

9. Zusammenfassung

Chorea Huntington (HD) ist eine vererbte, fortschreitend verlaufende neurodegenerative Krankheit, die durch eine verlängerte Polyglutaminkette am N-Terminus des Proteins Huntingtin verursacht wird. Der Pathomechanismus von HD sowie die normale Funktion von Huntingtin sind unklar. HD Exon 1 Proteine mit einer Glutaminkettenlänge im krankhaften Bereich (> 37 Glutamine) bilden *in vitro* Proteinaggregate. Außerdem wurde die Anhäufung von unlöslichen, Polyglutamin-enthaltenden Proteinaggregaten in Hirnen von HD transgenen Mäusen und Patienten detektiert, was zu der Hypothese führte, daß HD durch die Bildung von Proteinaggregaten in neuronalen Einschußkörpern verursacht wird. Um die Aggregation von Huntingtin genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit stabile, induzierbare 293 Tet-Off Zelllinien hergestellt, die HD Exon 1 Proteine mit 20, 51 und 83 Glutaminen produzieren. In diesem Zellmodell bilden Huntingtin Exon 1 Proteine mit einer Glutaminkettenlänge im krankhaften Bereich (51 und 83 Glutamine), aber nicht mit einer Kettenlänge im normalen Bereich (20 Glutamine), perinukleare Einschußkörper. Diese Strukturen enthalten aggregiertes, ubiquitiniertes Huntingtin Exon 1 Protein mit einer fibrillären Morphologie. Die Einschußkörper werden an Centrosomen gebildet und von dem Intermediärfilament Vimentin umhüllt. Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie zeigten, daß die 20S, 19S und 11S Untereinheiten des 26S Proteasoms, die molekularen Chaperone BiP, Hsp70 und Hsp40 sowie das RNA-bindende Protein TIA-1, das potentielle Chaperon 14-3-3 und α -Synuclein mit den perinuklearen Einschußkörpern colokalisieren. Die Inhibierung der proteasomalen Aktivität führte zu einem zweifachen Anstieg der Aggregatmenge, was zeigt, daß sich die Einschußkörper anhäufen, wenn die Kapazität des Ubiquitin-Proteasom Systems erschöpft ist. In den 293 Tet-Off Zellen führte die Bildung der Einschußkörper auch zu Zelltoxizität und ultrastrukturellen Veränderungen wie Einbuchtungen und Unterbrechungen in der Kernmembran. Zusammengekommen legen diese Befunde nahe, daß HD Exon 1 Fragmente unter normalen Bedingungen vom Proteasom abgebaut werden. HD Exon 1 Fragmente mit einer langen Polyglutaminkette polymerisieren jedoch und widerstehen dem Abbau; sie rekrutieren sogar noch zusätzliche Proteine zu den Einschußkörpern und bilden das „Degrasom“.

Um etwas über die normale Funktion von Huntingtin zu erfahren, haben wir mit dem Hefe Two-Hybrid System nach Huntingtin-interagierenden Proteinen gesucht und dabei das Huntingtin interagierende Protein 1 (HIP1) identifiziert. Hier wird gezeigt, daß HIP1 ein Multidomänenprotein ist, das eine N-terminale ENTH-Domäne, eine zentrale coiled-coil-

bildende Region und eine C-terminale Actin-bindende Domäne enthält. Mittels Affinitätschromatographie wurden drei HIP1 assoziierte Proteine identifiziert: die schwere Kette von Clathrin, α -Adaptin A und C. *In vitro* Bindungsstudien zeigten, daß die zentrale coiled-coil-bildende Domäne für die Interaktion von HIP1 mit Clathrin benötigt wird, während DxF-Motive, die vor dieser Domäne liegen, für die Bindung von HIP1 an die C-terminale „Appendage“-Domäne von α -Adaptin A und C wichtig sind. Die Expression des vollständigen HIP1 in Säugetierzellen ergab eine punktförmige, cytoplasmatische Immunfärbung, die für Clathrin-bedeckte Vesikel charakteristisch ist. Wenn ein verkürztes HIP1 Protein überexprimiert wurde, das die DxF-Motive und die coiled-coil Domäne enthält, wurden jedoch große, perinukleare vesikelartige Strukturen beobachtet, die HIP1, Huntingtin, Clathrin und internalisiertes Transferrin enthielten, was darauf hinweist, daß HIP1 ein endocytotisches Protein ist. Die strukturelle Vollständigkeit von HIP1 scheint somit für die Erhaltung der Vesikelgröße *in vivo* entscheidend zu sein.