

Analyse der N-terminalen proteolytischen Prozessierung von Huntingtin

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Katrin Jünemann
geboren am 13.11.1979 in Jena

Jena, Juni 2009

Gutachter

1. Prof. Dr. Thomas Munder
Fachhochschule Jena - Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie
2. Dr. Christoph Kaether
Leibniz-Institut für Altersforschung - Fitz-Lipmann-Institut, Jena
3. Prof. Dr. Volkmar Leßmann
Otto-von-Guericke Universität Magdeburg - Institut für Physiologie

Datum der Verteidigung: 30.11.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Chorea Huntington	3
1.1.1 Neurodegenerative Erkrankungen durch Expansion des Polyglutamin-Abschnitts	4
1.2 Neuropathologie von Chorea Huntington	5
1.3 Genetischer Hintergrund von Chorea Huntington	6
1.4 Das Protein Huntingtin	7
1.5 Pathogenese von Chorea Huntington	9
1.5.1 Aggregation von Huntingtin	15
1.5.2 Proteolyse von Huntingtin	17
1.6 Zielstellung	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Bakterienstämme	23
2.1.2 Zelllinien	23
2.1.3 Medien	24
2.1.3.1 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen	24
2.1.3.2 Medien für die Zellkultur	25
2.1.4 Puffer und Lösungen	25
2.1.4.1 Trenngel und Sammelgel für die SDS-PAGE	27
2.1.4.2 Trenngel und Sammelgel für die SDS-Harnstoff-PAGE	27
2.1.5 Nukleinsäuren	28
2.1.5.1 Vektoren	28
2.1.5.2 Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese	28
2.1.5.3 Oligonukleotide für die PCR mit anschließender Klonierung	30
2.1.5.4 Oligonukleotide zur Sequenzierung	30
2.1.6 Primäre und sekundäre Antikörper	30
2.1.6.1 Primäre Antikörper	30
2.1.6.2 Sekundäre Antikörper	31
2.1.7 Spezielle Reagenzien, Komplett-Systeme (Kits), Marker und Enzyme	32
2.1.8 Chemikalien	33
2.1.9 Verbrauchsmaterialien	35
2.1.10 Geräte	35
2.2 Methoden	37
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	37
2.2.1.1 Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.2.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach Hanahan <i>et al.</i> 1983	38

2.2.1.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	38
2.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	38
2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen nach Birnboim und Doly 1979	39
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.2.2.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach der PCR und DNA Gelelektrophorese	39
2.2.2.5	DNA-Gelelektrophorese	40
2.2.2.6	Ortsgerichtete Mutagenese	40
2.2.2.7	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.2.2.8	Restriktion von DNA	41
2.2.2.9	Dephosphorylierung des Vektors	42
2.2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten	42
2.2.2.11	Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription/Translation	42
2.2.3	Zellbiologische Methoden	43
2.2.3.1	Kultivierung von Säugetierzellen	43
2.2.3.2	Passagieren von Säugetierzellen	43
2.2.3.3	Transiente Transfektion	43
2.2.3.4	Vorbereitung von Zellpräparaten für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie	44
2.2.3.5	Quantifizierung von Huntingtin-Aggregaten	44
2.2.3.6	Inhibierung des Proteasoms mit ALLN	45
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	45
2.2.4.1	Herstellung von Zelllysaten	45
2.2.4.2	Subzelluläre Fraktionierung	46
2.2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	46
2.2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.2.4.5	SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Harnstoff-PAGE)	47
2.2.4.6	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	47
2.2.4.7	Western Blot Analyse	47
2.2.4.8	Filter-Retardations-Assay	48
2.2.5	Apoptose-Assay	49
2.2.6	Vitalitätsbestimmung	49
2.2.7	Statistische Analysen	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Analyse der N-terminalen proteolytischen Prozessierung verschiedener Huntingtin-Fragmente im Zellkultur-Modell	51
3.1.1	Herstellung von N-terminalen Huntingtin-Konstrukten	51
3.1.2	Nachweis eines N-terminalen Huntingtin-Spaltprodukts im Zellkultur-Modell	51
3.1.3	Analyse des N-terminalen Spaltprodukts von Huntingtin indiziert proteolytische Prozessierung um Aminosäure 120	55
3.1.3.1	Nachweis N-terminaler Huntingtin-Sequenzen mittels Epitop-spezifischer Antikörper	55
3.1.3.2	N-terminale Proteolyse von Huntingtin um Aminosäure 120 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	56
3.1.4	Analyse der Aggregation von Huntingtin-Fragmenten im Zellkultur-Modell	58
3.1.4.1	Aggregation von mutierten N-terminalen Huntingtin-Fragmenten	58
3.1.4.2	Nachweis von nukleären Aggregaten bestehend aus mutierten N-terminalen Huntingtin-Fragmenten	59

