

2. Ergebnisse

2.1. Analyse der Aggregation Huntingtin Exon 1 *in vitro*

2.1.1. Herstellung des Vektors pGEX-6P-FLAG

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, wie N-terminale Fragmente von Huntingtin mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen aggregieren. Es wurde ein *in vitro* System von GST-Huntingtin Exon 1-Fusionsproteinen mit N-terminalen Epitopen etabliert. Mit diesem soll die Aggregation, die Fibrillenbildung und die Coaggregation von Huntingtin Exon 1 mit normaler und pathologischer Polyglutamindomäne untersucht werden. Auch die Untersuchung der Coaggregation von nuklearen Proteinen mit Polyglutamindomänen und Huntingtin-Aggregaten ist Gegenstand dieser Arbeit.

Auf der Basis eines schon existierenden *in vitro* Systems (Scherzinger et al., 1997) wurde ein neues System entwickelt, bei dem die Huntingtin Fragmente durch die Fusion mit unterschiedlichen N-terminalen Epitopen immunologisch zu unterscheiden sind. Zur Produktion und Reinigung der Huntingtin Exon 1 Proteine wurde das Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionssystem mit dem Vektor pGEX-6P-1 benutzt. Dieser Vektor kodiert für eine spezifische Protease-Schnittstelle C-terminal von der GST-Sequenz.

In den *BamHI* linearisierten Vektor pGEX-6P-1 wurde eine Adapter-Sequenz einkloniert. Diese enthält eine Restriktionsschnittstelle für *NdeI*, kodiert für das FLAG-Epitop (DYDDDDK) und hat nach der Restriktionsschnittstelle für *BamH I* die charakteristische multiple Klonierungsstelle (MCS) des Herstellers. Der Vektor (siehe Abbildung 3) wurde als pGEX-6P-1-FLAG bezeichnet.

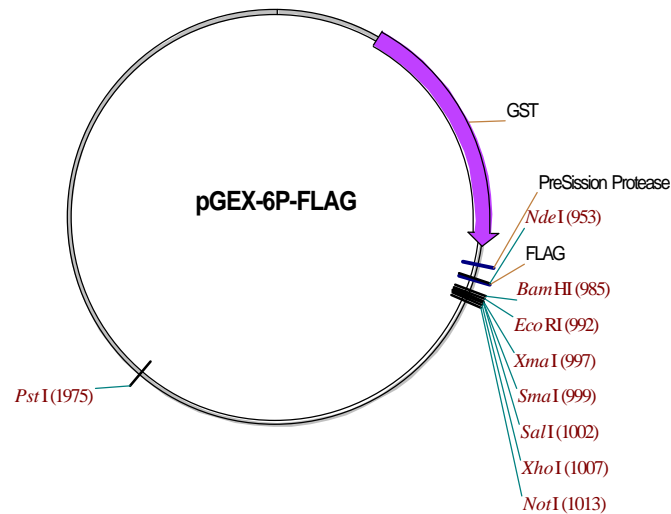


Abbildung 3: pGex-6P1-FLAG mit den kodierenden Sequenzen für GST, für die *PreScission* Protease und das FLAG Epitop

In den Vektor wurden mit den Restriktionsstellen *BamHI* und *NotI* die cDNA-Sequenzen kodierend für Huntingtin Exon 1 mit den nicht pathologischen CAG Wiederholungen (20 und 32), sowie mit pathologischen CAG Wiederholungen (37, 39, 40, 45, 51 und 53) (Scherzinger et al., 1997; Sathasivam et al., 1997) kloniert. Die Vektoren wurden durch DNA-Sequenzierung kontrolliert. So konnten die Plasmide pGEX-1P-FLAG-HD-Exon 1-CAG 20, 32, 37, 39, 40, 45, 51 und 53 erhalten werden. Mit diesen Expressionsvektoren können Glutathion S-Transferase (GST)-Huntingtin Exon 1-Fusionsproteine, die außerdem ein FLAG-Epitop enthalten in *E. coli* hergestellt und durch Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Fusionsproteine werden mit GST-F-HD-Q 20, 32, 37, 39, 40, 45, 51 und 53 bezeichnet. Die Proteinstruktur ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.



Abbildung 4: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der GST-F/M-HD Fusionsproteine

Parallel dazu wurden Proteine verwendet, die statt des FLAG-Epitops ein *c-myc* Epitop (EQKLISEEDL) (Muchowski et al., 2000) enthalten. Diese wurden von Prof. Hartl (MPI für Biochemie, München) konstruiert. Die Vektoren pGEX-1P-MYC-HD-Exon 1-CAG 20, 32, 37, 39, 45 und 52 kodieren für die Fusionsproteine GST-M-HD-Q 20, 32, 37, 39, 45 und 52. Auch für diese ist die Proteinstruktur schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

2.1.2. Expression und Reinigung der GST-Huntingtin Exon 1 Fusionsproteine

Die Proteine wurden, wie in Materialien und Methoden beschrieben, exprimiert und gereinigt. Sie wurden in *E. coli* DH10B produziert und unter nativen Bedingungen über eine Affinitätschromatographiesäule mit Glutathion-Agarose gereinigt (Scherzinger et al., 1997). Zur Analyse wurden jeweils 1,5 mg gereinigtes Protein auf einem 12% SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt bzw. geblottet.

Im SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung konnten, wie in Abbildung 5 zu sehen ist, die gereinigten Proteine GST-F-HD-Q 20, 32, 37, 39, 40, 45, 51, 53 und GST-M-HD-Q 20, 32, 37, 39, 45, 52 mit den Molekulargewichten zwischen 42 und 62 kDa angefärbt werden. Dabei sind neben den Hauptbanden der Proteine auch Abbaubanden zu sehen. Die ermittelten Molekulargewichte stimmen mit den über die Aminosäuresequenzen berechneten Werten überein. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, konnten die Proteine auch im Western Blot mit dem für das jeweilige Epitop spezifischen anti-FLAG- bzw. anti-myc-Antikörper nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten alle Proteine auch mit dem für Huntingtin spezifischen anti-CAG-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 5).

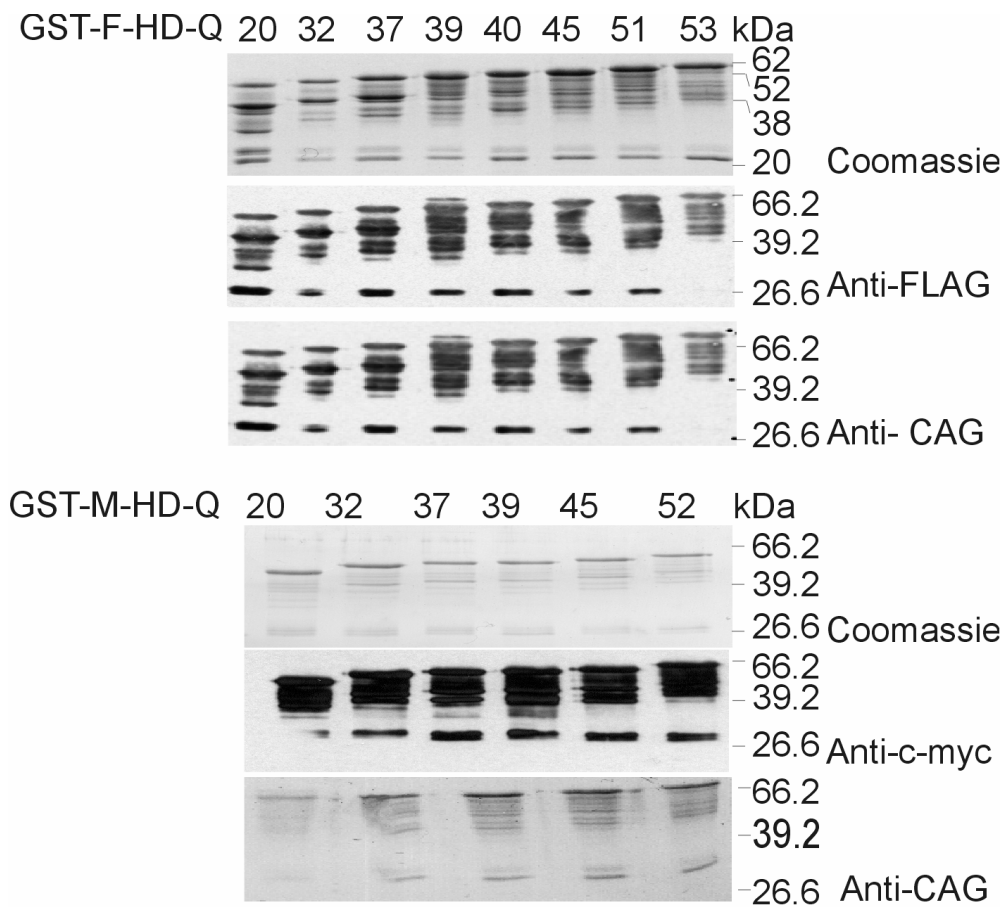


Abbildung 5: SDS-Gel und Western Blot zur Analyse der GST-M/F-HD Fusionsproteine

In den oberen Bereichen des Ladegels, in den Taschen des SDS-Gels und im Western Blot wurden keine Banden mit sehr hohen Molekulargewichten detektiert. Es waren also keine Huntingtin-Aggregate nachweisbar (nicht gezeigt).

Es wurde überprüft, ob Proteine mit dem *myc*-Epitop nicht unspezifisch vom anti-FLAG-Antikörper erkannt wurden und umgekehrt. Dazu wurden je 1,5 mg Protein GST-F-HD-Q 20, GST-F-HD-Q 53, GST-M-HD-Q 20 und GST-M-HD-Q 53 Western geblottet und mit anti-FLAG-Antikörper oder anti-*myc*-Antikörper inkubiert. Abbildung 6 zeigt, dass die Proteine GST-F-HD-Q 20 und GST-F-HD-Q 53 spezifisch mit dem anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen wurden, während die Proteine GST-M-HD-Q 20 und GST-M-HD-Q 53 spezifisch mit dem anti-*myc*-Antikörper nachgewiesen wurden. Keine Kreuzreaktionen konnten beobachtet werden (Abbildung 6).

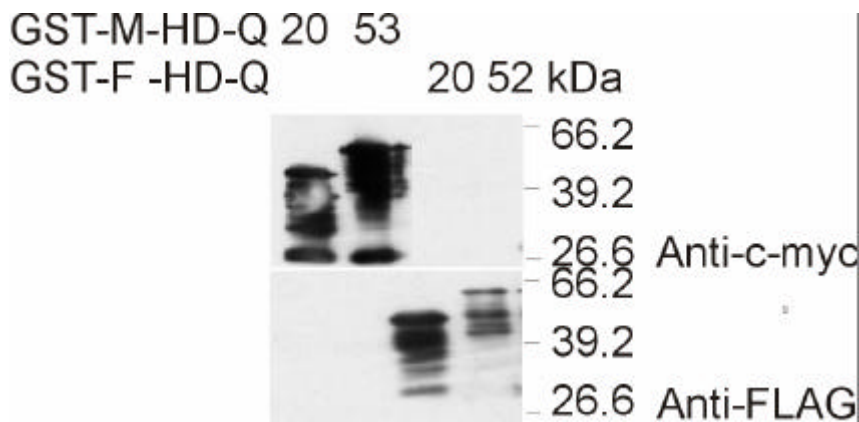


Abbildung 6: Spezifische Antikörpererkennung der GST-M/F-HD Fusionsproteine.

2.1.3. Etablierung eines Assays der Huntingtin Exon 1 Aggregation *in vitro*

Zur Analyse der Huntingtin-Aggregation wurde von Scherzinger und Kollegen der Filtertest etabliert (Scherzinger et al., 1997). Nach einer proteolytischen Spaltung von GST-HD Fusionsproteinen entstehen Huntingtin-Aggregate. Auf einer Celluloseacetatmembran werden SDS-unlösliche Aggregate aus polymerem Huntingtin zurückgehalten, SDS-lösliche Huntingtin-Monomere dagegen passieren die Membran.

Zunächst wurde die proteolytische Spaltung aller in 2.1.1. beschriebenen, gereinigten Fusionsproteine mit der *PreSission*[®] Protease untersucht. Die *PreSission*[®] Protease proteolysiert, wie in Abbildung 4 zu sehen ist genau zwischen dem GST-Anteil und dem mit FLAG bzw. *myc* Epitop versehenen Huntingtin Exon 1. Dabei sind je 1,5 mg der GST-F-HD Fusionsproteine aufgetragen und nach dem Westernblot mit dem anti-AGG-Antikörper nachgewiesen worden.

In Abbildung 7 sieht man je 1,5 mg GST-F-HD-Q 20, 32, 37, 39, 40, 45, 51, und 53 vor dem Verdau. Nachweisbar ist jeweils eine Bande der GST-F-HD Fusionsproteine zwischen 42 und 62 kDa. Analoge Proben wurde mit der *PreSission*[®] Protease an der Schnittstelle zwischen GST und dem mit Epitop versehenen Huntingtin Exon 1 proteolysiert. Eine Inkubation unter den angegebenen Pufferbedingungen des Herstellers, 8 °C und mit einer *PreSission*[®] Protease Konzentration von 0,1 U führte zu einer nahezu quantitativen Abspaltung des GSTs. In Abbildung 7 sind die Banden der GST-F-HD

Fusionsproteine zwischen 42 und 62 kDa nur noch schwach zu detektieren. Zusätzlich zu den GST-Fusionsproteinbanden sind die Banden von F-HD-Q 20, 32, 37, 39, 40, 45, 51, und 53 zwischen 16 und 36 kDa gut nachweisbar.

