

1. Einleitung

Chorea Huntington

Chorea Huntington (HD), auch erblicher Veitstanz genannt, ist eine progressiv verlaufende neurodegenerative Erkrankung, die autosomal dominant vererbt wird. Die Krankheit bricht meist zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr aus und führt innerhalb von 10-20 Jahren zum Tod. Weltweit tritt HD mit einer Prävalenz von 5-10 Fällen pro 100 000 Menschen auf. HD ist durch den zunehmenden Verlust der motorischen Kontrolle und der intellektuellen Fähigkeiten gekennzeichnet. Typische HD-Symptome sind tänzelnde oder torkelnde Bewegungen (Chorea), Hyperkinese, Persönlichkeitsveränderungen, Gewaltbereitschaft, Depressionen, Wahnvorstellungen und Demenz (Bates et al., 2002). Atrophien im Bereich des cerebralen Kortex und der Basalganglien sind charakteristische pathologische Befunde bei HD-Patienten. Besonders im Striatum, einem Teil der Basalganglien, lässt sich die Degeneration mittelgroßer, dornenbesetzter enkephaliner/ GABAerger Neuronen nachweisen (Vonsattel et al., 1985). Der motorische Kortex wird durch den Verlust dieser Neuronen verstärkt erregt und löst somit die unkoordinierten choreatischen Bewegungen der Patienten aus. Derzeit gibt es keine kausale Therapie für HD, es können lediglich die Symptome durch die Verabreichung von Antidepressiva, Dopaminblockern oder Neuroleptika gelindert werden (Bates et al., 2002). Daneben werden auch Caspase-Inhibitoren und Substanzen zur Verringerung der Glutamatfreisetzung eingesetzt, die ebenfalls die klinische Symptomatik von HD verringern können (Gardian and Vecsei, 2004).

Im Jahre 1872 beschrieb George Huntington erstmalig HD, und 1993 wurde das der Krankheit zu Grunde liegende Gen, *IT15*, identifiziert (HDCRG, 1993). *IT15* liegt am Ende des kurzen Arms von Chromosom 4, umfasst etwa 210 kb (67 Exons) und besitzt am 5'-Ende des ersten Exons eine polymorphe CAG-Trinukleotidsequenz. Bei HD wird dieses CAG-Triplett, das die Aminosäure Glutamin kodiert, abnormal häufig wiederholt. Die Expression des *IT15*-Gens führt zur Synthese von Huntingtin (Htt), einem ca. ~348 kDa großen Protein mit N-terminaler Polyglutaminkette. Bei HD-Patienten besteht diese Kette aus 38 bis 182 Glutaminresten während bei nicht betroffenen Menschen nur 8 bis 36 Glutamine vorliegen (Rubinsztein et al., 1996; Sathasivam et al., 1997). Der Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs korreliert invers mit

der Anzahl der Glutaminwiederholungen. Eine juvenile Form von HD kann schon im Kindesalter bei mehr als 50 Glutaminwiederholungen auftreten (Bates et al., 2002).

Polyglutaminwiederholungen als Ursache von mehreren neurodegenerativen Erkrankungen

Neben HD gibt es noch weitere Krankheiten, denen eine Polyglutaminexpansion zu Grunde liegt. Dazu zählen z.B. die dentatorubrale-pallidolysiale Atrophie (DRPLA), die spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA, „Kennedy-Disease“) und die spinocerebellären Ataxien (SCA) 1, 2, 3, 6, 7 und 17. Auffällig bei all diesen Krankheiten ist, dass sich ihre klinischen Symptome sehr ähneln und dass ein selektiver Verlust von spezifischen Neuronen auftritt (Bates et al., 2002). Anhand eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte Glutaminsequenz in einem Protein, das nicht direkt mit einer Polyglutamin-Erkrankung assoziiert ist, auch Neurodegeneration hervorrufen kann (Ordway et al., 1997). Diese Befunde führten zu der Annahme, dass allein ein durch die Polyglutaminverlängerung bedingter dominanter Effekt („gain of function“) und nicht die funktionelle Beeinträchtigung der jeweiligen betroffenen Proteine („loss of function“) entscheidend für die Entstehung dieser Krankheiten ist (Perutz, 1999).

Das Protein Huntingtin

In den letzten 12 Jahren konnte die Funktion von Htt in der Zelle noch nicht eindeutig geklärt werden. Ein Grund hierfür ist sicherlich die geringe Sequenzhomologie von Htt zu anderen bekannten Proteinen. Htt weist trotz seiner Größe von 348 kDa nur 3 charakterisierte Proteindomänen auf (Abbildung 1). Es besitzt eine N-terminale Polyglutamindomäne (PolyQ), eine anschließende Prolin-reiche Region (PolyP) und drei HEAT-Domänen (Andrade and Bork, 1995; Neuwald and Hirano, 2000). Proteine mit einer SH3- oder einer WW- Domäne können über die PolyP-Sequenz mit Htt interagieren. Die HEAT-Domänen bilden hydrophobe α -Helices aus, an die einige der bekannten Interaktionspartner von Htt binden. Neben den genannten

Proteindomänen wurden noch drei potentielle Caspase-Schnittstellen bei den Asparataten D513, D530 und D586 identifiziert, die für eine proteolytische Abspaltung von N-terminalen Htt-Fragmenten in Frage kommen (Wellington et al., 2000). Vergleicht man die Proteinsequenz von Htt zwischen verschiedenen Arten, so zeigt sich, dass Htt mit Ausnahme der PolyQ- und der PolyP-Sequenz phylogenetisch hoch konserviert ist (Harjes and Wanker, 2003). Htt ist essentiell für die Embryonalentwicklung, denn Htt knock-out Mäuseembryos sterben bereits nach 7,5 Tagen mit schweren Störungen bei der Ausbildung des Ektoderms (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; White et al., 1997; Zeitlin et al., 1995). Htt wird ubiquitär im Körper exprimiert, wobei die höchsten Expressionsraten im Gehirn und in den Hoden auftreten (Trottier et al., 1995). Während Htt normalerweise als cytoplasmatisches Protein in der Zelle vorliegt, kann seine mutierte Form sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma vorkommen (Gutekunst et al., 1995; Sharp et al., 1995; Vonsattel et al., 1985).