3.1.4.3	Untersuchung der Expression und Aggregation von mutierten N-terminalen Huntingtin-Fragmenten über die Zeit	60
3.1.5	Beeinflussung der Spalteffizienz durch Mutationen in der putativen N-terminalen Spaltregion von Huntingtin	61
3.1.5.1	Einfluss von Mutationen auf die N-terminale proteolytische Prozessierung von Huntingtin	61
3.1.5.2	Modulation N-terminaler Proteolyse von mutiertem Huntingtin	62
3.1.5.3	N-terminale Proteolyse von Huntingtin nach Inhibierung des Proteasoms	64
3.1.6	Analyse der Huntingtin-Mutanten	66
3.1.6.1	Einfluss der Mutationen in der putativen Spaltregion von Huntingtin auf die Caspase 3 und 7-Aktivitäten	66
3.1.6.2	Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol durch die Mutation $\Delta 121-122$ in Huntingtin	67
3.1.6.3	Verringerung der Vitalität von neuronalen Zellen durch die Mutation $\Delta 121-122$ in Huntingtin	69
3.1.6.4	Einfluss der proteolytischen Huntingtin-Spaltung auf das Aggregationsverhalten im Zellkultur-Modell	70
3.1.7	Analyse N-terminaler Huntingtin-Proteine mit unterschiedlicher Proteinelänge	71
3.1.7.1	Untersuchung der Aggregation von mutierten N-terminalen Huntingtin-Proteinen mit 120 Aminosäuren	71
3.1.7.2	Bestimmung der Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression verschieden langer Huntingtin-Fragmente	73
3.1.7.3	Verschieden lange Huntingtin-Proteine mit unterschiedlichem Potential für Toxizität	76
3.1.7.4	Subzelluläre Lokalisation von verschiedenen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten	77
3.2	Analyse der N-terminalen proteolytischen Prozessierung von Vollängen-Huntingtin im Zellkultur-Modell	78
3.2.1	Proteolyse von Vollängen-Huntingtin	78
3.2.1.1	Analyse der Effektorcaspase-Aktivitäten und Aggregation nach der Expression von mutiertem Vollängen-Huntingtin	82
3.2.1.2	Subzelluläre Lokalisation von Vollängen-Huntingtin	83
4	Diskussion	86
4.1	N-terminale Spaltung von Huntingtin	86
4.2	Modulation der N-terminalen Spaltung von Huntingtin	88
4.3	Identifikation der N-terminalen Spaltstelle	89
4.4	Zwei N-terminale Huntingtin-Fragmente	90
4.5	Zelluläre Einschlusskörper	91
4.6	Erhöhte Apoptoserate	92
4.7	Mögliche involvierte Proteasen	96
5	Ausblick	98
6	Literatur	100
	Anhang	117
	Danksagung	120
	Lebenslauf	121
	Eigene wissenschaftliche Beiträge	122
	Selbständigkeitserklärung	123