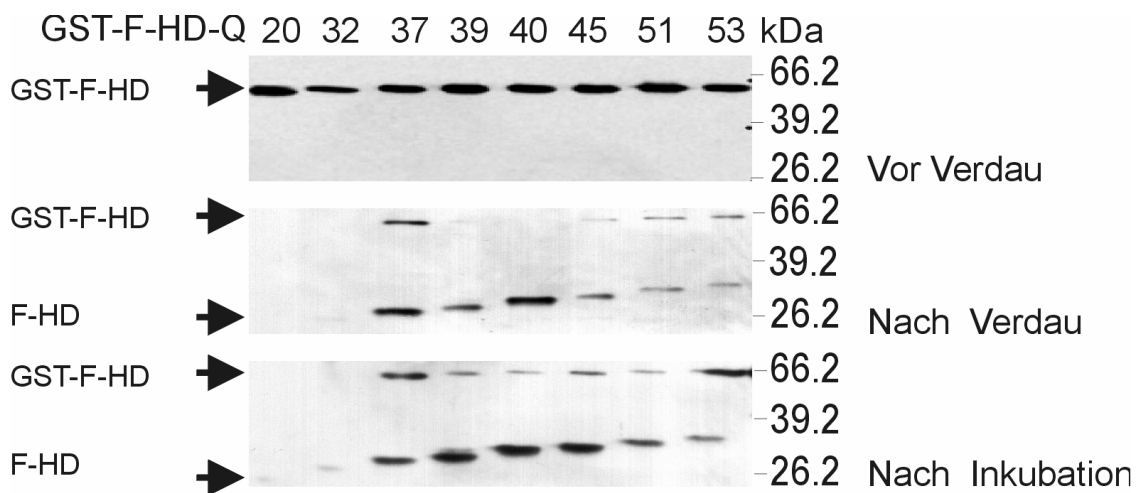


Abbildung 7: Analyse der proteolytischen Spaltung von GST-F-HD Fusionsproteinen. Die Proteine vor und nach Verdau und nach der Inkubation sind gezeigt. Dabei wurden je 1,5 mg der GST-F-HD Fusionsproteine aufgetragen und nach dem Westernblot mit dem anti-AGG-Antikörper nachgewiesen.

Nach dem Verdau mit der *PreSission*[®] Protease wurden die Proben auf 37 °C erwärmt und so die Aggregation der Proteine gestartet. Auch nach der Inkubation konnten die Fusionsproteine und die gespaltenen F-HD-Proteine nachgewiesen werden. F-HD-Q 20 und 32 sind nur sehr schwach zu detektieren. Möglicherweise transferieren diese normalen Polyglutamindomänen schlecht im Western Blot. Bei den F-HD-Q 37, 39, 40, 45, 51, und 53 sind die Monomerbanden bei gleichem Fusionsproteinanteil zunehmend schwächer nachweisbar. Es ist möglich, dass die Monomere mit zunehmend langer Polyglutamindomäne stärker aggregieren und dann nicht mehr als Monomerbanden nachweisbar sind.

Der hier benutzte anti-AGG-Antikörper erkennt kein GST, sondern nur ein Epitop in der Polyprolindomäne des Huntingtin-Exon 1. In hier nicht gezeigten SDS-Gelen und im Western Blot mit anti-CAG-Antikörper wurde nach dem Verdau immer eine Bande bei 26 kDa, die dem GST-Anteil entspricht, nachgewiesen.

Nach der Proteolyse wurde die Aggregation der in 2.1.1. beschriebenen, gereinigten Fusionsproteine analysiert. Die Proben vor dem Verdau, nach dem Verdau und nach der Inkubation bei 37 °C für 16 h wurden dem einfachen und sehr empfindlichen Filtertest (s.o.) unterzogen. Mit diesem Filtertest kann man die Bildung von hochmolekularen unlöslichen Proteinaggregaten nachweisen. Von zwei unabhängigen Proben wurden je 200 µg und 400 µg GST-F-HD-Q 20, 39 und 53 Protein unverdaut auf Filter aufgetragen. Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, aggregieren die ungespaltenen Fusionsproteine unter physiologischen Bedingungen nicht.

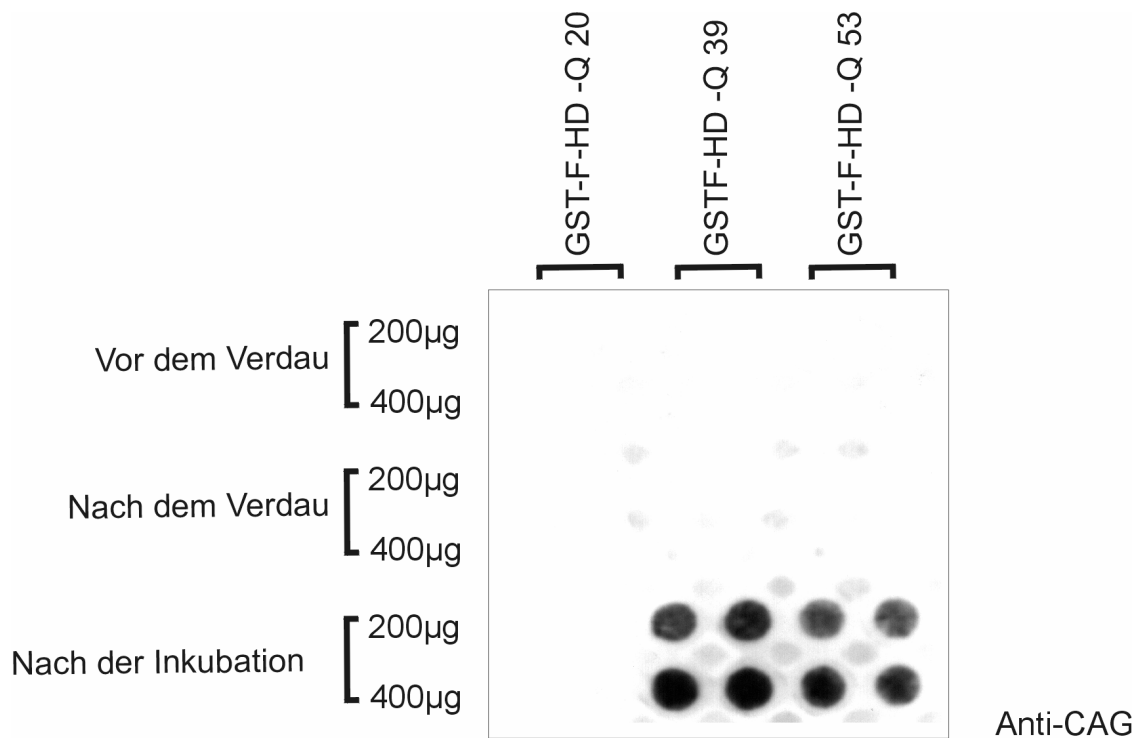


Abbildung 8: Analyse der Aggregation von F-HD-Q 20, 39 und 53 mit dem Filtertest. Von zwei unabhängigen Proben wurden je 200 µg und 400 µg Protein von GST-F-HD-Q 20, 39 und 53 vor und nach dem Verdau sowie nach der Inkubation aufgetragen und die Aggregate mit dem anti-CAG-Antikörper nachgewiesen.

Wie oben beschrieben wurden GST-F-HD-Q 20, 39 und 53 mit der *PreSission* Protease verdaut und bei 37 °C für 16 h inkubiert. Von zwei unabhängigen Proben wurden je 200 µg und 400 µg Protein dem Filtertest unterzogen (Abbildung 8). Erst die Abspaltung des GST-Anteils von Huntingtin Exon 1 und die Inkubation bei 37 °C induziert die Aggregation. Darüber hinaus ist zur Aggregation eine pathologische Länge der

Polyglutamindomäne nötig. Wie bei den Konstrukten von Scherzinger et al. (1997) war bei den F-HD-Proteinen eine Polyglutamindomäne von mindestens 39 Glutaminen nötig, um Aggregate zu bilden. Dies entspricht dem pathologischen Schwellenwert, d.h. einer pathologischen Polyglutamindomäne mit mehr als 39 Glutaminen.

Das FLAG-Epitop hat keinen Einfluß auf die Aggregation der Huntingtin Konstrukte, wie man im Vergleich mit den Ergebnissen bei Scherzinger und Kollegen sehen kann (Scherzinger et al., 1997). Die Konstrukte mit *myc*-Epitop wiesen ein analoges Verhalten auf (Ergebnisse nicht gezeigt). Das war Voraussetzung für eine kinetische Analyse der Aggregation von Huntingtin Exon 1.

2.1.4. Strukturanalyse der Aggregate

Die Strukturen von FLAG-Huntingtin Exon 1-Proteinen mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Dafür wurden Tropfen GST-F-HD-Q 20 und GST-F-HD-Q 53 mit einer Konzentration von 400 µg/ml auf einen Kohlefilm aufgetragen, mit Ammoniummolybdat negativ gefärbt und auf ein Kupfergitter aufgetragen. Die Proben konnten dann im Elektronenmikroskop analysiert werden. Vor der proteolytischen Spaltung der Proteine GST-F-HD-Q 20 und GST-F-HD 53 konnten nur oligomere Partikel von ca. 6-7 nm Durchmesser aber keine Aggregate nachgewiesen werden (Abbildung 9, A und C). Nachfolgend wurden die Proteine GST-F-HD-Q 20 und GST-F-HD-Q 53 dann, wie 2.1.2. beschrieben, mit *PreSission* \hat{O} Protease verdaut, für 16 h bei 37 °C inkubiert und für die Elektronenmikroskopie aufbereitet. Nach der proteolytischen Spaltung und Inkubation von GST-F-HD-Q 20 (Abbildung 9, B) konnten keine Fibrillen oder andere hochmolekulare Strukturen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu traten nach der proteolytischen Spaltung und Inkubation von GST-F-HD-Q 53 Fibrillen auf (Abbildung 9, D). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit den GST-M-HD-Proteinen erhalten (Daten nicht gezeigt). Morphologisch entsprechen dabei die Fibrillen aus den HD-Fusionsproteinen mit Epitopen genau denen, die auch von Scherzinger beobachtet wurden (Scherzinger et al., 1997)

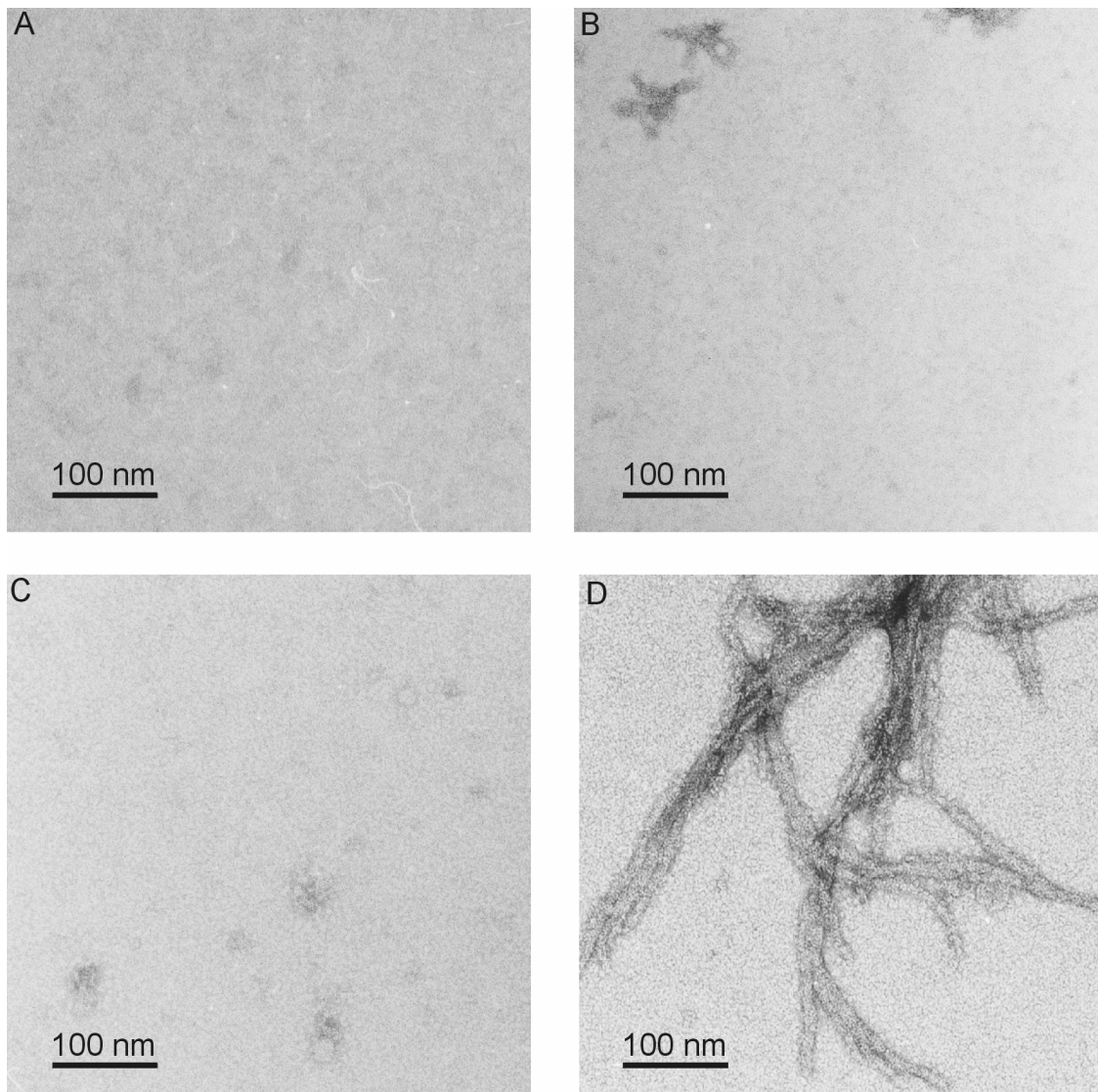


Abbildung 9: Untersuchung der Huntingtin Exon 1 Aggregate mittels Elektronenmikroskopie. Gezeigt sind die Fusionsproteine GST-F-HD mit 20 (A) und 53 Glutaminen (C) und F-HD-Q 20 (B) und F-HD-Q-50 (D) nach dem Verdau mit der *PreSission*[®] Protease und Inkubation bei 37 °C für 16 h.