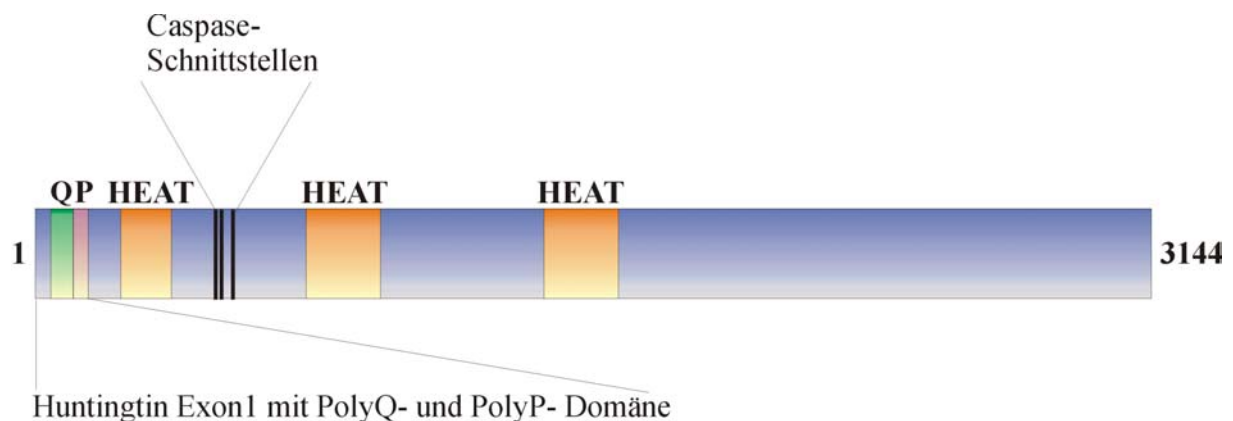


Abbildung 1: Struktur von Htt.

Entstehung von Huntingtin Aggregaten

Die Expression von mutiertem Htt führt *in vivo* zur Bildung von unlöslichen Protein Aggregaten. In transgenen Mäusen, die ein Htt-Exon1 Protein mit 118-156 Glutaminen exprimieren (R6/2 Mauslinie), konnten Htt-Aggregate als ubiquitinierte neuronale Einschlusskörper nachgewiesen werden (Bates et al., 1997; David et al., 1997). Die Bildung der Einschlusskörper ging dabei der Entwicklung von Symptomen voraus. Bei verstorbenen HD-Patienten wurden derartige Einschlusskörper sowohl im

Cytoplasma als auch im Zellkern von Neuronen gefunden. Diese humanen Einschlusskörper bestanden hauptsächlich aus N-terminalen Htt-Fragmenten, die wahrscheinlich durch Spaltung von mutiertem Htt mit Caspasen oder anderen Proteasen entstanden sind (DiFiglia, 1997; Gutekunst et al., 1999; Sieradzan et al., 1999).

Dass polyglutaminhaltige Peptidsequenzen eine starke Tendenz zur Bildung von Aggregaten haben, wurde bereits 1994 von Max Perutz vorausgesagt. Nach seinem Modell für die polyglutaminabhängige Aggregation, falten sich Polyglutaminsequenzen mit mehr als 40 Glutaminen zu antiparallelen β -Strängen zusammen und bilden polare „Zipper“, die sich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Haupt- und Seitenketten stabilisieren (Perutz et al., 1994). Diese polaren „Zipper“ können sich entweder direkt linear oder über oligomere Zwischenprodukte aneinander lagern und Protofibrillen mit stabiler β -Faltblattstruktur bilden. Durch Bündelung von Protofibrillen entstehen die eigentlichen Fibrillen, die sich schließlich zu größeren Aggregaten zusammenlagern können (Perutz et al., 1994; Perutz et al., 2002). Dieses Modell konnte durch *in vitro* Experimente bestätigt werden (Scherzinger et al., 1997). Aufgereinigtes Htt-Exon1 Protein mit mehr als 37 Glutaminen bildete SDS-unlösliche, hitzebeständige (96 °C) Proteinaggregate mit mikroskopisch sichtbarer fibrillärer Struktur, wohingegen ein vergleichbares Protein mit weniger als 32 Glutaminen löslich war. *In vitro* ist der Prozess der Htt-Aggregation konzentrations- und zeitabhängig. Er verläuft nach einem keimabhängigen Polymerisationsmodell, da die Zugabe von vorgeformten Htt-Fibrillen die für die initiale Keimbildung notwendige Zeitspanne (Lag-Time) eliminiert und somit Aggregation beschleunigt (Scherzinger et al., 1999).

Ursachen der Toxizität bei Chorea Huntington

Obwohl der Mechanismus der Htt-Aggregation im Wesentlichen aufgeklärt ist, konnte die kausale Beziehung zwischen dem Auftreten von Aggregaten und dem selektiven Absterben von Neuronen bislang noch nicht eindeutig geklärt werden.

Nach der Entdeckung von intrazellulären Htt-Aggregaten wurde zunächst vermutet, dass sie das eigentlich toxische Agens bei HD sind. In der Zelle werden Htt-Aggregate nur unzureichend degradiert, obwohl sie ubiquitiniert und häufig mit Untereinheiten des Proteasoms, das normalerweise Ubiquitin-markierte Proteine

abbaut, assoziiert sind (Bence et al., 2001; Waelter et al., 2001a). Die Gründe hierfür liegen wahrscheinlich in der Unfähigkeit des eukaryotischen Proteasoms, Peptide mit einer Kette von 9-29 Glutaminen zu spalten, und in der Inhibierung des Proteasoms durch Proteinfragmente mit mehr als 35 aufeinanderfolgenden Glutaminen (Holmberg et al., 2004; Venkatraman et al., 2004). In Säugetierzellen, die Htt-Exon1 Fragmente mit einer pathogenen Polyglutaminsequenz (>36) exprimierten, konnte eine Blockierung der proteosomalen Aktivität und eine Akkumulierung von Htt-Aggregaten nachgewiesen werden (Bence et al., 2001; Waelter et al., 2001a). In Zellen mit einer Anhäufung von Htt-Aggregaten wurden erhöhte Zelltoxizität und ultrastrukturelle Veränderungen, wie Einbuchtung und Unterbrechung der Kernmembran, festgestellt (Waelter et al., 2001a). Als entscheidend für die Toxizität von aggregierten polyglutaminhaltigen Peptiden erwies sich ihre zelluläre Lokalisation. Treten die Aggregate im Kern von Säugetierzellen auf, so induzieren sie den Zelltod (Apoptose), befinden sie sich jedoch im Cytoplasma, so sind sie scheinbar nicht toxisch (Chen et al., 2001; Yang et al., 2002). Ungeklärt ist aber weiterhin die Frage, wie die polyglutaminhaltigen Aggregate bzw. N-terminalen Htt-Fragmente vom Cytoplasma in den Zellkern gelangen. Kürzlich wurde das nukleare Transporter-Protein Trp identifiziert, das normale, nicht aber mutierte, N-terminale Htt-Fragmente vom Zellkern ins Cytoplasma transportiert. Dies könnte die Akkumulation von mutierten Htt-Fragmenten und die Bildung von toxischen Aggregaten im Zellkern erklären (Cornett et al., 2005).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen Studien, die den Htt-Aggregaten sogar eine neuroprotektive Rolle in der Zelle zuschreiben. Im Kern von striatalen Neuronen induzierte mutiertes Htt Apoptose, jedoch wiesen Zellen mit Htt-Aggregaten eine höhere Überlebensrate auf als Zellen ohne Htt-Aggregate (Saudou et al., 1998). Der neuroprotektive Effekt von Htt-Aggregaten korrelierte mit der Reduzierung von diffus verteiltem mutierten Htt (Arrasate et al., 2004).