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Tissue Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CIP	calf intestinal phosphatase (alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm)
CMV	Cytomegalievirus
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiumbromid
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
forw	forward (vorwärts)
G418	Geneticin
kb	Kilobasenpaar
LB _{amp}	LB-Medium mit Ampicillin
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
MCS	Multiple Cloning Site (Multiple Klonierungsstelle)
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
Neo ^R	Neomycin-Resistenzgen
p.a.	pro analysi (zur Analyse)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	phosphate buffered saline (mit Phosphat gepufferte NaCl-Lösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	pH-Wert
rev	reverse (rückwärts)
RLE	Relative Licht-Einheiten
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SL	Stammlösung
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFB	Transformation buffer (Transformationspuffer)
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	weight per volume (Gewicht/Volumen)
v/v	volume per volume (Volumen/Volumen)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Atrophie des Gehirns bei Chorea Huntington	6
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz und Struktur von Huntingtin	8
Abb. 3:	Modell für die Pathogenese von Chorea Huntington	12
Abb. 4:	Potentielle Synthesewege zur Formation von Aggregaten und zellulären Einschlusskörpern in neurodegenerativen Krankheiten	16
Abb. 5:	Schema der N-terminalen Proteolyse von Huntingtin	18
Abb. 6:	N-terminale proteolytische Prozessierung von Huntingtin	53
Abb. 7:	Generierung des N-terminalen Huntingtin-Spaltprodukts in verschiedenen Zelllinien	54
Abb. 8:	Nachweis für posttranslationale Proteolyse	55
Abb. 9:	Nachweis N-terminaler Huntingtin-Sequenzen mit verschiedenen Antikörpern	56
Abb. 10:	N-terminale Huntingtin-Spaltung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> bei circa Aminosäure 120	57
Abb. 11:	Aggregation von Huntingtin in COS-7-Zellen	58
Abb. 12:	Optische Schnitte durch eine mit <i>htt</i> N233-82Q-transfizierte COS-7-Zelle	59
Abb. 13:	Aggregation von mutierten Huntingtin-Proteinen über die Zeit	60
Abb. 14:	Mutationen in der putativen Spaltregion	62
Abb. 15:	Quantifizierung der N-terminalen Spaltprodukte	63
Abb. 16:	Einfluss verschiedener Mutationen in Htt N233-82Q auf die Spalteffizienz	64
Abb. 17:	Inhibierung des Proteasoms durch ALLN	65
Abb. 18:	Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression mutierter Huntingtin-Proteine	67
Abb. 19:	Detektion von Cytochrome c im Zytosol von Huntingtin-exprimierenden HEK 293-Zellen	68
Abb. 20:	Zellvitalität nach der Expression mutierter Huntingtin-Proteine	69
Abb. 21:	Analyse von Huntingtin-Aggregaten	71
Abb. 22:	Aggregation von N-terminalen Huntingtin-Proteinen mit 120 Aminosäuren	72
Abb. 23:	Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression verschieden langer Huntingtin-Proteine	73
Abb. 24:	Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression N-terminaler Huntingtin-Stoppmutanten	74

Abb. 25: Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression mutierter Huntingtin-Proteine	75
Abb. 26: Zellvitalität nach der Expression mutierter Huntingtin-Proteine	76
Abb. 27: Subzelluläre Fraktionierung von transfizierten HEK 293-Zellen	78
Abb. 28: Detektion von zwei kurzen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten nach der Expression von Vollängen-Huntingtin	79
Abb. 29: Nachweis von zwei kurzen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten in transfizierten HEK 293-Zellen	80
Abb. 30: N-terminale Spaltung von Vollängen-Huntingtin in striatalen Mäuszellen	81
Abb. 31: Effektorcaspase-Aktivitäten und Aggregation nach der Expression von Vollängen-Huntingtin	83
Abb. 32: Subzelluläre Fraktionierung von Vollängen-Huntingtin-exprimierenden HEK 293-Zellen	84
Abb. 33: Immunfluoreszenz-Analyse von Htt FL-82Q-exprimierenden COS-7-Zellen	85

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Neurodegenerative Krankheiten mit einem pathogenen Polyglutamin-Abschnitt	4
Tab. 2: Aggregation von mutierten Huntingtin-Proteinen über die Zeit	60

Zusammenfassung

Chorea Huntington ist eine progressiv verlaufende neurodegenerative Erbkrankheit, die durch eine Expansion im Polyglutamin-Abschnitt des krankheitsassoziierten Proteins Huntingtin verursacht wird. Aufgrund dieser Verlängerung sind Huntingtin-Proteine in der Lage intrazellulär unter Ausbildung von zytoplasmatischen und nukleären Einschlusskörpern zu aggregieren. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet sind die Pathomechanismen von Chorea Huntington nicht vollständig aufgeklärt.

In post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen und verschiedenen Zellkultur- und Maus-Modellen konnten aggregierte Huntingtin-Proteine mit Antikörpern gegen N-terminale Epitope, aber nicht gegen C-terminale Epitope detektiert werden. Zelluläre Aggregate bestehen hauptsächlich aus N-terminalen Huntingtin-Fragmenten, die durch proteolytische Prozessierung generiert werden und im Anschluss ein höheres Aggregationspotential als Vollängen-Huntingtin haben.