2.1.5. Längen- und Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation

Es wurde von Scherzinger et al. (1999) gezeigt, dass die Aggregation von Huntingtin Exon 1 ein keimabhängiger Polymerisationsprozess ist. In dieser Arbeit wurden vier Charakteristika untersucht, um diese Annahme für die GST-F-HD Fusionsproteine zu bestätigen: Für den Beginn einer keimabhängigen Polymerisation würde die

Überschreitung einer kritischen Konzentration nötig sein. Die Polymerisation würde nicht sofort beginnen, sondern erst nach einer bestimmten Zeit, der lag-Phase, in der sich die Keime bilden. Diese lag-Phase wäre von der Konzentration abhängig. Je höher die Konzentration von Huntingtin Exon 1 wäre, desto kürzer wäre die lag-Phase. Durch die Zugabe von exogenen Keimen könnte bei einem keimabhängigen Polymerisationsprozess die lag-Phase verkürzt werden. Keimbildung wäre dabei der limitierende Schritt für die Aggregation (Jarret et al., 1993).

Die Aggregation ist abhängig von der Länge der Polyglutamindomäne. Erst wenn eine Länge von 37 Glutaminen überschritten wird, aggregiert Huntingtin Exon 1 (Scherzinger et al., 1999). Man spricht von einem pathologischen Schwellenwert. Ein sinnvolles *in vitro* System sollte diesen Aspekt widerspiegeln können.

Um die Längen- und Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation für FLAG-Huntingtin Exon 1 zu überprüfen, wurde die Proteinserie von GST-F-HD mit verschiedenen langen Polyglutamindomänen in verschiedenen Konzentrationen mit der *PreSission* \hat{O} Protease verdaut und nach der Inkubation bei 37 °C für 16 h denaturiert. Die Konzentrationen im Test waren 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 µg/ml Protein und sind in der Abbildung 10 (links) angegeben. Aufgetragen wurde zur besseren Vergleichbarkeit immer die gleiche Menge von Protein, sprich 400 µg Protein pro Punkt. Die Proben wurden dem Filtertest unterzogen und die Aggregate auf der Membran mit dem anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen.

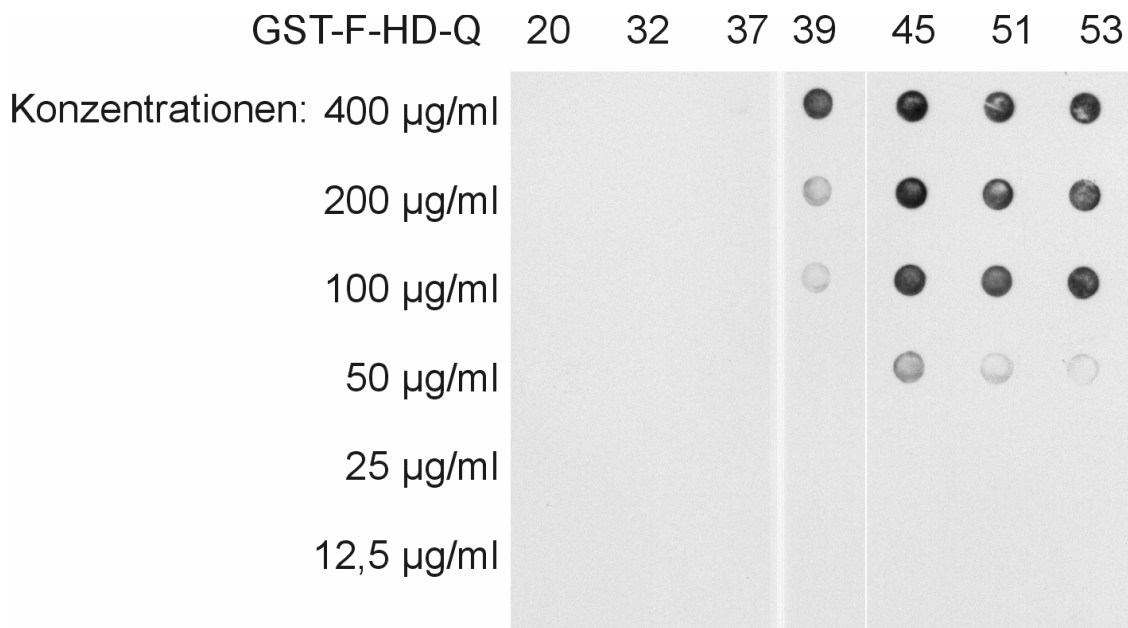


Abbildung 10: Längen- und Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation von FLAG-Huntingtin-Exon 1 mit verschiedenen langen Polyglutamindomänen. Je 400 µg Protein pro Punkt wurde aufgetragen.

Mit keinem der getesteten Proteine konnten Aggregate unterhalb von Konzentrationen von 50 µg/ml Protein auf dem Filter nachgewiesen werden. Die Proben von GST-F-HD-Q 39, 45, 51, 53 zeigten ab einer Konzentration von 100 µg/ml Protein besonders starke Aggregation. GST-F-HD-Q 20, 32 oder 37 zeigten hingegen selbst bei erhöhten Konzentrationen von 400 µg/ml Protein keine Aggregation. Es konnte also nachgewiesen werden, dass die Aggregation der F-HD Konstrukte *in vitro* sowohl abhängig von der Länge der Polyglutamindomäne als auch von der Proteinkonzentration ist. Dies entspricht den Ergebnissen von Scherzinger und Kollegen (Scherzinger et al., 1999).

2.1.6. Die Kinetik der Bildung von Aggregaten

Um den Zeitverlauf der Bildung von Aggregaten aus Huntingtin Exon 1 zu untersuchen, wurde dreimal unabhängig 50 µg/ml GST-FHD-Q 53 wie in 2.1.2. beschrieben verdaut. Die Aggregation wurde durch Erwärmung auf 37 °C gestartet. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten denaturiert und im Filtertest eingesetzt. Die Aggregate wurden mit dem anti-FLAG-Antikörper detektiert, digitalisiert und quantifiziert. Das minimale Signal wurde 0% Aggregation, das maximale Signal wurde 100% Aggregation

gleichgesetzt. Die daraus berechneten Werte wurden mit Standardabweichungen in Abhängigkeit zur Zeit in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

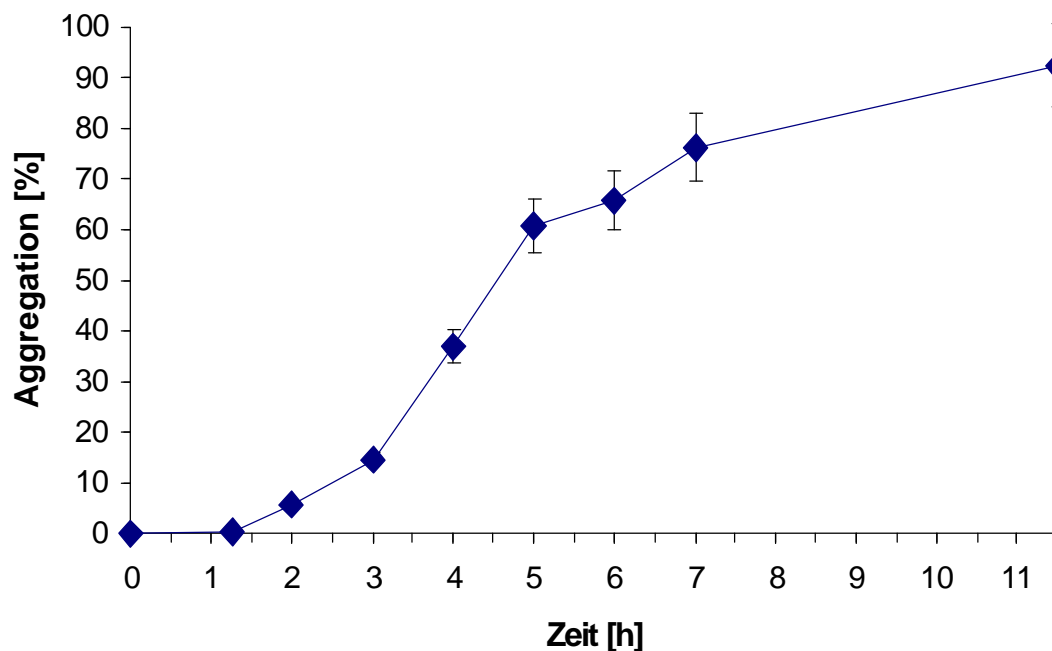


Abbildung 11: Untersuchung der F-HD-Q 53 Aggregationskinetik mit der Filtrationsmethode

Die Aggregation von F-HD-Q 53 zeigt *in vitro* den typischen Zeitverlauf einer keimabhängigen Polymerisation. Erst nach einer lag-Phase (0-1 h) beginnt die exponentielle Aggregation (1-5 h) und endet in einem Plateau, dem steady-state (6-11 h).

2.1.7. Aggregation von Huntingtin Exon 1 nach der Zugabe von Aggregationskeimen

Wenn die Aggregation von Huntingtin Exon 1 eine keimabhängige Polymerisation ist, sollte durch die Zugabe von exogenen Keimen die lag-Phase umgangen werden können (Wood et al., 1999). Die Verlängerungsphase der Fibrillen könnte dann sofort beginnen. Um zu testen, ob auch dieses Kriterium einer keimabhängigen Polymerisation erfüllt wird, wurden exogene Aggregationskeime hergestellt.

Dazu wurde GST-M-HD-Q 52 mit der *PreSission*TM Protease verdaut und bei 37 °C für 20 h inkubiert. Anschließend wurden die Aggregate durch Ultraschall zu

Aggregationskeimen fragmentiert. Die Aggregationskeime waren dann nicht mehr mit dem Filtrertest nachweisbar. Elektronenmikroskopisch ließen sich nur noch kurze Fragmente erkennen (Daten nicht gezeigt).

Wie für Abbildung 11 beschrieben wurden in 3 unabhängigen Versuchen 50 µg/ml GST-F-HD-Q 53 mit der *PreSission*TM Protease verdaut. Zusätzlich wurden jeweils die oben beschriebenen Aggregationskeime aus M-HD-Q 52 gewichtsprozentbezogen von 0% bis 5% des löslichen GST-F-HD-Q 53 Proteins zugegeben. Nach dem Start der Aggregation durch Erwärmung auf 37 °C wurden Proben zu den angegebenen Zeitpunkten denaturiert und im Filtrertest untersucht. Die Aggregate wurden mit dem anti-FLAG-Antikörper detektiert, digitalisiert und quantifiziert. Die Benutzung des anti-FLAG-Antikörpers führt zu einer ausschließlichen Detektion der Aggregate aus F-HD-Q 52. Das minimale Signal wurde 0% Aggregation, das maximale Signal wurde 100% Aggregation gleichgesetzt. Die daraus berechneten Werte wurden mit Standardabweichungen in Abhängigkeit zur Zeit in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

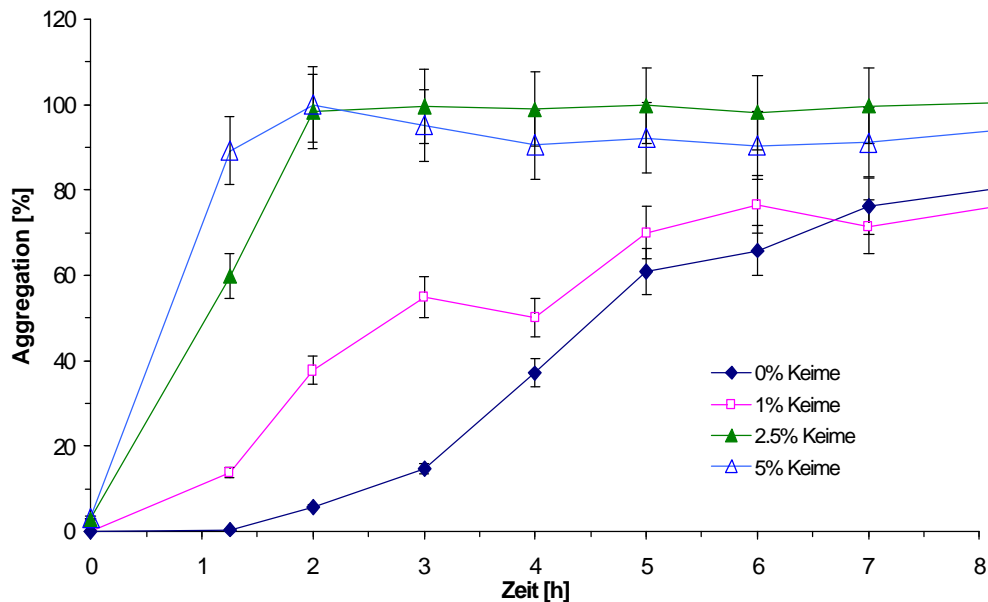


Abbildung 12: Untersuchung der F-HD-Q 53 Aggregation mit der Filtrationsmethode nach Zugabe von M-HD-Q 52 Aggregationskeimen

Die Zugabe von Aggregationskeimen führte zu einer Verkürzung der lag-Phase bei der Aggregation von F-HD-Q 53. Die Rate der Aggregation des löslichen FLAG-Huntingtin Exon 1 ist von der Konzentration der zugesetzten Keime abhängig. Aus den Daten der

Abbildung 12 kann man ersehen, wieviel Zeit es erfordert, um 50% des löslichen Anfangsmaterials aggregieren zu lassen ($t_{1/2}$) was einen quantitativen Vergleich der Keimeffizienz erlaubt. Bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ löslichen Proteins während der Aggregation, unter den Bedingungen wie sie unter 2.1.2. beschrieben sind, aggregiert FLAG-Huntingtin Exon 1 mit einer Polyglutamindomäne von 53 Glutaminen mit einer Halbwertszeit von 4,5 h. Mit bereits 1 % Keimen verkürzt sich die Halbwertszeit auf 4 h, bei 2,5 % Keimen auf 1 h und bei 5 % Keimen auf 0,7 h. Der Zeitverlauf der Aggregation zeigt eine Verkürzung der lag-Phase durch Zugabe von Aggregationskeimen. Bei höheren Keimkonzentrationen ist keine lag-Phase zu beobachten.

2.1.8. Kinetik des Fibrillenwachstums

Wenn ein Keim vorhanden ist, sei es durch Neubildung oder durch exogene Zugabe, können sich nach dem Modell der keimabhängigen Polymerisation die Fibrillen durch Anlagerung von löslichem Huntingtin Exon 1 an die Strukturen dieser Keime verlängern. Dieser Prozeß sollte in Abhängigkeit von der Konzentration des löslichen Proteinanteils verlaufen (Wood et al., 1999).

