

Untersuchung der Coaggregation von polyglutaminhaltigen  
Huntingtin Exon 1 Proteinen mit nuklearen Proteinen

Dissertation  
vorgelegt von  
Anne Busch

Angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin-Dahlem  
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E.E. Wanker

Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

2002

Die Dissertation wurde in der Zeit von Januar 1999 bis Mai 2002 angefertigt.  
Datum der Disputation 16.12.02.

Gutachter:

Prof. Dr. Hans Lehrach

Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Freie Universität Berlin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
Chorea Huntington	1
Andere Krankheiten mit einer Verlängerung der Polyglutamindomäne	2
Molekulare Grundlagen der Krankheit	4
Strukturen der Aggregate aus Huntingtin	6
Gewinnt oder verliert Huntingtin durch die Mutation eine Funktion?	8
Huntingtin mit normalen und verlängerten Polyglutamindomänen	10
Die Aggregation von Proteinen	10
Rekrutierung von anderen Proteinen in die Huntingtin-Aggregate	12
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>15</b>
2.1. Analyse der Aggregation Huntingtin Exon 1 in vitro	15
2.1.1. Herstellung des Vektors pGEX-6P-FLAG	15
2.1.2. Expression und Reinigung der GST-Huntingtin Exon 1 Fusionsproteine	17
2.1.3. Etablierung eines Assays der Huntingtin Exon 1 Aggregation in vitro	19
2.1.4. Strukturanalyse der Aggregate	22
2.1.5. Längen- und Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation	24
2.1.6. Die Kinetik der Bildung von Aggregaten	25
2.1.7. Aggregation von Huntingtin Exon 1 nach der Zugabe von Aggregationskeimen	26
2.1.8. Kinetik des Fibrillenwachstums	28
2.1.9. Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen	30
2.1.10. Strukturanalyse der gemischten Aggregate	33
2.1.11. Aggregation von Huntingtin Exon 1 nach Zugabe von heterologen Keimen	34
2.2. Analyse der in vivo Aggregation von HD Exon 1 Proteinen in Säugetierzellen	36
2.2.1. Konstruktion von Plasmiden für die Expression von HD Exon1 Proteinen in Säugetierzellen	36

2.2.2. Untersuchung der Expression der Huntingtin Exon 1 Proteine mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen in Säugetierzellen mittels Western Blots	37
2.2.3. Untersuchung der Expression der Huntingtin Exon 1 Proteine mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen in Säugetierzellen mittels Immunofluoreszenz	38
2.2.4. Analyse der Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit verschiedenen langen Polyglutamindomänen in Säugetierzellen mittels Filtrationsanalyse	40
2.2.5. Untersuchung der Huntingtin Exon 1 Coaggregation in Säugetierzellen mittels Immunofluoreszenz	41
2.3. Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit TBP, NOCT3 und PQBP1	43
2.3.1. Untersuchung der Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit TBP, NOCT3 und PQBP1 in vitro	43
2.3.2. Untersuchung der Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit TBP, NOCT3 und PQBP1 in Säugetierzellen	46
2.4.2. Analyse zur Coaggregation von HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 mit GFP-HD-Q 17 und GFP-HD-Q 72 in Säugetierzellen mittels der Filtrationsmethode	47
2.4.3. Colokalisierung von HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 mit GFP-HD-Q 72 und GFP-HD-Q 17 in der Immunofluoreszenzmikroskopie	49
2.5. Colokalisierungen von NOCT3 und PQBP1 mit neuronalen Einschlußkörpern in Gehirnen von Mäusen, die transgen für Huntingtin sind	51
<b>3. Diskussion</b>	<b>53</b>
<b>4. Materialien und Methoden</b>	<b>73</b>
4.1. Materialien	73
4.1.1. Bakterienstämme	73
4.1.2. Zelllinien	73
4.1.3. Plasmidvektoren	73
4.1.4. Medien und Puffer	75
4.1.4.1. Mikrobiologische Medien und Standardpuffer	75
4.1.4.2. Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	76
4.1.5. Oligonukleotide	77

4.1.6. Antikörper	78
4.1.7. Enzyme, Proteine, und DNA	80
4.1.8. Chemikalien und Säulenmaterialien	80
4.1.9. Kits	82
4.1.10. Laborausstattung, Geräte und Zubehör	82
4.1.11. Computerprogramme	85
4.1.12. Benutzte Internetadressen	86
4.2. Methoden	87
4.2.1. Molekularbiologische Methoden	87
4.2.1.1. DNA-Plasmidproduktion und -präparation	87
4.2.1.2. Konzentrationsbestimmung der DNA	87
4.2.1.3. Restriktionsverdau von DNA	87
4.2.1.4. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen	88
4.2.1.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	88
4.2.1.6. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	88
4.2.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten	88
4.2.1.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	88
4.2.1.9. Berechnung der Schmelztemperaturen von Primern	89
4.2.1.10. DNA-Sequenzierung	89
4.2.1.11. DNA-Fällung	89
4.2.1.12. Plasmidkonstruktionen	90
4.2.1.12.1. pGEX-FLAG	90
4.2.1.12.2. pGEX-FLAG-HD-Exon 1(Q)n	90
4.2.1.12.3. pEGFP-HD-72Q und pYEGFP-HD 17Q	90
4.2.1.12.4. pTL-HA-N-OCT3, pTL-HA-TBP, pTL-HA-PQBP1	90
4.2.1.12.5. pGEX-FLAG-N-OCT3, pGEX-FLAG-TBP, pGEX-FLAG-PQBP1	91
4.2.2. Mikrobiologische Methoden	91
4.2.2.1. Herstellung elektrisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	91
4.2.2.2. Transformation in elektrisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen	92
4.2.2.3. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	92
4.2.2.4. Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	93
4.2.3. Proteinbiochemische Methoden	93

4.2.3.1. Expression von rekombinanten GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	93
4.2.3.2. Reinigung von GST-Fusionsproteinen	94
4.2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	95
4.2.3.3.1. Konzentrationsbestimmung nach Bradford	95
4.2.3.3.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	95
4.2.3.4. SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	96
4.2.3.5. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	96
4.2.3.6. Western Blotting	96
4.2.3.7. Filtertest	97
4.2.3.8. Proteinfällung mit Trichloressigsäure	98
4.2.3.9. <i>PreSission</i> <sup>TM</sup> Protease Verdau	98
4.2.3.10. Gewinnung von Aggregationskeimen	98
4.2.4. Zellbiologische Methoden	99
4.2.4.1. Auftauen von kryokonservierten Säugetierzellen	99
4.2.4.2. Kultivierung von Säugetierzellen	99
4.2.4.3. Lagerung von Säugetierzellen	99
4.2.4.4. Calciumphosphat-Transfektion von Säugetierzellen	99
4.2.4.5. Lipofectin®-Transfektion von Säugetierzellen	100
4.2.4.6. Herstellung von Zelllysaten	100
4.2.4.7. Vorbereitung von Zellpräparaten für die Immunofluoreszenz	100
4.2.4.8. Proteasom-Inhibition mit ALLN	101
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>121</b>
<b>7. Abstract</b>	<b>123</b>
<b>8. Veröffentlichungen und Präsentationen</b>	<b>125</b>
<b>9. Abkürzungen</b>	<b>126</b>
<b>10. Danksagung</b>	<b>128</b>
<b>11. Lebenslauf</b>	<b>129</b>