Die kontroversen Ergebnisse, dass Htt-Aggregate einerseits toxisch andererseits zugleich neuroprotektiv für Zellen sein sollen, weisen darauf hin, dass möglicherweise Zwischenprodukte, die während des Aggregationsprozesses von Htt entstehen, primär toxisch sind (Poirier et al., 2002; Ross et al., 2003). Solche Zwischenprodukte können z.B. globuläre Intermediate oder Htt-Oligomere sein. In der Zelle können diese Zwischenprodukte durch vollständige Aggregation zum Endprodukt eliminiert werden, wodurch sich dann der neuroprotektive Effekt von Htt-Aggregaten erklären

ließe. Substanzen, die die Bildung von toxischen Zwischenprodukten bei der Aggregation verhindern oder deren Toxizität reduzieren, müssten also einen neuroprotektiven Effekt aufweisen. Eine solche Substanz ist der Farbstoff Kongorot. In Gegenwart von Kongorot ist die Htt-Aggregation sowie die Bildung von toxischen Zwischenprodukten gehemmt (Heiser et al., 2000; Poirier et al., 2002). Der neuroprotektive Effekt von Kongorot konnte in Zellkulturexperimenten belegt werden. Auch bei symptomatischen R6/2 Mäusen konnte eine Linderung des Krankheitsverlaufes durch die Behandlung mit Kongorot erzielt werden (Sanchez et al., 2003).

Neben der Htt-Aggregation werden auch mitochondriale Defekte und Exzitotoxizität als Ursachen für den selektiven neuronalen Zelltod bei HD vermutet (Bates et al., 2002; Beal and Ferrante, 2004). Unter Exzitotoxizität versteht man die Induktion des neuronalen Zelltodes durch abnorm hohe Dosen von Glutamat (Greene and Greenamyre, 1996; Olney et al., 1971). Glutamat erregt AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren und ist damit der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter. Verschiedene Versuche weisen darauf hin, dass Exzitotoxizität auch bei HD eine Rolle spielt. Die Injektion von Glutamat-Agonisten in Rattengehirne verursachte striatale Läsionen und andere neuropathologische Charakteristika von HD (Beal et al., 1993). Zellkulturexperimente zeigten, dass striatale Neuronen eine erhöhte Anfälligkeit gegen NMDA-Agonisten besitzen und dass mutiertes Htt die Sensitivität von NMDA-Rezeptoren erhöht, wodurch Exzitotoxizität induziert wird (Cepeda et al., 2001). Bei HD trägt vermutlich auch eine Störung der mitochondrialen Funktion zur Pathogenese bei. In HD-Patienten ist die Konzentration von ATP auffällig reduziert, was auf eine Fehlfunktion der Mitochondrien hinweist. In der Atmungskette ist der Elektronentransport im Komplex II und III bei HD gestört, wodurch es zu einem erhöhten Ca^{2+} Einstrom und einer verringerten ATP-Produktion in den Mitochondrien kommt. Mitochondriale Toxine wie z.B. 3-Nitropropionsäure verursachen ebenso wie Glutamat-Agonisten, striatale Läsionen und führen zu neuropathologischen HD-Symptomen bei Primaten wie auch bei Nagetieren (Beal et al., 1993; Brouillet and Hantraye, 1995).

Theorien über den Pathomechanismus bei Chorea Huntington

Aktuell werden zwei Theorien diskutiert, wie verlängerte Polyglutaminsequenzen zum Pathomechanismus von HD beitragen. Die „*gain of function*“ Theorie geht davon aus, dass mutiertes Htt durch die Polyglutaminverlängerung eine oder mehrere Funktionen hinzugewinnt, die relevant für die Krankheitsentstehung sind. Der auffälligste Funktionsgewinn, der durch die Mutation entsteht, ist die Bildung von Htt-Aggregaten. Proteine wie z.B. Hsp40, Hsp70, BiP, 14-3-3, p53, CA150, CtBP, mSin3A, CBP, TBP und mTOR werden in Htt-Aggregate rekrutiert, wodurch ihre normale Funktion in der Zelle beeinträchtigt oder gar zerstört werden kann (Boutell et al., 1999; Holbert et al., 2001; Kegel et al., 2002; Nucifora et al., 2001; Ravikumar et al., 2004; Steffan et al., 2000; Suhr et al., 2001; Waelter et al., 2001a). Bei der „*loss of function*“ Theorie wird angenommen, dass in der Zelle kein oder nur sehr wenig funktionsfähiges Wildtyp-Htt vorhanden ist, was zur Entstehung von HD führt. Dies setzt voraus, dass mutiertes Htt funktionelles Wildtyp-Htt nicht ersetzen kann. Da auch Wildtyp-Htt in Htt-Aggregate rekrutiert wird (Busch et al., 2003), kann es in den meist heterozygoten HD-Patienten oder in den entsprechenden Mausmodellen stark reduziert sein. Wildtyp-Htt ist essentiell für das Überleben von Neuronen, d.h. es besitzt anti-apoptische Eigenschaften. In einem konditionellen Htt *knock-out* Mausmodell wurden charakteristische HD-Symptome nach Einstellung der Wildtyp-Htt Produktion bei ausgewachsenen Mäusen nachgewiesen (Reiner et al., 2001). In Zellkulturexperimenten begünstigte die Überexpression von Wildtyp-Htt das Überleben von Neuronen (Rigamonti et al., 2000) und nur Wildtyp-Htt konnte die Produktion des neurotrophen Faktors BDNF, der wichtig für die Entwicklung und das Überleben von striatalen Neuronen ist, stimulieren (Zuccato et al., 2001). Die Zellen unterliegen bei HD anscheinend einer massiven Funktionsstörung, die sowohl auf einen Funktionsgewinn als auch auf einen Funktionsverlust von Htt zurückgeführt werden kann.

Interaktionspartner von Huntingtin

Die Funktion eines Proteins wird durch Interaktionen und Reaktion mit anderen Biomolekülen bestimmt (Alberts, 1998). Um Hinweise auf die Funktion von Htt zu erhalten, wurde nach Proteinen gesucht, die spezifisch mit Wildtyp-Htt oder mutiertem Htt

interagieren oder Proteinkomplexe bilden. Bis *dato* wurden mehr als 40 solcher Proteine identifiziert. Aufgrund dieser Interaktionspartner wurden Wildtyp-Htt oder seiner mutierten Form Funktionen innerhalb der Transkriptionsregulation, bei endozytotischen Prozessen, beim intrazellulären Vesikeltransport und bei der postsynaptischen Signalübertragung in der Zelle zugeschrieben (Harjes and Wanker, 2003; Li and Li, 2004).