Das Fibrillenwachstum wurde untersucht, indem die Verlängerung von M-HD-Q-52 Aggregationskeimen mit F-HD-Q-53 analysiert wurde. Dazu wurden in jeweils drei unabhängigen Proben M-HD-Q-52 Aggregationskeime (1 $\mu\text{g/ml}$ Protein) vorgelegt. Nach Zugabe von 25, 75, 125, 150 $\mu\text{g/ml}$ GST-F-HD-Q 53 wurde verdaut und bei 37 °C inkubiert. Die Menge der sich bildenden F-HD-Q-53 Aggregate wurde, wie unter 2.1.5. beschrieben, zu definierten Zeitpunkten mit dem Filtertest bestimmt und graphisch aufgetragen.

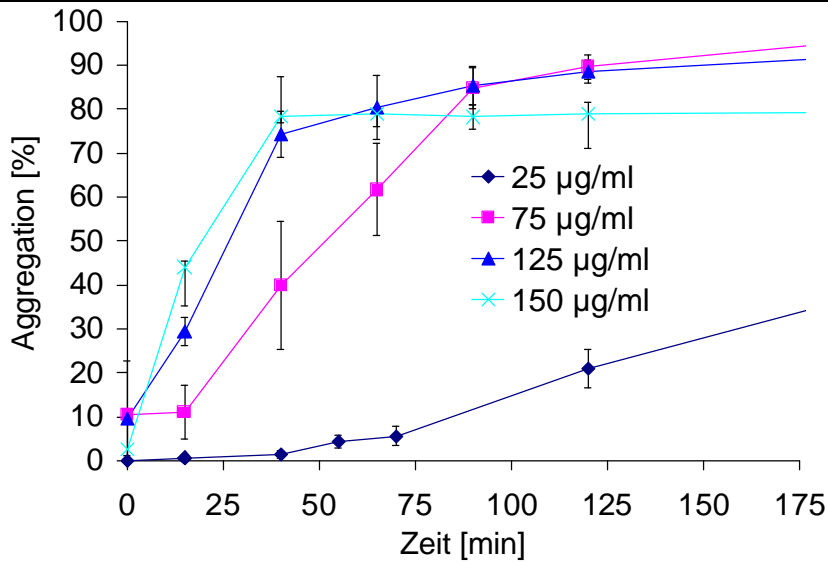


Abbildung 13: Analyse des Fibrillenwachstums von M-HD-Q-52 (1 µg/ml) bei unterschiedlichen Konzentrationen von F-HD-Q-53.

In Tabelle 2 sind die aus Abbildung 13 ermittelten Anfangsraten der Aggregation berechnet aus der Steigung der Geraden im linearen Wachstumsbereich zusammengefaßt.

| Konzentration F-HD-Q-53 [µg/ml] | Anfangsraten |
|---------------------------------|--------------|
| 25 | 0,22 |
| 50 | 0,21 |
| 75 | 0,53 |
| 100 | 0,38 |
| 125 | 1,64 |
| 150 | 1,84 |

Tabelle 2: Berechnete Anfangsraten des Fibrillenwachstums von M-HD-Q-52 (1 µg/ml) in Abhängigkeit von der Konzentration von F-HD-Q-53.

Die Anfangsraten der Aggregation von F-HD-Q 53 waren bei allen getesteten Konzentrationen linear. Erst durch die abnehmende Konzentration von löslichem Protein wurde die Reaktion verlangsamt und kam zum Stillstand. Für den keimabhängigen

Polymerisationsprozeß sind die Raten der Aggregation bei vorgegebenen Keimkonzentration proportional zur Geschwindigkeit der Fibrillenbildung. Die Verlängerungsraten wurden aus mehreren Experimenten, die aufgrund besserer Übersichtlichkeit nicht alle in Abbildung 13 dargestellt sind, berechnet und gegen die Anfangskonzentration des löslichen Proteins auftragen (siehe Abbildung 14)

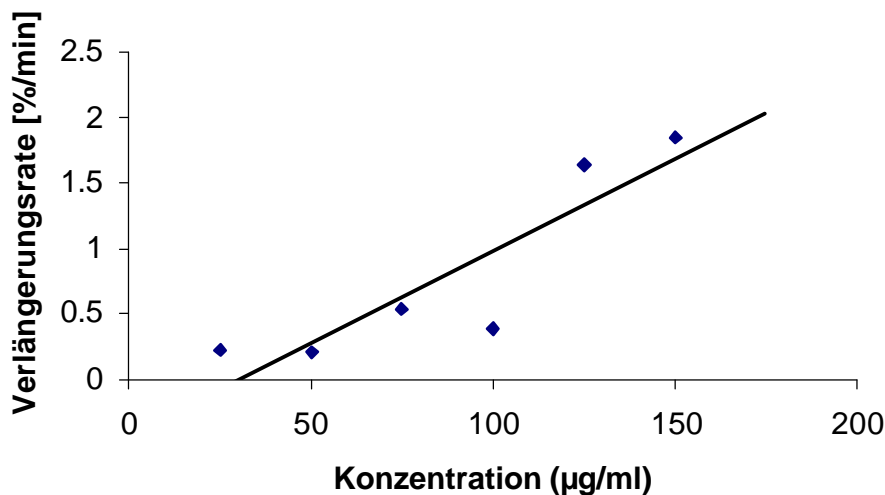


Abbildung 14: Die Verlängerungsraten von M-HD-Q-52 (1 µg/ml) in Abhängigkeit zur Konzentration von F-HD-Q-53.

Die dabei zu beobachtende lineare Abhängigkeit der Verlängerungsraten von der Ausgangskonzentration des löslichen Proteins legt nahe, dass die Verlängerung von Huntingtin-Fibrillen einer Kinetik erster Ordnung gehorcht. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit α -Synuclein Fibrillen beschrieben (Wood et al., 1999).

2.1.9. Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit unterschiedlich langen Polyglutaminomänen

Mit dem oben beschriebenen *in vitro* System wird untersucht, ob Huntingtin Exon 1 mit pathologischen und normalen Polyglutaminomänen coaggregiert. Dazu wurden 50 µg/ml GST-F-HD-Q 20, 32 oder 37 mit 50 µg/ml GST-M-HD-Q 20 bzw. 50 µg/ml GST-M-HD-Q 55 gemischt und mit 0,1 U *PreSission*® Protease für 2 h bei 8 °C verdaut. Nach der Inkubation für 16 h bei 37 °C wurden je 100 µg bzw. 200 µg von je zwei

unabhängigen Experimenten auf einen Filter aufgetragen. Die Aggregate wurden jeweils mit dem anti-CAG-, anti-FLAG- bzw. anti-*myc*-Antikörper nachgewiesen.

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist aggregiert M-HD-Q 52, dagegen aggregiert M-HD-Q 20 nicht. In den Mischungen von F-HD-Q 20, 32 oder 37 mit M-HD-Q 20 konnten mit keinem der Antikörpern Aggregate nachgewiesen werden. In den Mischungen von F-HD-Q 20, 32 oder 37 mit M-HD-Q 52 können Aggregate mit dem anti-CAG-, anti-FLAG- bzw. anti-*myc*-Antikörper nachgewiesen werden.

Man kann Stimulation der Aggregation von F-HD-Q 20, 32 oder 37 durch die Anwesenheit von M-HD-Q 52 erkennen. Dabei läßt sich eine Polyglutaminlängenabhängige Zunahme der Coaggregation unabhängig vom jeweiligen Epitop feststellen (Abbildung 15). Ein Effekt auf die Aggregation von F-HD-Q 20, 32 oder 37 nur aufgrund einer Konzentrationsänderung kann durch den Versuch mit M-HD-Q 20 ausgeschlossen werden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Huntingtin Exon 1 mit normaler Polyglutamin-domäne mit Aggregaten aus Huntingtin Exon 1 mit langer pathologischer Polyglutamin-domäne coaggregiert. Diese Aggregate sind selbst nach der Denaturierung der Proben stabil und nachweisbar. Die SDS-Stabilität ist ein Hinweis auf eine stabile, strukturelle Integration der Proteine F-HD-Q 20, 32 oder 37 in M-HD-Q52 Aggregate.

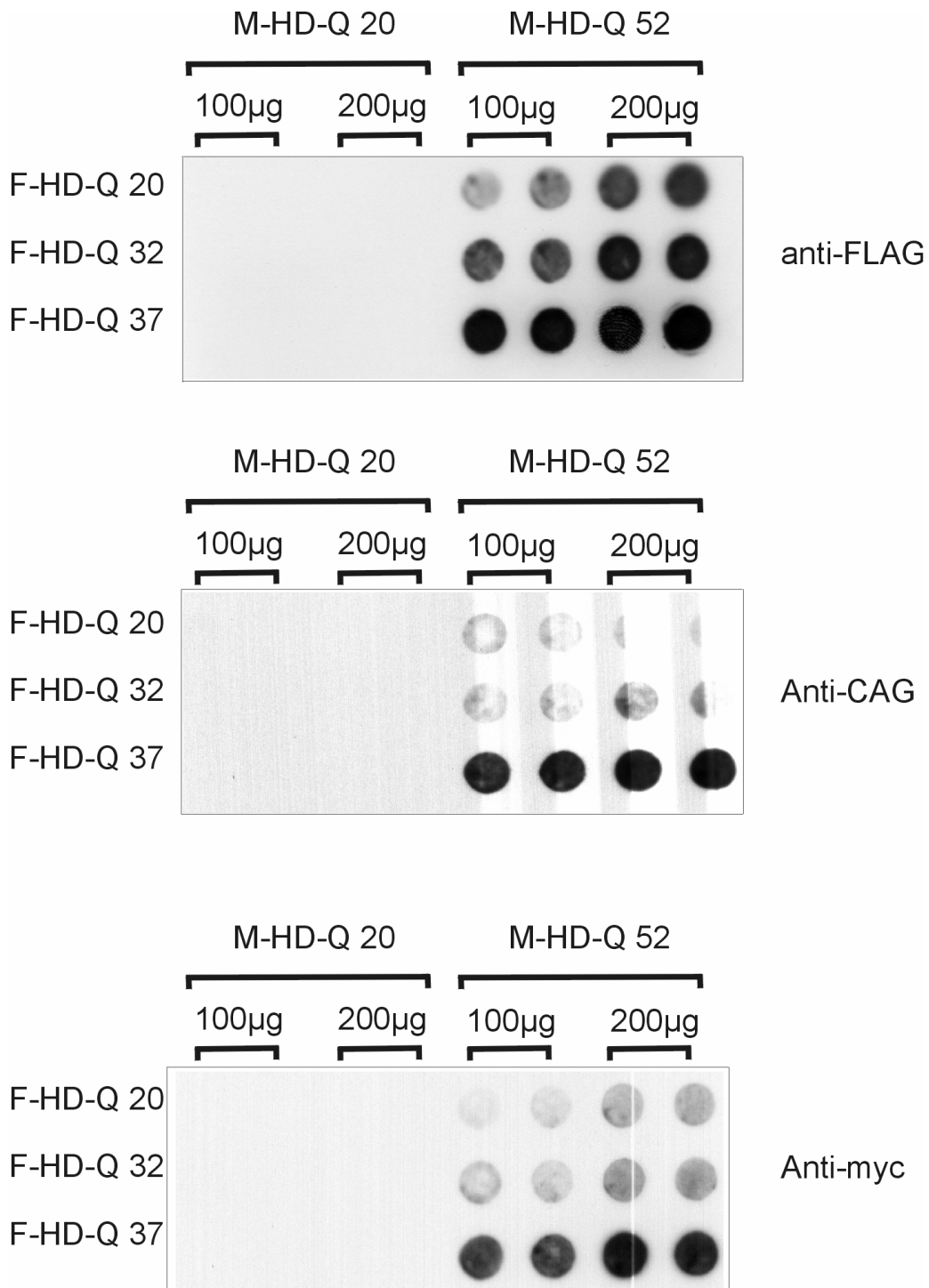


Abbildung 15: Analyse der Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen mittels der Filtrationsmethode. Je 100 µg bzw. 200 µg Protein wurden von je zwei unabhängigen Experimenten auf den Filter aufgetragen. Die Aggregate wurden jeweils mit dem anti-CAG-, anti-FLAG- bzw. anti-*myc*-Antikörper nachgewiesen.

2.1.10. Strukturanalyse der gemischten Aggregate

Elektronenmikroskopisch wurden gemischte und nicht gemischte Fibrillen untersucht. Dazu wurde 50 µg/ml F-HD-Q 20 mit 50 µg/ml M-HD-Q 52 gemischt. Kontrolle war 100 µg/ml M-HD-Q 52 allein. Die Proben wurden mit 0,1 U der *PreSission* Protease für 1h bei 8 °C verdaut und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen Aggregate wurden, wie unter Materialien und Methoden beschrieben, gewaschen und mit polyklonalem anti-FLAG-Antikörper aus Kaninchen und monoklonalem anti-*myc*-Antikörper aus Mäusen inkubiert. Danach wurden die Proben mit Gold-markierten sekundären Antikörpern mit je 10 nm großen Goldkörnern (gegen Kaninchenantikörper, schwarze Pfeile in Abbildung 16) und 5 nm großen Goldkörnern (gegen Mausantikörper, weiße Pfeile in Abbildung 16) inkubiert. Nach Negativfärbung mit 2 % Ammoniummolybdat und anschließender Präparation wurden die Proben im Elektronenmikroskop untersucht.

