigt. Andere, für den proteasomalen Abbau bestimmte Polypeptide könnten so unter Umständen nicht mehr mit einer Ubiquitinsequenz für die Degradation markiert werden. Da bekannt ist, daß eine der wichtigsten Funktionen des Proteasoms der rasche Abbau von Ubiquitin-markierten, kurzlebigen falsch gefalteten Proteinen ist (Voges et al., 1999), könnte die Bildung von HD Exon 1 Proteinaggregaten somit indirekt zu einer Anhäufung bestimmter regulatorischer Proteine führen (zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, Onkoproteine, Tumorsuppressoren und Enzyme), die möglicherweise sehr toxisch für Säugetierzellen sind.

Aufgrund der Ergebnisse des hier vorgestellten Zellkulturmodells ergeben sich Ansatzpunkte für eine mögliche therapeutische Strategie gegen HD und ähnliche Polyglutaminkrankheiten. Wenn es gelingt, die Huntingtin Aggregation durch kleine Moleküle oder Peptide zu inhibieren (Heiser et al., 2000) oder die natürliche Beseitigung von bereits angehäuften Krankheitsprotein zu stimulieren, könnte dieses eine effektive Therapie gegen neurodegenerative Krankheiten sein. Ebenso könnte die Reduktion der zellulären Konzentration von mutiertem Huntingtin durch Antisense-Oligonucleotide oder Ribozyme den Krankheitsverlauf verlangsamen. In Hefe- und Säugetierzellen konnte bereits gezeigt werden, daß die Überexpression der Hitzeschockproteine Hsp40 und Hsp70 die Bildung der HD Exon 1 Aggregate inhibiert (Muchowski et al., 2000), (Sittler et al., 2001). Werden transient transfektierte COS-Zellen, die ein HD Exon 1 Protein mit einer verlängerten Polyglutaminkette exprimieren, mit bestimmten chemischen Substanzen wie z.B. Congo Rot oder Thioflavin S behandelt, wird die Aggregation der HD Exon 1 Proteine ebenfalls verzögert oder gar verhindert (Heiser et al., 2000). Somit gibt es also bereits erste Hinweise, daß die direkte Inhibierung der Aggregation durch kleine Moleküle oder die indirekte

Inhibierung durch Stimulierung der Hitzeschockantwort eine mögliche Strategie hinsichtlich einer Therapie gegen HD und verwandte Polyglutaminkrankheiten sind. Als weitere Möglichkeit einer Therapie könnten vielleicht chemische Substanzen gefunden werden, die den Ubiquitin-ATP-abhängigen Proteinabbau in der Zelle selektiv aktivieren und dadurch die Anhäufung von mutiertem Huntingtinprotein in Säugetierzellen verhindern.