Htt ist an der Regulation von transkriptionalen Prozessen beteiligt, denn es interagiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und mutiertes Htt verursacht eine abnormale Veränderung in den Expressionsprofilen von verschiedenen Genen (Sugars and Rubinsztein, 2003). So wird z.B. die CRE-abhängige Transkriptionsregulation von mutiertem Htt gestört. Im CRE-System bindet CREB an die DNA und CBP an CREB, wodurch über den TFIID-Komplex die Transkription von Genen, die für das Überleben von Neuronen essentiell sind, initiiert wird. Es ist unklar inwiefern Htt in diesen Prozess involviert ist, aber mutiertes Htt rekrutiert CBP in die Aggregate und interferiert mit der Aktivierung der Transkription. Interessanterweise kann die neuronale Toxizität, die von mutiertem Htt hervorgerufen wird, durch Überexpression von CBP reduziert werden (Nucifora et al., 2001; Steffan et al., 2000). Die Sp1-abhängige Transkriptionsregulation wird ebenfalls durch mutiertes Htt beeinträchtigt. Sp1 bindet an die DNA und an TAF_{II}130, wodurch über den TFII-Komplex die Transkription des Dopamin-D2-Rezeptors und des Nervenwachstumsfaktors EGF aktiviert wird. Htt interagiert sowohl mit Sp1 als auch mit TAF_{II}130 und fördert dabei deren Interaktion. Ist Htt mutiert, so können Sp1 und TAF_{II}130 nicht mehr interagieren und die Sp1-abhängige Transkription wird inhibiert (Dunah et al., 2002; Li et al., 2002). Ferner wurde gezeigt, dass Htt die Expression des neurotrophen Faktors BDNF indirekt über den Proteinkomplex REST/NRST reguliert. Wildtyp-Htt, nicht aber mutiertes Htt, interagiert mit REST/NRST. Im Verbund mit Wildtyp-Htt ist der REST/NRST Komplex im Cytoplasma lokalisiert und die Transkription von BDNF wird aufrecht erhalten. Liegt dagegen REST/NRST ungebunden vor, so wird der Komplex in den Kern transportiert, wodurch die Transkription von BDNF unterdrückt wird (Zuccato et al., 2003). Htt oder seine mutierte Form interagieren noch mit einer Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, wie CA150, CtBP, HYPA, HYPB, HYPC, NCOP, NF- κ B oder TBP (Li and Li, 2004). Dies deutet darauf hin, dass Htt eine wichtige Funktion bei der Feinregulierung von verschiedenen transkriptionalen Prozessen besitzt.

Htt spielt auch eine wichtige Rolle bei endozytotischen Transportprozessen, da es mit Proteinen wie z.B. HIP14, HIP1, α -Adaptin C, SH3GL3 und PACSIN1 interagiert (Harjes and Wanker, 2003). HIP14 ist im Gehirn angereichert und colokalisiert mit Htt im Striatum. Es tritt vorwiegend in cytoplasmatischen Vesikeln und im Golgi-Apparat auf, wo es eine Funktion beim intrazellulären Transport ausübt. HIP14 besitzt scheinbar nur eine geringe Bindungsaffinität zu mutiertem Htt, wodurch Transportprozesse, an denen HIP14 beteiligt ist, bei HD abnorm verlaufen (Singaraja et al., 2002). An der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch Clathrin-bedeckte Vesikel sind HIP1 und seine Interaktionspartner Clathrin, α -Adaptin A und α -Adaptin C maßgeblich beteiligt. Htt könnte die Assemblierung von HIP1 und α -Adaptin C durch direkte Interaktion mit beiden Proteinen begünstigen und somit die Bildung von Clathrin-bedeckten Vesikeln beeinflussen (Metzler et al., 2001; Waelter et al., 2001b). Der Befund, dass mutiertes Htt HIP1 mit geringerer Affinität bindet als normales Htt (Kalchman et al., 1997; Wanker et al., 1997), führte zu der Annahme, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose bei HD beeinträchtigt ist. Liegt im Falle von HD vermehrt ungebundenes HIP1 in der Zelle vor, so kann es mit dem Protein Hippin interagieren und mit diesem einen Komplex ausbilden, der apoptotische Prozesse einleitet (Gervais et al., 2002; Hackam et al., 2000).

Ein weiterer Interaktionspartner von Htt, der an endozytotischen Prozessen beteiligt ist, ist SH3GL3. SH3p13, das zu SH3GL3 homologe Protein der Ratte (Ringstad et al., 1997) interagiert mit Dynamin I und Synaptojanin, die beide essentiell für die Rezeptor-vermittelte-Endozytose und für das Recycling von synaptischen Vesikeln sind. Mutiertes Htt bindet mit hoher Affinität an SH3GL3, wodurch möglicherweise die Ausbildung des normalen SH3GL3-haltigen Proteinkomplexes gestört ist (Sittler et al., 1998). Ebenso wie SH3GL3 interagiert auch PACSIN1 verstärkt mit der mutierten Form von Htt. PACSIN1 ist ein spezifisches neuronales Phosphoprotein, das in Neuronen besonders in präsynaptischen Axonendanschwellungen angereichert und am Recycling von synaptischen Vesikeln beteiligt ist. In HD-Patienten ist PACSIN1 mengenmäßig reduziert und im Cytoplasma lokalisiert, was auf eine Störung im Recyclingprozess von synaptischen Vesikeln hindeutet (Modregger et al., 2002).

Der Transport von Vesikeln und Endosomen entlang von Mikrotubuli wird von dem Dynein/Dynaktin-Komplex innerhalb der Zelle gesteuert. Htt scheint auch an diesem Vorgang beteiligt zu sein, da es zusammen mit seinem Interaktionspartner HIP1 mit

einer für Vesikel charakteristischen Geschwindigkeit transportiert wird (Block-Galarza et al., 1997). Htt könnte über HAP1 mit dem Dynein/Dynaktin-Komplex assoziiert sein, denn HAP1 bindet an p150^{Glued}, einem integralen Bestandteil dieses Komplexes (Engelender et al., 1997). Möglicherweise beeinflusst Htt die Bewegungsgeschwindigkeit der Transportmaschinerie oder fungiert als Adapter zwischen dem Dynein/Dynaktin-Komplex und der zu transportierenden Fracht (Harjes and Wanker, 2003; Li and Li, 2004).