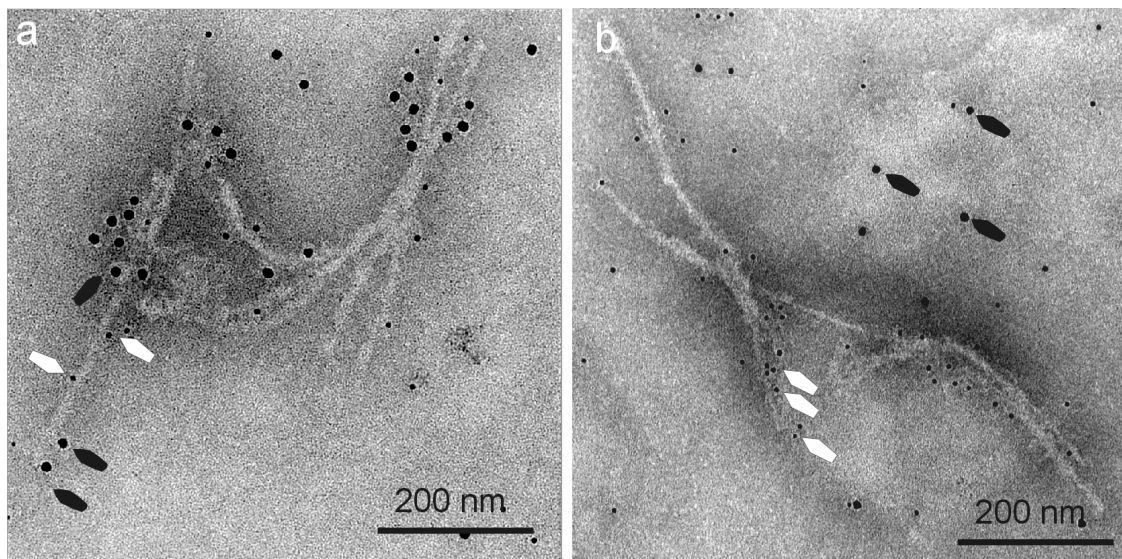


Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Analyse von gemischten und ungemischten Huntingtin-Aggregaten. a: Gemischte Fibrillen in denen F-HD-Q 20 mit 10 nm großen Goldkörnern (schwarze Pfeile, anti-FLAG-Antikörper) und M-HD-Q 52 mit 5 nm großen Goldkörnern (weiße Pfeile, anti-*myc*-Antikörper) markiert ist. b: Ungemischte, homologe Fibrillen aus M-HD-Q52 werden ausschließlich mit 5 nm großen Goldkörner markiert (weiße

Pfeile, anti-*myc*-Antikörper), während 10 nm große Goldkörner (schwarze Pfeile, anti-FLAG-Antikörper) im Hintergrund liegen bleiben.

Abbildung 16 b zeigt MHD-Q 52 Fibrillen, die ausschließlich mit anti-*myc*-Antikörper, das heißt mit 5 nm großen Goldkörnern markiert sind (weiße Pfeile). Eine Markierung der Fibrillen mit dem anti-FLAG-Antikörper konnte nicht nachgewiesen werden (schwarze Pfeile). Im Unterschied dazu konnten in Abbildung 16 a in den gemischten Ansätzen auch gemischte Fibrillen nachgewiesen werden, in denen sowohl *myc*- (schwarze Pfeile) als auch FLAG-Epitope (weiße Pfeile) zu sehen sind. Dies zeigt eine Coaggregation der Proteine MHD-Q 52 und FHD-Q 20. Die Ergebnisse unterstützen die vorherigen Ergebnisse aus dem Filtertest (Abbildung 15).

2.1.11. Aggregation von Huntingtin Exon 1 nach Zugabe von heterologen Keimen

Die in 2.1.6 beschriebenen Ergebnisse zeigen die Aggregation von löslichem Huntingtin Exon 1-Protein, dem Keime mit gleicher, pathologischer Polyglutamindomäne zugesetzt wurden. Es ist hier untersucht worden, ob Huntingtin Exon 1 Keime mit pathologischer Polyglutamindomäne auch Keime für die Aggregation von Huntingtin Exon 1 mit nicht pathologischer Polyglutamindomäne sein könnten. Dazu wurden 1 µg/ml (2 Gewichtsprozent) MHD-Q 52 Aggregationskeime zu 50 µg/ml löslichem GST-FHD-Q 20, 32 oder 44 zugegeben. Die Proben wurden mit 0,1 U der *PreSission* Protease 2 h bei 8 °C verdaut und bei 37 °C inkubiert. Nach Denaturierung der Proben zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 100 µg im Filtertest aufgetragen. Die Aggregate wurden mit dem anti-FLAG-Antikörper detektiert, digitalisiert und quantifiziert. Das minimale Signal wurde 0% Aggregation, das maximale Signal wurde 100% Aggregation gleichgesetzt. Die daraus berechneten Werte wurden mit Standardabweichungen in Abhängigkeit zur Zeit in Abbildung 17 graphisch dargestellt.

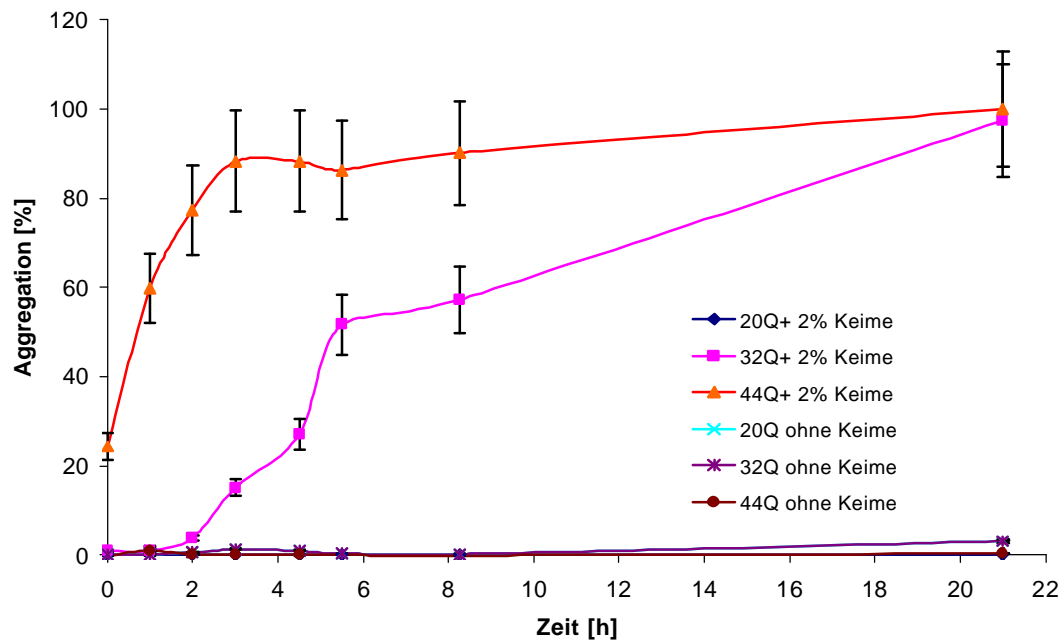


Abbildung 17: Untersuchung der Aggregation von F-HD-Q 20, 32 oder 44 mit und ohne 2% M-HD-Q 52 Aggregationskeimen.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Aggregation des Proteins F-HD-Q 20 (50 µg/ml) nach einer Inkubation von 22 h durch die Zugabe von M-HD-Q 52 Aggregationskeimen nicht signifikant stimuliert wurde. Nach einer längeren Inkubation oder bei höheren Konzentrationen sollte ein Effekt sichtbar sein (siehe Abbildung 15). Im Vergleich dazu wurde die Geschwindigkeit der Aggregation der Proteine F-HD-Q 32 und F-HD-Q 44 (je 50 µg/ml) durch die Zugabe von M-HD-Q 52 Aggregationskeimen beschleunigt (Abbildung 17). Ergebnis ist, dass M-HD-Q 52 Aggregationskeime die Aggregation der Proteine F-HD-Q 32 und F-HD-Q 44 stimulieren. Die Stimulation der Aggregation ist bei F-HD-Q 32 schwächer als bei F-HD-Q 44. Die Geschwindigkeit der Aggregation von F-HD-Q 20, F-HD-Q 32 und F-HD-Q 44 ist abhängig von der Menge der M-HD-Q 52 Aggregationskeime die zugegeben werden (Daten nicht gezeigt).

2.2. Analyse der *in vivo* Aggregation von HD Exon 1 Proteinen in Säugetierzellen

2.2.1. Konstruktion von Plasmiden für die Expression von HD Exon1 Proteinen in Säugetierzellen

Um die Aggregation der HD Exon 1 Proteine mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen *in vivo* zu untersuchen, wurden die cDNA-Fragmente HD Exon 1 Q 17, 20, 32, 37 und 72 in die Expressionsvektoren pTL-HA (Waelter et al., 2000), pEGFP-C1 (Clontech) und pEYGF-C1 (Clontech) kloniert.

pTL-HA ist ein Derivat des Vektors pSG5 mit einem SV 40 early Promotor für die Proteinexpression in Säugetierzellen und einem HA-Epitop für die Detektion von exprimierten Proteinen mit dem monoklonalen anti-HA-Antikörper. pEGFP-C1 und pEYGF-C1 sind Green Fluorescence Fusion (GFP) Gen Fusionsvektoren für Expression und Lokalisation in Säugetierzellen. Das Huntingtin Exon 1 ist am C-Terminus des GFP fusioniert. Der Promotor ist CMV IE.

Die Konstrukte für die Expression der Proteine HA-HD-Q 20, 32, 37, GFP-HD-Q 17 und GFP-HD-Q 72 sind in Tabelle 3 schematisch dargestellt.

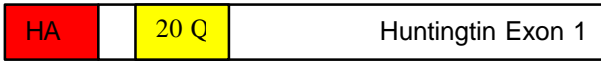
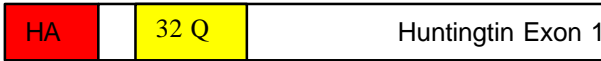
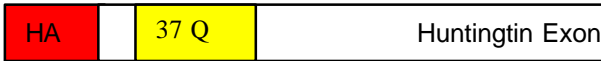
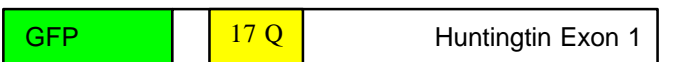

| Vektor: | Proteinname: | Schematische Darstellung der Proteine: |
|-----------------|--------------|--|
| pTL-HA-HD-20Q | HA-HD-Q 20 |  |
| pTL-HA-HD-32Q | HA-HD-Q 32 |  |
| pTL-HA-HD-37Q | HA-HD-Q 37 |  |
| pEYGF-C1-HD 17Q | GFP-HD-Q 17 |  |
| pEGFP-C1-HD 72Q | GFP-HD-Q 72 |  |

Tabelle 3: Schematische Darstellung der Proteine von Huntingtin Exon 1 mit verschiedenen Längen der Polyglutamindomänen in Säugetierzellen.

2.2.2. Untersuchung der Expression der Huntingtin Exon 1 Proteine mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen in Säugetierzellen mittels Western Blots

Für die Proteinexpression wurden pTL-HA-HD-20 Q, pTL-HA-HD-32 Q, pTL-HA-HD-37 Q, pEYGFHD-17 Q und pEGFP-HD-72 Q in COS1 Zellen mit Calciumchlorid-Präzipitaten oder mit Lipofectin® nach Angaben des Herstellers transfektiert. Nach 40-44 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteinkonzentration der Extrakte bestimmt. Je 0,03 mg Gesamtprotein wurde auf einem SDS-Gel aufgetragen und die exprimierten Proteine nach einem Western Blot mit dem anti-HA- bzw. anti-CAG-Antikörper nachgewiesen.

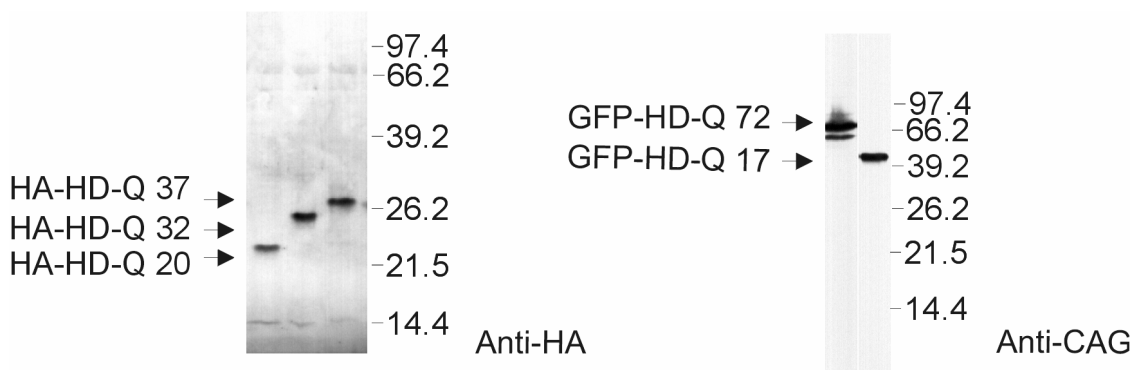


Abbildung 18: Analyse der Expression der HD Exon 1 Proteinen mit unterschiedlichen Polyglutamindomänen in Säugetierzellen. Je 0,03 mg Gesamtprotein wurde mit dem SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die exprimierten Proteine wurden mit dem anti-HA- bzw. mit dem anti-CAG-Antikörper nachgewiesen

Die exprimierten Proteine GFP-HD-Q 72 bzw. GFP-HD-Q 17 liefen entsprechend ihrem berechneten Molekulargewicht von 35 bzw. 28 kDa. Die exprimierten Proteine HA-HD-Q 20, 32 und 37 wiesen ebenfalls entsprechend den berechneten Werten Molekulargewichte zwischen 23 und 27 kDa auf. Zum Nachweis des HA-Epitops mußten die Zellen 8 h vor der Ernte mit ALLN, einem Inhibitor des Proteasoms behandelt werden. Das Epitop scheint ein besonders gutes Substrat für den proteasomalen Abbau zu bilden und wurde deswegen besonders schnell abgebaut. Alle rekombinanten Proteine ließen sich mit den Huntingtin-spezifischen anti-HD1- und anti-CAG-Antikörpern nachweisen. In den zur Kontrolle nicht transfektierten Zellen konnten keine

unspezifischen Reaktionen der anti-HD- oder anti-HA-Antikörper nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten).