Ferner besitzen Htt und HAP1 den gemeinsamen Interaktionspartner FIP-2. Beide Proteine sind dadurch mit der Signalkaskade von Rab8 assoziiert, denn FIP-2 interagiert direkt mit Rab8. Durch die Rab8-Kaskade wird der polarisierte Membrantransport durch die Reorganisation von Actinfilamenten und Mikrotubuli reguliert, die Ausbildung von Filopodien induziert und der anterograde Transport von Membranen dirigiert (Faber et al., 1998; Hattula and Peranen, 2000). Htt interagiert auch mit dem Protein PSD-95, das für die Organisation der postsynaptischen Membran (PSM) und die Funktionalität von Synapsen wichtig ist. Bei HD ist diese Interaktion vermutlich gestört, da PSD-95 nur schwach an mutiertes Htt bindet (Sun et al., 2001). PSD-95 gruppiert die NMDA- und Kainat-Rezeptoren in der PSM (Garcia et al., 1998) und interagiert sowohl mit SynGAP als auch mit Kalirin (Kim et al., 1998; Penzes et al., 2001). Das cytosolische Protein SynGAP beeinflusst über die RAS/MAPK Signalübertragungskaskade die Plastizität in excitatorischen Synapsen. Kalirin, ein Rac GDP-GTP Austauschfaktor, kann die Rac1-Kaskade auslösen und somit die Umlagerung des Actin-Cytoskelettes von dornartigen Dendriten-Fortsätzen (Spines) aktivieren (Sheng and Kim, 2002). Htt spielt somit möglicherweise eine wichtige Rolle bei Signalübertragungsprozessen an Synapsen und bei der Organisation der PSM durch seine Bindung an FIP-2, HAP1 und PSD-95.

Aufgrund der vielen unterschiedlichen Interaktionspartner, wird angenommen, dass Htt nicht nur eine Funktion in der Zelle ausübt, sondern ein multifunktionelles Protein ist. Es ist an unterschiedlichen zellulären Vorgängen beteiligt und bildet temporäre Proteinkomplexe. Htt stellt wahrscheinlich eine molekulare Gerüststruktur dar, an dem sich miteinander wechselwirkende Proteine finden und organisieren können (Harjes and Wanker, 2003). Um die Funktion der unterschiedlichen Htt-Proteinkomplexe, besser zu charakterisieren, ist es wichtig, nicht nur nach neuen Interaktionspartnern von Htt zu suchen, sondern auch nach Wechselwirkungen, die zwischen den verschiedenen mit Htt interagierenden Proteinen stattfinden. Durch die

Identifizierung solcher Querverbindungen könnte ein Protein-Interaktionsnetzwerk mit Fokus auf Htt entstehen, das zu einem besseren Verständnis der Funktion von Htt in der Zelle führen sollte.

Protein-Interaktionsnetzwerke

In den letzten Jahren sind die ersten genomweiten Protein-Interaktionsnetzwerke für Modellorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* identifiziert worden. Dabei stellte sich heraus, dass die Verbindung einzelner Interaktionspaare zu einem Protein-Interaktionsnetzwerk für die theoretische Bestimmung von Protein-Funktionen wichtige Informationen liefern kann (Bader and Hogue, 2002; Schwikowski et al., 2000). Bioinformatische Analysen zeigten, dass Proteine mit ähnlicher Funktion und gleicher zellulärer Lokalisation dazu neigen, sich innerhalb eines Netzwerkes zu gruppieren (Ge et al., 2003). Dass Protein-Interaktionsnetzwerke nützlich für die Aufklärung von zellulären Prozessen sind, zeigen die Signalkaskaden von TNF- α /NF- κ B und Smad. Beide Kaskaden wurden anhand von Protein-Interaktionsnetzwerken identifiziert (Bouwmeester et al., 2004; Colland et al., 2004).

Zielsetzung der Arbeit-I

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Erstellung eines Protein-Interaktionsnetzwerkes für Htt. Zu diesem Zweck sollte mit Hilfe des Hefe Two-Hybrid-Systems nach Proteinen gesucht werden, die entweder mit Htt oder mit einem Htt-assoziierten Protein interagieren. Die Proteine der detektierten Interaktionspaare sollten dann gegeneinander auf Protein-Interaktionen getestet werden, um eine Vernetzung zwischen den einzelnen Interaktionspaaren zu erreichen. Nach Analyse der Daten durch verschiedene bioinformatische Programme sollte schließlich ein umfassendes, Htt-bezogenes Netzwerk generiert werden. Zur Validierung des Netzwerkes sollten mit *in vitro* Bindungsexperimenten mindestens ein Viertel der detektierten Protein-Interaktionen verifiziert werden. Proteine, die einen Einfluss auf die Pathogenese von

HD haben, stellen potentielle Targets für die Entwicklung neuer Medikamente dar. Innerhalb des Htt-Netzwerkes sollte daher nach Proteinen gesucht werden, die das Aggregationsverhalten von mutierten Htt-Fragmenten in Säugetierzellen beeinflussen. Mit dem Netzwerk sollten neue Ansatzpunkte für eine funktionelle Charakterisierung von Htt sowie für die Formulierung neuer Hypothesen bezüglich des Krankheitsmechanismus von HD geschaffen werden.

Prionenkrankheiten

HD gehört ebenso wie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) zur Familie der neurodegenerativen Krankheiten bei denen sich Amyloide bilden (Bates et al., 2002). Ein Amyloid besteht aus Protein-Fibrillen (Abbildung 2), hat einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen, ist Protease-resistent und leuchtet bei Bindung des Farbstoffes Kongorot grün-gelb im polarisiertem Licht (Prusiner et al., 1983; Sacchettini and Kelly, 2002). CJK zählt wie auch Kuru, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom und die tödliche familiäre Schlaflosigkeit zu den humanen Prionenerkrankungen. Auch im Tierreich treten Krankheiten, die durch Prionen ausgelöst werden, auf wie z.B. die Traberkrankheit (Scrapie) beim Schaf und BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) beim Rind (Aguzzi and Polymenidou, 2004; Prusiner et al., 1998).

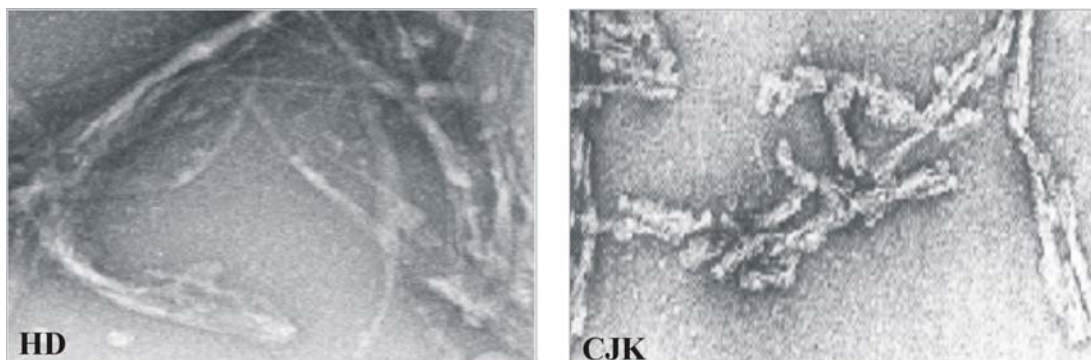


Abbildung 2: Amyloide bei HD und CJK.

Übertragung von Prionen

In den letzten Jahren erregte eine neue Variante von CJK das Aufsehen der Öffentlichkeit, weil sie möglicherweise durch den Verzehr von mit BSE infizierten Rindern hervorgerufen wird. Schon in den sechziger Jahren wurde die Infektiosität von Prionenkrankheiten nachgewiesen, denn Scrapie konnte auf Mäuse und CJK auf Schimpansen durch Injektion von prionenhaltigem Gewebe übertragen werden (Chandler, 1961; Gibbs et al., 1968). Allerdings besteht zwischen einigen Arten eine Übertragungsbarriere, denn Mäuse konnten weder mit humanen Prionen noch mit Prionen vom Rind infiziert werden (Bueler et al., 1993). 1967 wurde als mögliche Ursache für Scrapie erstmalig ein konformationsisomeres Protein mit selbstreplikativen Eigenschaften vermutet (Griffith, 1967). Stanley Prusiner griff diese Vermutung auf und formulierte 1982 seine „Protein-only“-Hypothese für Prionenerkrankungen. Bei dieser Hypothese wird angenommen, dass ein Protein, das Prion PrP^{Sc}, das allein krankheitsverursachende und infektiöse Agens ist (Prusiner, 1982). Dieses Protein unterscheidet sich von dem zellulären Protein PrP^C lediglich in seiner Konformation. PrP^{Sc} besitzt mehrere β -Faltblattstrukturen während bei PrP^C vorwiegend α -helikale Strukturen auftreten. Eine wichtige Eigenschaft von PrP^{Sc} ist, dass es seine abnormale Proteinfaltung auf das PrP^C Protein überträgt (Prusiner, 1991). In der Zelle ist PrP^C löslich während PrP^{Sc} unlöslich ist. PrP^{Sc} besitzt zudem die Fähigkeit, Protease-resistente Aggregate zu bilden (Jackson et al., 1999; McKinley et al., 1983; Prusiner et al., 1977; Wille et al., 2002). Die „Protein-only“-Hypothese ist heute allgemein anerkannt, da sie durch eine Vielzahl von experimentellen Daten gestützt wird. Eine wichtige Erkenntnis war, dass das verursachende Agens bei Prionenkrankheiten außergewöhnlich resistent gegen Nukleasen und UV-Bestrahlung war, womit eine Infektion durch Nukleinsäuren ziemlich unwahrscheinlich ist (Alper et al., 1966; Prusiner et al., 1998). Des Weiteren spricht für diese Hypothese, dass sich PrP^{Sc} an normales zelluläres PrP^C anlagert und dessen Umlagerung in die Prionenform PrP^{Sc} induziert. Bei dieser Konversion werden partiell α -helikale Strukturen von PrP^C in β -Faltblätter umgewandelt (Caughey et al., 1991; Pan et al., 1993). In einem *in vitro* System, bei dem nur aufgereinigte Proteinen eingesetzt wurden, konnte eine Konversion von PrP^C in die Prionenform durch die Zugabe von PrP^{Sc} induziert werden (Kocisko et al., 1994). Ferner wurde gezeigt, dass das Protein PrP vom chromosomalen Gen *Prnp* kodiert wird (Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985) und dass

Prnp knock-out Mäuse nach Injektion von Prionen aus dem Schaf keinen auffälligen Phänotyp zeigen (Bueler et al., 1992; Prusiner et al., 1993; Sailer et al., 1994). Erstaunlich ist die Tatsache, dass Mäuse mit gleichem genetischen Hintergrund, die mit ein und derselben Prionencharge infiziert wurden, verschiedenartige Neuropathologien ausbilden und die Krankheit bei den infizierten Tieren unterschiedlich schnell voranschreitet. Möglicherweise sind unterschiedliche Faltungen der infektiösen PrP^{Sc} Proteine für das Auftreten der verschiedenen Phänotypen verantwortlich (Bessen et al., 1995; Safar et al., 1998; Telling et al., 1996).

Theorien zum molekularen Mechanismus der Replikation von Prionen

Der molekulare Replikationsmechanismus, nach dem Prionen ihre zellulären, normal gefalteten Äquivalente konvertieren, ist noch nicht bekannt. Derzeit existieren zwei Theorien für die Prionenreplikation (Aguzzi and Polymenidou, 2004).

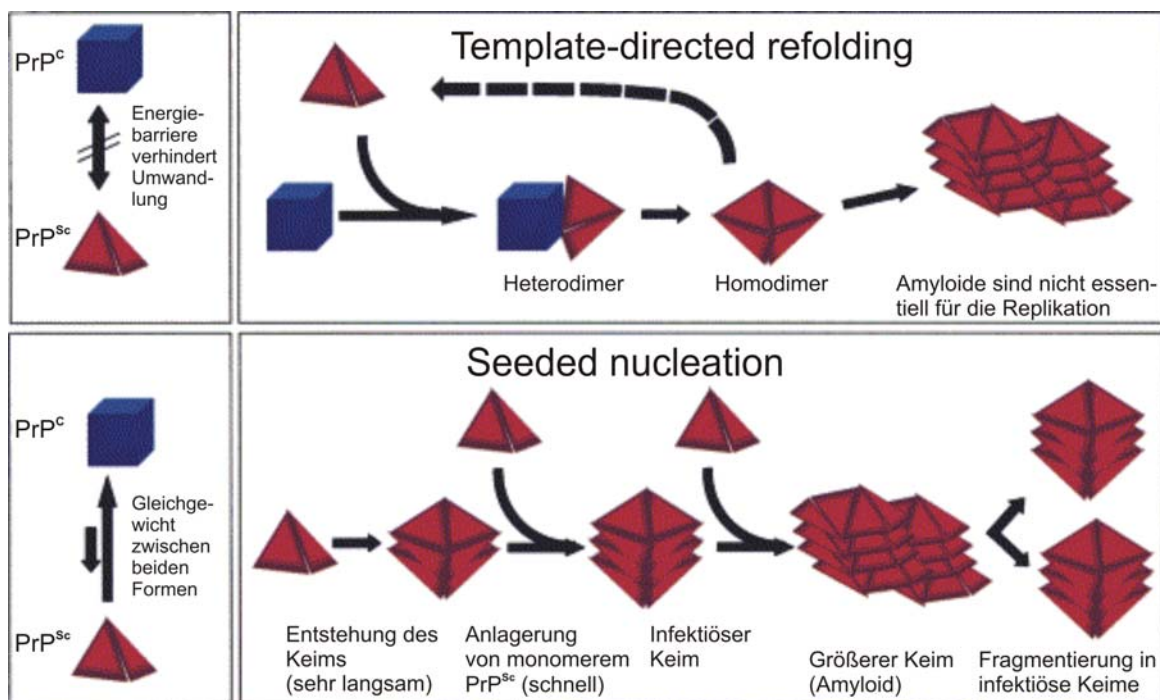


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zwei Hypothesen zur Prionenreplikation (nach Aguzzi und Polymenidou, 2004).