2.2.3. Untersuchung der Expression der Huntingtin Exon 1 Proteine mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen in Säugetierzellen mittels Immunofluoreszenz

Die Proteinexpression wurde mittels Immunofluoreszenzmikroskopie untersucht. Für die Proteinexpression wurden pTL-HA-HD-20Q, pTL-HA-HD-32Q, pTL-HA-HD-37Q, pEYGFHD-17Q und pEGFP-HD-72Q in COS1 Zellen mit Lipofectin® nach Angaben des Herstellers transfektiert. Nach 40-44 h Inkubation wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd fixiert und die Zellmembranen mit PBS-T permeabilisiert. Die Proteine HA-HD-Q 20, 32, oder 37 wurden mit dem Anti-HA-Antikörper und dem, mit fluoreszierendem Farbstoff Cy3 gekoppelten, anti-Maus-Antikörper, der eine rote Fluoreszenz zeigt, markiert. GFP-HD-Q 72 bzw. GFP-HD-Q 17 wurden durch Eigenfluoreszenz, die grün ist, nachgewiesen. Die Kerne wurden immer zusätzlich mit DAPI, einem DNA-Interkalierer, blau angefärbt.

Abbildung 19 zeigt homogene cytoplasmatische Färbungen bei HA-HD-Q 20, 32, 37 und GFP-HD-Q 17 (Abbildung 19 A, C, D, E). Im Gegensatz dazu bildet GFP-HD-Q 72 (Abbildung 19 B) klar abzugrenzende cytoplasmatische und nukleare Einschlüsse, die die rekombinanten Proteine enthalten. Bei mehr als 80% der Zellen, die GFP-HD-Q 72 Protein exprimierten wurden Einschlüsse mit aggregierten Huntingtin nachgewiesen. Die Einschlusskörper waren in der Nähe des Kerns lokalisiert und hatten einen Durchmesser von 1-2 μm .

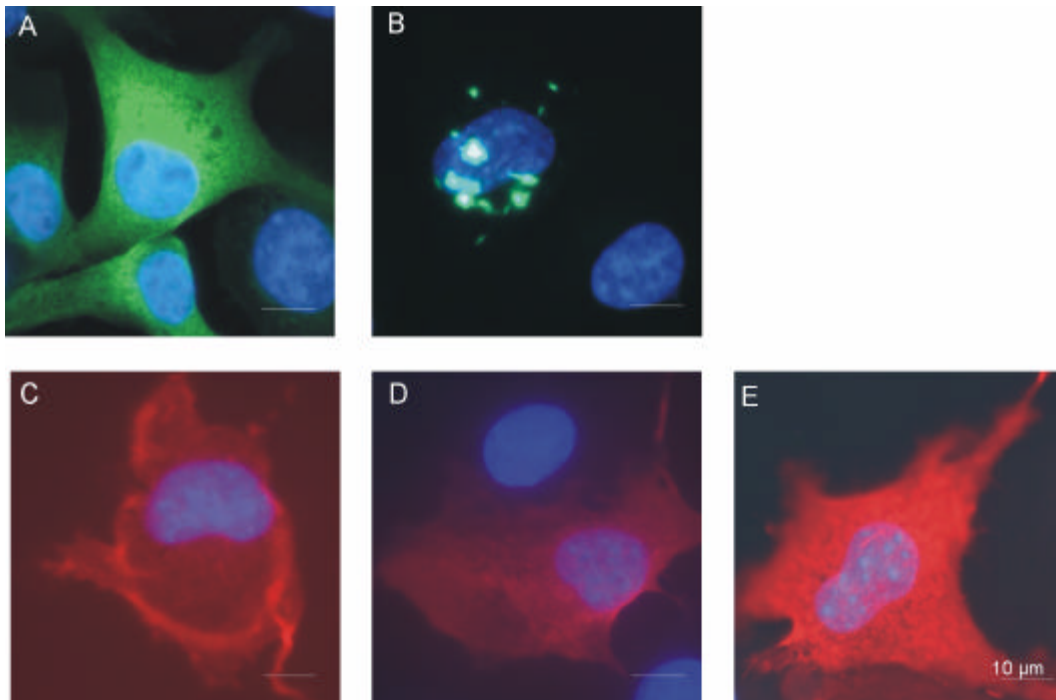


Abbildung 19: Analyse der Expression der Huntingtin Exon 1 Proteine mit unterschiedlich langen Polyglutamin-domänen in Säugerzellen mittels Immunofluoreszenz. Die Proteine GFP-HD-Q 17 (A) bzw. GFP-HD-Q 72 (B) wurden durch Eigenfluoreszenz (grün) nachgewiesen. HA-HD-Q 20 (C), 32 (D), oder 37 (E) wurden durch Anti-HA-Antikörper und durch, mit fluoreszierendem Farbstoff Cy3 gekoppelten, anti-Maus-Antikörper markiert (rot). Die Kerne wurden immer zusätzlich mit DAPI gefärbt (blau).

Andere haben gezeigt, dass die Bildung von Einschlüssen zu einer Verformung der Kerne, die häufig mit einer Kondensation der DNA einher ging führte. Es wird angenommen, dass Anhäufung von unlöslichen Proteinaggregaten aus Huntingtin Exon 1 die Struktur der Kerne zerstört und zur Apoptose führt (Waelter et al., 2001).

2.2.4. Analyse der Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit verschiedenen langen Polyglutamindomänen in Säugetierzellen mittels Filtrationsanalyse

Es wurde untersucht, ob auch *in vivo* Huntingtin Exon 1 mit normalen Polyglutamindomänen in die Aggregate aus Huntingtin Exon 1 mit pathologischer Polyglutamindomäne coaggregieren. Dazu wurden pTL-HA-HD 20, 32, 37Q mit pEYGF-HD 17Q und pEGFP-HD 72Q gemeinsam transfektiert. Gleichzeitig wurden alle Plasmide einzeln transfektiert. Nach 40-44 h Inkubation wurden die Zellen gerntet, lysiert und die Proteinkonzentration der Extrakte bestimmt. Die Proteine wurden denaturiert und je 0, 2 mg Gesamtprotein wurde aufgetragen. Die Aggregate wurden mit dem anti-HA- und mit dem Anti-CAG-Antikörper detektiert.

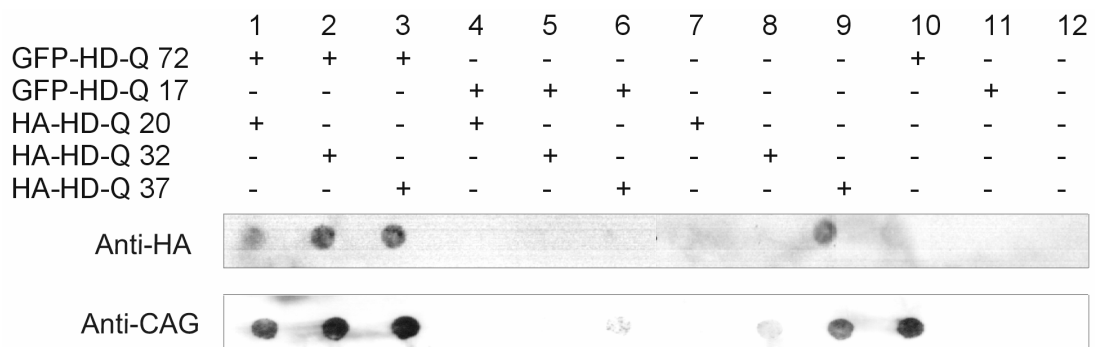


Abbildung 20: Analyse der Proteinaggregation in Säugetierzellen mittels der Filtrationsmethode. Je 0,2 mg Protein pro Punkt wurde aufgetragen. Die exprimierten Proteine sind durch ein + in der darüberliegenden Tabelle angegeben. Im oberen Filter wurden die Aggregate mit dem Anti-HA-Antikörper, im unteren Filter mit dem Anti-CAG-Antikörper nachgewiesen.

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist werden Aggregate nur in den Zellen gebildet, die die Proteine GFP-HD-Q 72 und HA-HD-Q 37 Q exprimierten (Spur 1-3, 9-10). HA-HD-Q 20 und 32 Aggregate lassen sich nur nachweisen, wenn in den Zellen auch das GFP-HD-Q 72 coexprimiert wurde (Abbildung 20, Spur 1-2). In Zellen, die GFP-HD-Q 17 exprimierten konnten keine Aggregate nachgewiesen werden (Abbildung 20, Spur 4-6, 11). Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass auch *in vivo* Huntingtin Exon 1 mit normaler

Polyglutamindomäne in die SDS-unlöslichen Aggregate von Huntingtin Exon 1 mit pathologischer Polyglutamindomäne coaggregieren.

2.2.5. Untersuchung der Huntingtin Exon 1 Coaggregation in Säugetierzellen mittels Immunofluoreszenz

Um die Ergebnisse aus der Filtrationsmethode zu bestätigen, wurde mittels Immunofluoreszenz untersucht, ob Huntingtin Exon 1 mit normaler Polyglutamindomäne auch *in vivo* mit den Aggregaten aus Huntingtin Exon 1 mit pathologischer Polyglutamindomäne coaggregiert.

Für die Proteinexpression wurden pTL-HA-HD-20Q, pTL-HA-HD-32Q, pTL-HA-HD-37Q, gemeinsam mit pEYGFHD-17Q und pEGFP-HD-72Q in COS1 Zellen mit Lipofectin® nach Angaben des Herstellers transfektiert. Nach 40-44 h Inkubation wurden die Zellen mit 2 % Paraformaldehyd fixiert und die Zellmembranen mit PBS-T permeabilisiert. Die Proteine HA-HD-Q 20, 32, oder 37 wurden durch Anti-HA-Antikörper und durch, mit fluoreszierendem Farbstoff Cy3 gekoppelten anti-Maus-Antikörper markiert. GFP-HD-Q 72 bzw. GFP-HD-Q 17 wurden durch die grüne Eigenfluoreszenz nachgewiesen. Die Kerne wurden immer zusätzlich mit DAPI, einem DNA-Interkalierer, blau angefärbt. Colokalisierungen erscheinen als gelbe Färbung.

GFP-HD-Q 17, HA-HD-Q 20, 32 und 37 erscheinen in der Immunofluoreszenzmikroskopie auch alleine transfektiert löslich (Abbildung 19 A, C, D, E). GFP-HD-Q 72 bildet alleine transfektiert Aggregate (Abbildung 19 B).

Abbildung 21 zeigt Zellen in denen die Proteine HA-HD-Q 20 und GFP-HD-Q 17 (Abbildung 21 A), HA-HD-Q 32 und GFP-HD-Q 17 (Abbildung 21 B) sowie HA-HD-Q 37 und GFP-HD-Q 17 (Abbildung 21 C) coexprimiert wurden. Die Proteine colokalisieren gelb fluoreszierend im Cytoplasma homogen verteilt.

HA-HD-Q 37 bildet mit GFP-HD-Q 17 erste gemeinsame Aggregate, doch bleibt eine gleichmäßig verteilte cytoplasmatische Färbung von HA-HD-Q 37 erhalten (Abbildung 21 C).

Im Vergleich dazu wurden in Zellen, die die Proteine HA-HD-Q 20 und GFP-HD-Q 72 (Abbildung 21 D), HA-HD-Q 32 und GFP-HD-Q 72 (Abbildung 21 E) sowie HA-HD-Q 37 und GFP-HD-Q 72 (Abbildung 21 F) coexprimierten perinukleare Einschlußkörper

nachgewiesen. Zusätzlich lässt sich beobachten, dass die gleichmäßig verteilte cytoplasmatische Färbung von HA-HD-Q 20, 32 und 37 verschwindet, wenn sie mit GFP-HD-Q 72 coexprimiert werden. Wird HA-HD-Q 37 gleichzeitig mit GFP-HD-Q 72 coexprimiert kann man auch kleine homogene Aggregate aus HA-HD-Q 37 nachweisen (Abbildung 21 F).

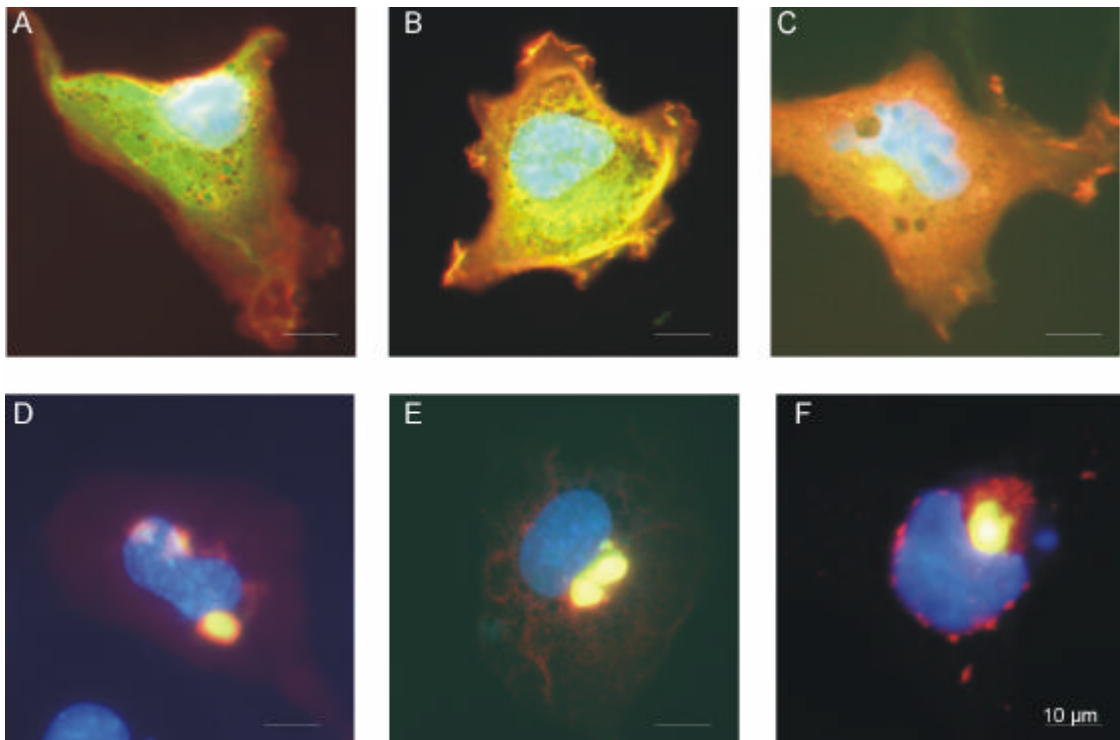


Abbildung 21: Analyse der Proteincoaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit unterschiedlich langen Polyglutamindomänen in Säugetierzellen mittels Immunofluoreszenz.