Die eine Theorie geht von einem Vorlage-dirigierten Umlagerungsmechanismus („template-directed refolding“) aus (Abbildung 3). Demnach interagiert ein von außen

eingeführtes Prionprotein PrP^{Sc} mit PrP^C, wodurch zunächst ein Heterodimer entsteht, das sich in ein PrP^{Sc}-Homodimer umwandelt. Entweder dissoziieren die beiden PrP^{Sc}-Untereinheiten und konvertieren weitere PrP^C Proteine, oder sie bleiben assoziiert und werden in Form von Amyloid-haltigen Aggregaten, die für den weiteren Replikationsprozess keine Rolle spielen, abgelagert (Cohen et al., 1994; Prusiner, 1991). Bei der anderen Theorie wird davon ausgegangen, dass ein keimabhängiger Aggregationsprozess („seeded nucleation“) die Konversion verursacht. In der Zelle wird sowohl PrP^C als auch PrP^{Sc} produziert, wobei das normal gefaltete Protein thermodynamisch begünstigt ist. Extrem selten treten mehrere PrP^{Sc} Moleküle gleichzeitig auf und lagern sich zu einem infektiösen Keim zusammen, der zu einer Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichtes zu Gunsten von PrP^{Sc} führt. Bei diesem Mechanismus können sich immer mehr PrP^{Sc} Proteine an den Keim anlagern und schließlich ein amyloides Aggregat bilden. Durch Fragmentierung des Aggregates können neue Keime entstehen, die dann den Replikationsprozess beschleunigen (Jarrett and Lansbury Jr, 1993).

Entdeckung von Hefeprionen

Der ursprünglich nur für ein infektiöses Protein in Säugetieren benutzte Begriff Prion wurde 1994 verallgemeinert, da auch in niederen Organismen wie Hefen und filamentösen Pilzen, Proteine mit Prion-Eigenschaften entdeckt wurden (Coustou et al., 1997; Wickner, 1994). In der Literatur sind drei Hefeprionen detailliert beschrieben, nämlich [*PSI*⁺], [*URE3*] und [*PIN*⁺] (Derkatch et al., 2001; Shorter and Lindquist, 2005; Wickner, 1994; Wickner et al., 2004). Alle diese Prionen werden nicht nach den Mendelschen Gesetzen sondern während der Zellteilung über das Cytoplasma von der Mutter- zur Tochterzelle vererbt. Im Vergleich zu den bei Säugetieren auftretenden Prionen sind Hefeprionen nicht toxisch, sondern besitzen unter bestimmten Umständen sogar lebenserhaltende Funktionen (Cox, 1965; Lacroute, 1971). Mittlerweile wird mit dem Begriff Prion ein infektiöses, konformationsisomeres zelluläres Protein definiert (Aguzzi and Polymenidou, 2004; Prusiner et al., 1998; Wickner et al., 2004).

Kriterien für Hefeprionen

In der Hefe muss ein Protein drei Kriterien erfüllen, um als Prion zu gelten. Erstens muss die Prionenform reversibel sein. Hefeprionen sollten durch Behandlung der Zellen mit chemischen Agenzien, wie Guanidinium Hydrochlorid, DMSO, Ethanol oder Methanol eliminiert werden. Dieser Vorgang wird als Heilung (Curing) bezeichnet. Nach der Heilung muss dann die Prionenform wieder spontan entstehen können. Als zweites Kriterium gilt, dass die Überexpression des Prionenäquivalents die Anzahl der entstehenden Prionen stark erhöhen muss. Drittens muss das Gen, das für das lösliche bzw. unlösliche Protein kodiert, essentiell für die Vermehrung des Prions sein und bei Funktionsverlust des Gens muss der erzeugte Phänotyp ähnlich zum Prionenphänotyp sein (Chernoff, 2001; Wickner et al., 2004).

Das Hefepriion [*PSI*⁺]

Die meisten Erkenntnisse über Hefepriionen wurden anhand von Untersuchungen an Sup35, dem konformationsisomeren Protein zu [*PSI*⁺], gewonnen. Sup35 agiert zusammen mit Sup45 als Terminationsfaktor bei der Proteintranslation. In [*psi*⁻]-Zellen ist Sup35 löslich und funktionell, d.h. die Proteinsynthese terminiert korrekt an einem Stopcodon. In [*PSI*⁺]-Zellen dagegen liegt Sup35 in seiner Prionenform als unlösliches, aggregiertes Protein vor, wodurch es seine Funktion als Terminationsfaktor verliert. Infolgedessen wird die Proteinsynthese nicht an einem Stopcodon abgebrochen (Cox et al., 1988). [*PSI*⁺] ist also ein epigenetisches Element, das die Translationstermination an singular vorkommenden Stopcodons verhindert.

In der Hefe kann das PSI-Phänomen durch das Einfügen eines Stopcodons im *ADE1*-Allel (*ade1-14*) einen speziellen Wachstumsphänotyp erzeugen, der den Konformationszustand von Sup35 widerspiegelt (Abbildung 4). [*psi*⁻]-Zellen mit einer *ade1-14* Mutation wachsen nur auf adeninhaltigem Medium und bilden dabei aufgrund der mutationsbedingten Anhäufung eines Zwischenproduktes des Adenin-Stoffwechsels rote Kolonien aus. In [*PSI*⁺]-Zellen mit einer *ade1-14* Mutation kann dagegen Adenin synthetisiert werden, was zu Wachstum auf adeninfreiem Medium und der Bildung von weißen Kolonien führt (Serio and Lindquist, 2000; Wickner et al., 2004).

Aggregation von Sup35

Unlösliches Sup35 weist einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen auf und ist in der Lage fibrilläre Strukturen zu bilden (Glover et al., 1997). Durch *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass die N/Q-reichen Abschnitte der PrD für die Aggregation von Sup35 verantwortlich sind (King et al., 1997). Der Aggregationsprozess von Sup35 ist konzentrations- und zeitabhängig. Des Weiteren verläuft er nach einem keimabhängigen Mechanismus, denn die Zugabe von kleinen Mengen an vorgeformten N-terminalen Sup35-Fibrillen beschleunigt signifikant die Aggregation von Sup35 (Glover et al., 1997; King et al., 1997). Somit ähnelt der Aggregationsprozess von Sup35 dem von mutiertem Htt (Perutz et al., 1994; Perutz et al., 2002).