Die Proteine GFP-HD-Q 17 (A, B, C) bzw. GFP-HD-Q 72 (D, E, F) wurden durch Eigenfluoreszenz grün nachgewiesen. HA-HD-Q 20 (A, D), 32 (B, E), oder 37 (C, F) wurden durch Anti-HA-Antikörper und durch Cy3 gekoppelten anti-Maus-Antikörper rot markiert. Die Kerne wurden immer zusätzlich mit DAPI gefärbt (blau).

Auch *in vivo* läßt sich eine Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit verschiedenen langen Polyglutamindomänen in Säugetierzellen mittels Immunofluoreszenz beobachten.

2.3. Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit TBP, NOCT3 und PQBP1

2.3.1. Untersuchung der Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit TBP, NOCT3 und PQBP1 *in vitro*

Nach der Untersuchung von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit Polyglutamindomänen im normalen und pathologischen Bereich wurde die Coaggregation von Huntingtin Exon 1 mit den Proteinen TBP, NOCT3 und PQBP1 analysiert. Die Proteine sind in Tabelle 4 schematisch dargestellt.

TBP, das TATA-Binding-Protein, ist ein nuklearer Transkriptionsfaktor mit einer Polyglutamindomäne von 38 Glutaminen (Kao et al., 1990). TBP spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Transkription von eukaryotischen Genen durch die Polymerase II. Es bindet spezifisch an das Tata Box Promotor Element, welches in der Nähe der Transkriptionsinitiationsstelle liegt.

Auch NOCT3, der Nerval Octamer Binding Faktor 3 ist ein nuklearer Transkriptionsfaktor mit einer Polyglutamindomäne von 21 Glutaminen (Schreiber et al., 1997). NOCT3 bindet bevorzugt an zwei unterschiedliche Sequenzen, ('GCAT') und ('TAAT'), die durch eine nicht konservierte Region von 0-3 Nukleotiden getrennt werden. Es reguliert positiv die Gene unter der Kontrolle der Promotoren der Corticotropin-entlassenden Hormone I und II (CRH I und II). Sowohl TBP als auch NOCT3 werden im Gehirn exprimiert (Kao et al., 1990; Schreiber et al., 1997).

PQBP1, das Polyglutamindomain-Binding-Protein 1 hat zwar keine Polyglutamindomäne bindet aber an die Polyglutamindomäne von NOCT3 (Waragai et al., 1993). PQBP1 ist ebenfalls an der Transkription beteiligt (Komuro et al., 1997).

Für die Untersuchung der Aggregation *in vitro* wurden die Konstrukte pGEX-FLAG-TBP, pGEX-FLAG-NOCT3 und pGEX-FLAG-PQBP1 für die Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen hergestellt. Die erhaltenen Plasmide wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft. Die Proteine GST-F-TBP, GST-F-NOCT3 und GST-F-PQBP1 wurden in *E. coli* DH10B exprimiert und unter nativen Bedingungen über eine Affinitätschromatographiesäule mit Glutathion-Agarose gereinigt. Jeweils 0,15 mg der gereinigten Proteine wurde im SDS-Gel aufgetrennt und konnte im Western Blot mit dem Anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 22). Die gereinigten Proteine zeigten Hauptbanden mit den Molekulargewichten von 64 kDa (GST-F-TBP), 74 kDa (GST-F-NOCT3) und 57 kDa (GST-F-PQBP1), die mit den berechneten Werten übereinstimmen.

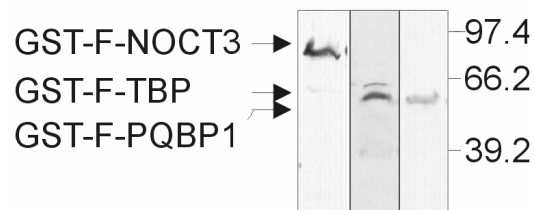


Abbildung 22: Western Blot-Analyse der gereinigten Proteine GST-F-TBP, GST-F-NOCT3, GST-F-PQBP1. Jeweils 0,15 mg gereinigtes GST-F-TBP, GST-F-NOCT3 und GST-F-PQBP1 wurde im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem Anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen.

Es gibt Hinweise, dass Proteine mit Polyglutamin-domäne, wie zum Beispiel TBP und CREB mit pathologischem Huntingtin in Zellsystemen coaggregieren (Huang et al., 1998; Steffan et al., 2000). In dieser Arbeit soll deshalb die Coaggregation der Proteine M-HD-Q 20 und M-HD-Q 55 mit F-NOCT3, F-TBP und F-PQBP1 *in vitro* untersucht werden.

Je 50 µg/ml der Proteine GST-F-TBP, GST-F-NOCT3, GST-F-PQBP1 und GST-F-HD-Q 20 wurden mit je 50 µg/ml GST-M-HD-Q 20 beziehungsweise GST-M-HD-Q 55 gemischt. Zur Abspaltung des GST-Fragmentes wurden die Proteine mit 0,1 U der *PreSission* \hat{O} Protease verdaut. Für die Aggregatbildung wurde die Reaktion bei 37 °C

für 16 h inkubiert. Die unlöslichen Proteinaggregate wurden anschließend mit dem Filtrertest nachgewiesen (Abbildung 23).

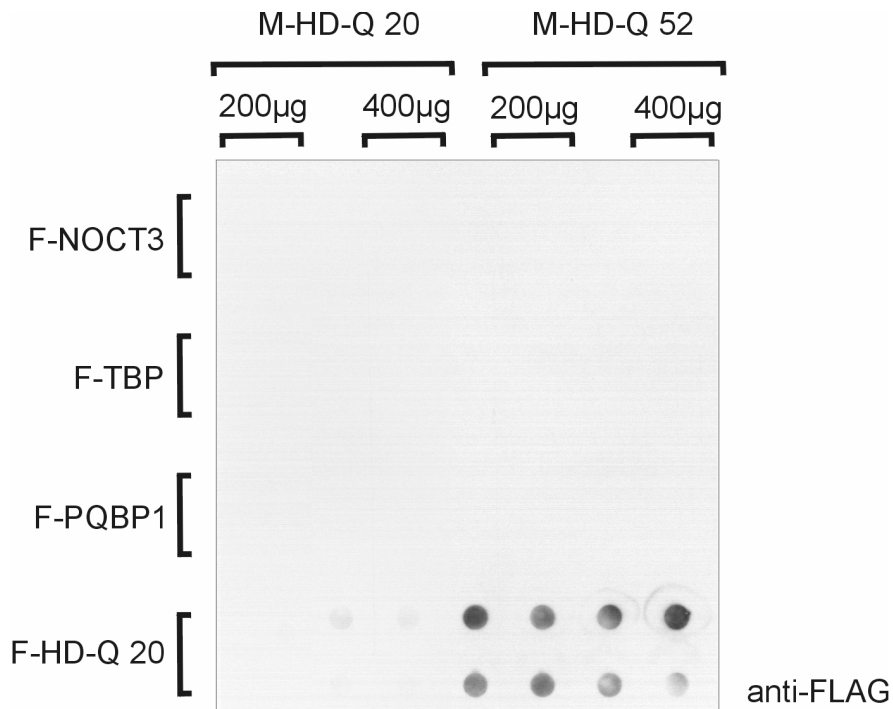


Abbildung 23: Analyse der Coaggregation von mit F-NOCT3, F-TBP, F-PQBP1 und F-HD-Q 20 mit M-HD-Q 20 und M-HD-Q-52 *in vitro*. Von zwei unabhängigen Proben wurden je 200 µg und 400 µg Protein auf den Filter aufgetragen. Die Proteinaggregate wurden mit Anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen.

Die Proteine F-NOCT3, F-TBP, F-PQBP1 wiesen keine Coaggregation mit M-HD-Q-52 auf. Auch ließen sich keine Coaggregation bei F-NOCT3, F-TBP, F-PQBP1 mit M-HD-Q 20 nachweisen. Nur F-HD-Q 20 coaggregierte mit M-HD-Q-52 in SDS-unlösliche Proteinaggregate.

2.3.2. Untersuchung der Coaggregation von Huntingtin Exon 1 Proteinen mit TBP, NOCT3 und PQBP1 in Säugetierzellen

Die Ergebnisse des *in vitro* Systems wurden im *in vivo* Zellkultursystem überprüft. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen von TBP, NOCT3 und PQBP1 in pTL-HA2 einkloniert (Tabelle 4). Das N-terminale HA-Epitop erlaubt dabei die Detektion der exprimierten Proteine mit dem monoklonalen anti-HA-Antikörper.

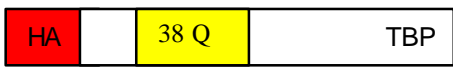
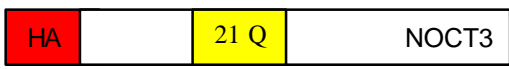
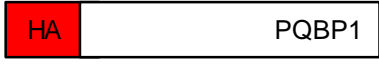
| Vektor: | Proteinname | Schematische Darstellung der Proteine: |
|---------------|-------------|--|
| pTL-HA-TBP | HA-TBP |  |
| pTL-HA-N-OCT3 | HA-NOCT3 |  |
| pTL-HA-PQBP1 | HA-PQBP1 |  |

Tabelle 4: Schematische Darstellung der Proteine von HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 in Säugetierzellen.

Für die Analyse der Proteinexpression wurden pTL-HA-TBP, pTL-HA-N-OCT3 und pTL-HA-PQBP1 in COS1 Zellen mit Calciumchlorid-Präzipitaten oder mit Lipofectin® nach Angaben des Herstellers transfektiert. Nach 40-44 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteinkonzentration der Extrakte bestimmt. Je 0,03 mg Gesamtprotein wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen und die exprimierten Proteine nach einem Western Blot mit dem anti-HA-Antikörper nachgewiesen. Die Proteine HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 ließen sich entsprechend ihrem berechneten Molekulargewicht zwischen 31 und 47 kDa nachweisen (Abbildung 24).

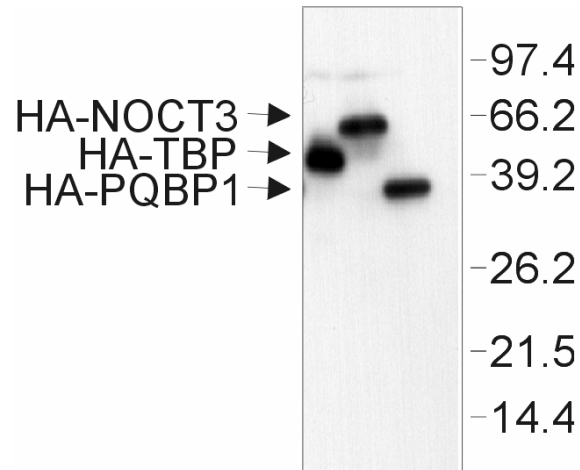


Abbildung 24: Analyse der Proteinexpression von HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 in Säugetierzellen. Je 0,03 mg Gesamtprotein wurde im SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die exprimierten Proteine wurden mit dem anti-HA-Antikörper nachgewiesen.

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

Im Folgenden wurde untersucht, ob HA-TBP, HA-NOCT3 oder HA-PQBP1 in die Aggregate von GFP-HD-Q 72 coaggregiert. Dazu wurden COS1-Zellen mit pTL-HA-TBP, pTL-HA-N-OCT3 oder pTL-HA-PQBP1 zusammen mit pEGFP-HD72Q bzw. mit pEYGFHD17Q cotransfiziert. Gleichzeitig wurden alle Plasmide einzeln transfiziert. Die Zellen wurden nach 40-44 h lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proben wurden denaturiert und einem Filtertest unterzogen. Die Proteinaggregate wurden sowohl mit dem anti-HA-Antikörper als auch mit dem anti-CAG-Antikörper nachgewiesen.

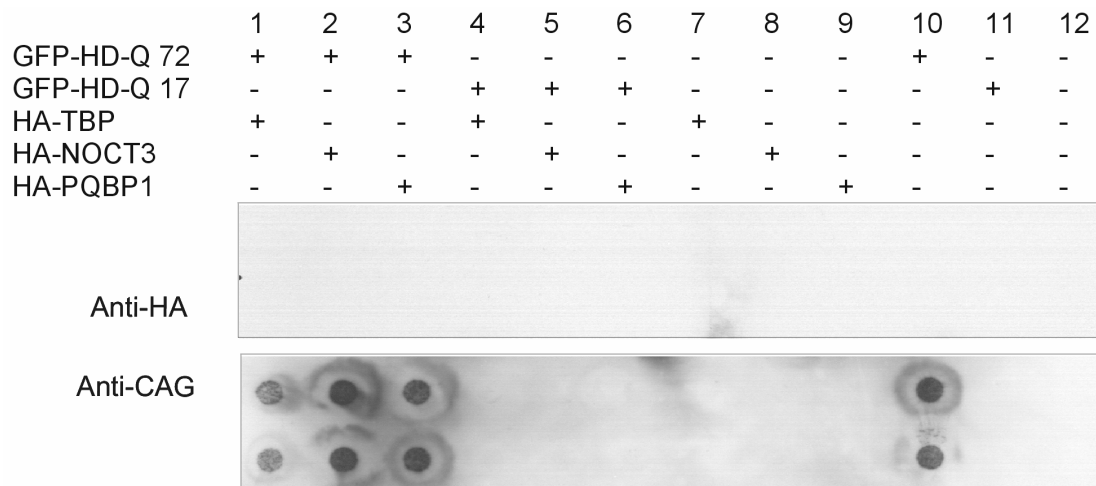


Abbildung 25: Analyse zur Coaggregation von HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 mit GFP-HD-Q 17 und GFP-HD-Q 72 in Säugetierzellen mit der Filtrationsmethode. Je 0,2 mg Protein pro Punkt wurde aufgetragen. Die exprimierten Proteine sind durch ein + in der darüberliegenden Tabelle angegeben. Im oberen Filter wurden die Aggregate mit dem Anti-HA-Antikörper, im unteren Filter mit dem Anti-CAG-Antikörper nachgewiesen.

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, werden Aggregate nur mit GFP-HD-Q 72 gebildet. Im Filtertest ist ein eindeutiges Signal durch die spezifische Reaktion des anti-CAG Antikörpers zu erkennen (Abbildung 25, Spur 1, 2, 3, 10). GFP-HD-Q 17 bildet keine Aggregate (Abbildung 25, Spur 4, 5, 6, 11). Weder HA-TBP (Abbildung 25, Spur 1, 4, 7), noch HA-NOCT3 (Abbildung 25, Spur 2, 5, 8) oder HA-PQBP1 (Abbildung 25, Spur 3, 6, 9) konnten mit dem anti-HA-Antikörper in diesen SDS-unlöslichen Aggregaten nachgewiesen werden.

Auch *in vivo* coaggregieren HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 nicht mit GFP-HD-Q 72. Dies weist daraufhin, dass auch in der zellulären Umgebung eine lange Polyglutamindomäne mit 21-38 Aminosäuren nicht ausreicht, um SDS-unlösliche Aggregate mit GFP-HD-Q 72 zu bilden.

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

Um zu untersuchen, wo HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 in Anwesenheit von GFP-HD-Q 72 in den Zellen lokalisiert sind, wurden Colokalisierungsstudien mit Immunofluoreszenzmikroskopie vorgenommen.

Dazu wurden pTL-HA-TBP, pTL-HA-N-OCT3 oder pTL-HA-PQBP1 jeweils mit pEGFP-HD72Q bzw. mit pEYGFP-HD17Q gemeinsam in COS 1 Zellen mit Lipofectin® nach Angaben des Herstellers transfektiert. Nach 40-44 h Inkubation wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd fixiert und die Zellmembranen mit PBS-T permeabilisiert. Die Proteine HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 wurden mit Anti-HA-Antikörper und mit Cy3 gekoppeltem anti-Maus-Antikörper, der eine rote Fluoreszenz zeigt, markiert. GFP-HD-Q 72 bzw. GFP-HD-Q 17 wurden durch grüne Eigenfluoreszenz nachgewiesen. Die Kerne wurden immer zusätzlich mit DAPI, einem DNA-Interkalierer, blau angefärbt. Einzeln transfektiert befinden sich HA-TBP und HA-NOCT3 löslich im Kern der Zelle (Abbildung 26 A, D). In cotransfektierten Zellen mit GFP-HD-Q 17 verändert sich ihre Lokalisation in den perinuklearen Bereich (Abbildung 26 B, E). GFP-HD-Q 17 bleibt löslich im Cytoplasma. In cotransfektierten Zellen mit dem Aggregate bildenden GFP-HD-Q 72 lokalisieren die beiden Proteine nicht nur außerhalb des Kerns sondern coaggregieren in den Aggregaten aus GFP-HD-Q 72, wie man an der gelben Fluoreszenz deutlich sieht (Abbildung 26 C, F). Das deutet daraufhin, dass durch die Coaggregation die Proteine in den perinuklearen Bereich gezogen werden.

HA-PQBP1 bildet kleinere Aggregate, die in der ganzen Zelle, sowohl im Zellkern als auch im Cytosol, zu finden sind (Abbildung 26 G). In cotransfektierten Zellen mit GFP-HD-Q 17 verändert sich die Lokalisation nicht (Abbildung 26 G). Zusammen mit dem Aggregate bildenden GFP-HD-Q 72 bildet es große perinukleare Aggregate (Abbildung 26 I).

Diese Colokalisierung zeigt eine Coaggregation von HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 in Aggregate aus GFP-HD-Q 72. Zusätzlich läßt sich eine Änderung der Lokalisation von HA-TBP und HA-NOCT3 in die perinuklearen Aggregaten aus GFP-HD-Q 72 beobachten.

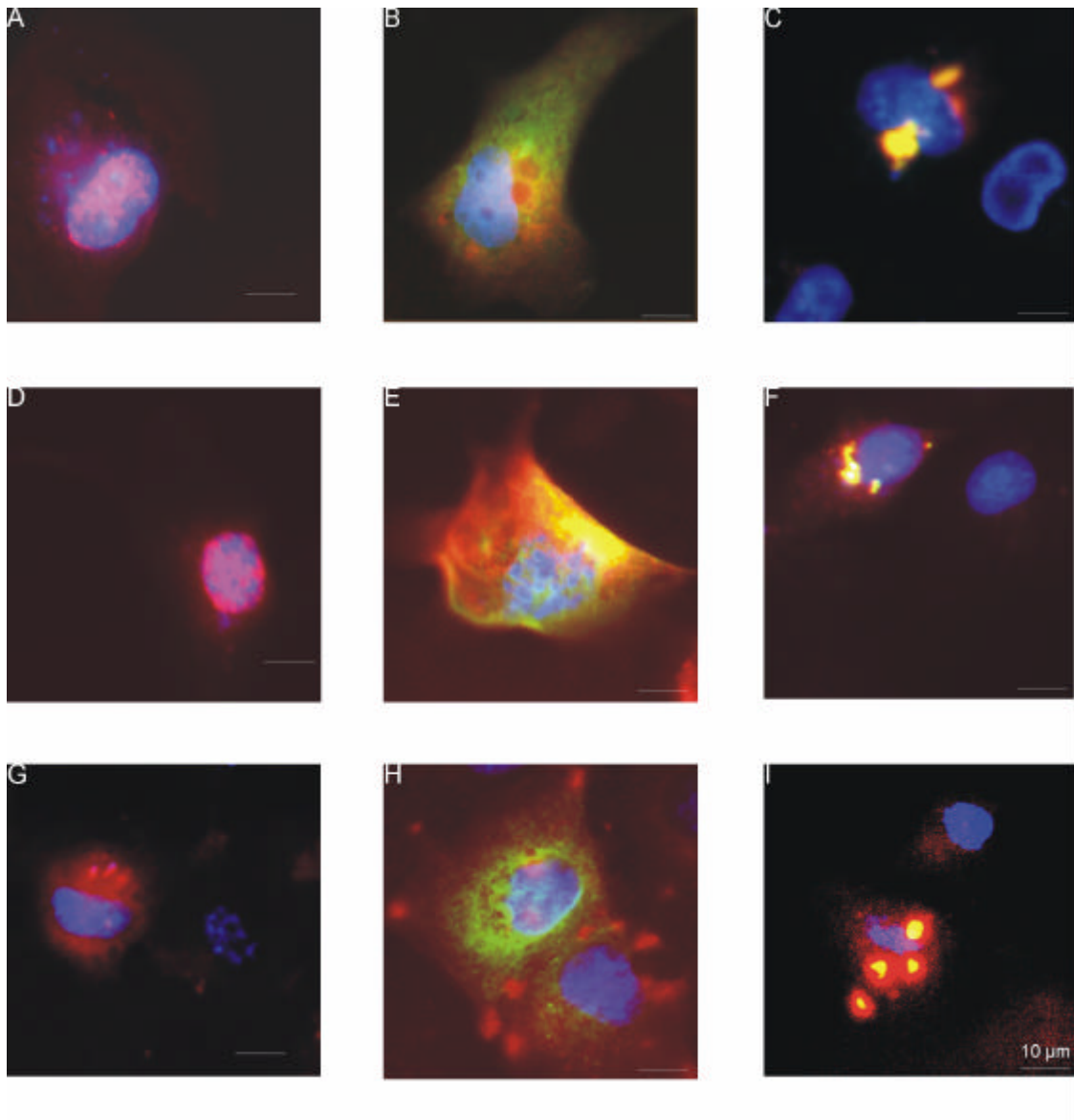


Abbildung 26: Untersuchung der Colokalisation von HA-TBP, HA-NOCT3 und HA-PQBP1 mit GFP-HD-Q 72 und GFP-HD-Q 17 in der Immunofluoreszenzmikroskopie. A: HA-NOCT3, B: HA-NOCT3 und GFP-HD-Q 17, C: HA-NOCT3 und GFP-HD-Q 72, D: HA-TBP ,E: HA-TBP und GFP-HD-Q 17, F: HA-TBP und GFP-HD-Q 72, G: HA-PQBP1, H: HA-PQBP1 und GFP-HD-Q 17, I: HA-PQBP1 und GFP-HD-Q 72. Die Proteine GFP-HD-Q 17 (B, E, H) bzw. GFP-HD-Q 72 (C, F, I) wurden durch Eigenfluoreszenz (grün) nachgewiesen. HA-TBP (A, B, C), HA-NOCT3 (D, E, F) und HA-PQBP1 (G, H, I) wurden mit Anti-HA-Antikörper und mit Cy3 gekoppelten anti-Maus-Antikörper markiert (rot). Die Kerne wurden immer zusätzlich mit DAPI gefärbt (blau).

2.5. Colokalisierungen von NOCT3 und PQBP1 mit neuronalen Einschlußkörpern in Gehirnen von Mäusen, die transgen für Huntingtin sind

Es wurde untersucht, ob die Proteine NOCT3 und PQBP1 in Gehirnen transgener Mäuse mit Huntingtin Exon 1 Protein mit ca.118-156 Glutaminen colokalisieren. Dazu wurden Präparate aus der R2/6 Maus benutzt. Diese Maus ist transgen für das humane Huntingtin Exon 1 mit 118-156 Glutaminen (Davies et al., 1997). Es wurden Schnitte des Striatums und des Cortex angefertigt und mit Antikörpern gegen NOCT3 und gegen PQBP1 sowie gegen Huntingtin (EM48 und S830) gefärbt.

Abbildung 27 zeigt, dass NOCT3 und PQBP1 mit Huntingtin-Aggregaten colokalisieren. Das deutet daraufhin, dass sie auch *in vivo* mit Huntingtin Exon 1 assoziieren. Die Ergebnisse aus der Zellkultur sind qualitativ direkt mit denen in der Maus vergleichbar. Die Kontrollen in nicht transgenen Mäusen zeigen keine Färbung (Daten nicht gezeigt).

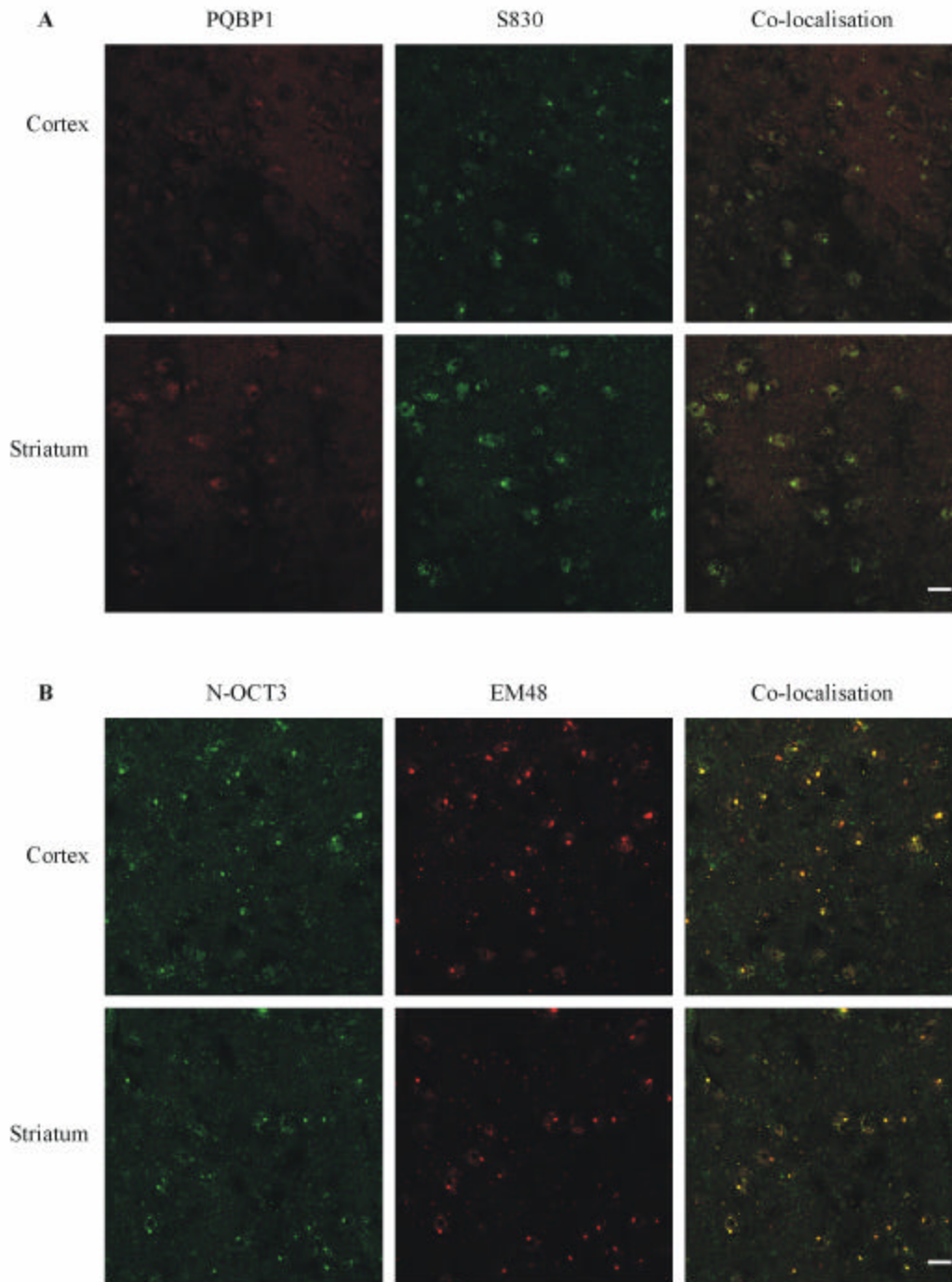


Abbildung 27: Colokalisierungen von NOCT3 und PQBP1 mit neuronalen Einschlusskörpern in Gehirnen von Mäusen, die transgen für Huntingtin Exon 1 sind. PQBP1 und EM48 haben eine rote, NOCT3 und S830 eine grüne Markierung. Colokalisierungen erscheinen gelb.