Spontane Entstehung von $[PSI^+]$

Der $[PSI^+]$ -Phänotyp wird durch die Überexpression von Sup35 oder PrD in Gegenwart von $[PIN^+]$ *de novo* induziert. Also führt die Expression von Sup35 bzw. PrD in $[PIN^+][psi^-]$ -Zellen nicht aber in $[pin^-][psi^-]$ -Zellen zur spontanen Entstehung von $[PSI^+]$ (Derkatch et al., 2000; Derkatch et al., 1997). Außerdem ist für die *de novo* Entstehung von $[PSI^+]$ eine physiologische Konzentration des Chaperons Hsp104 erforderlich (Chernoff et al., 1995; Patino et al., 1996).

Unterschiedliche $[PSI^+]$ -Varianten

Wie bei Säugetieren können auch in der Hefe unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen in Zellen mit gleichem Genotyp durch eine Prionenart hervorgerufen werden (Bradley et al., 2002; Derkatch et al., 1996). So wurden verschieden stark ausgeprägte $[PSI^+]$ -Phänotypen in Hefezellen mit der *ade1-14* Mutation beschrieben, die sich in der Färbung der Kolonien und den Wachstumsraten auf adeninfreiem Medium deutlich unterscheiden. Ferner wurde eine größere mitotische Instabilität bei schwachen gegenüber starken $[PSI^+]$ -Zellen beobachtet (Derkatch et al., 1996). Die Ursache für die Ausbildung verschiedener Phänotypen liegt vermutlich in unterschiedlichen Faltungsformen von unlöslichem Sup35. Es wurde gezeigt, dass sich

bei 4 und 37 °C nicht identisch gefaltete N-terminale Sup35-Fibrillen bilden und dass mit diesen Fibrillen unterschiedliche $[PSI^+]$ -Varianten erzeugt werden können (King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004). Somit ist wahrscheinlich die Faltung des Prions ausschlaggebend für den ausgeprägten Phänotyp.

Die Entdeckung von Rnq1

Zur Identifizierung weiterer Hefeprionen wurde das *S. cerevisiae* Genom auf PrD-homologe Regionen untersucht. Dabei wurden zwei Proteine, New1 und Rnq1, mit N/Q-reichen Domänen entdeckt. Beide Proteine bilden Aggregate und beeinflussen die Entstehung von $[PSI^+]$. In der Hefe führte die Expression von Fusionsproteinen zwischen der N/Q-Domäne von New1 oder Rnq1 und der C-terminalen Region von Sup35 zu den vererbaren Prionenphänotypen $[NU^+]$ bzw. $[RPS^+]$. Beide Phänotypen wiesen die Eigenschaften von $[PSI^+]$ auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass Prionen modular aufgebaut sind und sich ihre Prionendomänen funktionell übertragen lassen (Michelitsch and Weissman, 2000; Santoso et al., 2000; Sondheimer and Lindquist, 2000). Versuche, Prionen anderer Hefearten auf *S. cerevisiae* zu übertragen, schlugen meist fehl (Chernoff et al., 2000; Kushnirov et al., 2000; Santoso et al., 2000). Vermutlich lassen sich Strukturen von artfremden Prionen nicht in *S. cerevisiae* replizieren (Edskes and Wickner, 2002; Resende et al., 2002).

Derkatch *et al.* zeigten, dass Rnq1 das konformationsisomere Protein zu dem Prion $[PIN^+]$ ist (Derkatch et al., 2001). Neben aggregiertem Rnq1 können aber auch noch Aggregate von 11 weiteren Hefeproteinen $[PIN^+]$ hervorrufen (Derkatch et al., 2001). $[PIN^+]$ selbst hat keinen bekannten Phänotyp, ist aber essentiell für die Entstehung von $[PSI^+]$.

Heilung von $[PSI^+]$ -Zellen

Hefezellen können von $[PSI^+]$ geheilt werden, indem sie mit chemischen Substanzen, wie z.B. Guanidinium Hydrochlorid behandelt werden. Aber auch Überexpression oder Eliminierung von Hsp104 führen zur Heilung von $[PSI^+]$ (Chernoff et al., 1995; Wegrzyn et al., 2001). Dieser erstaunliche Effekt, dass sowohl Überexpression

als auch Verlust von Hsp104 zur Heilung von $[PSI^+]$ -Zellen führt, wird in der Literatur durch unterschiedliche Aktivitäten dieses Proteins erklärt. Hsp104 fördert bei normaler Konzentration die Bildung von Sup35-Oligomeren, die essentiell für die Konformationsänderung von Sup35 sind (Chernoff et al., 1995; Patino et al., 1996; Paushkin et al., 1996; Shorter and Lindquist, 2004; Wegrzyn et al., 2001). Zusätzlich kann es die Fragmentierung der Sup35-Aggregate oder -Fibrillen beschleunigen, so dass neue Keime für den Aggregationsprozess und die Vererbung von $[PSI^+]$ zur Verfügung stehen (Glover et al., 1997; Shorter and Lindquist, 2004). Da ohne Beteiligung von Hsp104 keine oligomeren Strukturen von Sup35 entstehen, kann der $[PSI^+]$ -Phänotyp nicht in Hsp104-freien Hefezellen auftreten. Bei Überexpression von Hsp104 wird der $[PSI^+]$ -Phänotyp eliminiert, weil einerseits die Sup35-Aggregate verstärkt fragmentiert und somit letztlich aufgelöst werden und andererseits die Bildung von neuen Sup35-Oligomeren inhibiert wird (Shorter and Lindquist, 2004). Es wurde gezeigt, dass millimolare Mengen von GdnHCl die Aktivität von Hsp104 hemmen. Somit ist wahrscheinlich die Inaktivierung von Hsp104 bei einer GdnHCl-Behandlung ursächlich für die Eliminierung von $[PSI^+]$ (Ferreira et al., 2001).

Zielsetzung der Arbeit-II

Der molekulare Mechanismus, der zur spontanen Entstehung von Prionen führt, ist bis heute nicht bekannt. Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es zu zeigen, dass Hefepriionen *de novo* unabhängig von anderen bereits existierenden Prionen entstehen können, wenn ihre Fähigkeit zu aggregieren aufgrund von aggregationsstimulierenden Sequenzen erhöht wird. Zu diesem Zweck sollten Sup-Htt Fusionsproteine hergestellt werden, die aus Sup35 und einem aggregationsfähigen Htt-Exon1 Fragmenten bestehen. Anschließend sollte untersucht werden, ob diese Proteine in einem „prionenfreien“ Kontext, in $[psi^-][pin^-]$ Hefezellen, aggregieren und endogenes lösliches Sup35 ($[psi^-]$) in unlösliche Proteinaggregate ($[PSI^+]$) überführen können. Mittels *in vivo* und *in vitro* Experimenten, Untersuchungen zur Heilung sowie zur Vererbung von Hefepriionen sollte ein neues Modellsystem für die Untersuchung der *de novo* Entstehung von Prionen etabliert und validiert werden.