Hauptziel der hier vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe eines Zellkultur-Modells die N-terminale Proteolyse von Huntingtin zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Region von Aminosäure 116-125 wichtig für die N-terminale Spaltung von Huntingtin ist. Innerhalb dieser Region konnten Mutationen identifiziert werden, welche die N-terminale Spaltung entweder reduzieren oder verstärken. Um den zellulären Effekt dieser Modulation der N-terminalen proteolytischen Prozessierung zu analysieren, wurden verschiedene Mutanten mit einem pathogenen Polyglutamin-Abschnitt exprimiert. Die Mutation $\Delta 121-122$, innerhalb der putativen Spaltregion, führte zu einer verstärkten N-terminalen Proteolyse von Huntingtin und ging mit einer erhöhten Aktivität apoptotischer Prozesse, verringerter Zellvitalität und einer verstärkten Aggregation von N-terminalen Huntingtin-Fragmenten in der Zelle einher.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass verschieden lange Huntingtin-Proteine mit identischem Polyglutamin-Abschnitt ein unterschiedliches Potential für Toxizität haben und die Formation von intrazellulären Einschlusskörpern keine apoptotischen Prozesse auslöst.

Schlussfolgernd konnte mit dieser Studie die Prozessierung von Huntingtin durch die Etablierung eines Zellkultur-Modells für N-terminale Proteolyse näher analysiert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass in verschiedenen Zelltypen mutierte N-terminale Huntingtin-Fragmente durch proteolytische Spaltung generiert werden und diese Fragmente zytoplasmatisch und nukleär aggregieren.

Summary

Huntington's disease is a progressive, inherited neurodegenerative disorder caused by an expansion of the polyglutamine repeat in the respective protein huntingtin. A neuropathological hallmark of Huntington's disease is the presence of cytoplasmatic and intranuclear inclusion bodies mainly composed of aggregated mutant huntingtin. Despite intensive research in this field, the pathological mechanisms of Huntington's disease are not completely clarified.

In human postmortem brain, cell culture models and mouse models aggregated huntingtin is only detectable with antibodies against N-terminal regions suggesting that aggregates consist of huntingtin N-terminal fragments. The N-terminal fragments are generated by proteolytic processing and they are more prone to aggregation than full-length huntingtin.

The aim of this study was to analyse the N-terminal cleavage of huntingtin in a cell culture system. Here, I present evidence that the region in huntingtin covering amino acids 116 to 125 is critical for N-terminal proteolytic processing. Within this region, I have identified mutations that either strongly reduce or enhance N-terminal cleavage. To analyse the cellular effect of modulation of N-terminale proteolytic processing, I expressed huntingtin mutants with an expanded polyglutamine stretch in cells. The mutation $\Delta 121-122$ within the putative cleavage region enhanced N-terminal cleavage of huntingtin with an increased activation of apoptotic processes, decreased cell viability and aggregation of N-terminal huntingtin fragments in cells.

Furthermore, I was able to show that huntingtin proteins with identical polyglutamine stretches and various protein lengths have a different potential for toxicity and, moreover, the formation of intracellular inclusion bodies does not enhance apoptotic processes.

Taken together, in this study I analysed the proteolytic processing of huntingtin by establishing a cell culture model for N-terminal cleavage. The results of this study show that in several cell types mutant N-terminal fragments of huntingtin are released by cleavage and aggregate in the cytoplasm and nucleus.

1 Einleitung

1.1 Chorea Huntington

Chorea Huntington (Huntington's Disease, HD) ist eine progressiv verlaufende neurodegenerative Krankheit mit einer Expansion des Polyglutamin-Abschnitts im krankheitsassoziierten Protein, die zuerst von dem New Yorker Arzt Georg Huntington erkannt und beschrieben wurde. 1872 veröffentlichte Georg Huntington einen Artikel mit dem Titel „On Chorea“ in dem er präzise die Merkmale der Krankheit Chorea Huntington (das griechische Wort „Choreia“ bedeutet Tanz) beschrieb (Huntington 1872). Diese autosomal-dominant vererbte Krankheit tritt mit einer Prävalenz von 5-10 Fällen pro 100 000 Menschen auf und bricht meistens zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr aus (Harper 1992, Myers *et al.* 1983, Kremer *et al.* 1993). Die Krankheit dauert über 15 bis 20 Jahre an und endet tödlich. Die progressiv fortschreitenden Symptome von Chorea Huntington reichen von unwillkürlichen Bewegungen der Extremitäten, Zuckungen der Gesichtsmuskulatur, Schluckstörungen, Koordinationsstörungen, Verlust intellektueller Fähigkeiten, Reizbarkeit, Depressionen bis hin zu Persönlichkeitsveränderungen. Betroffene Patienten haben einen zunehmenden Verlust der motorischen Kontrolle mit anfänglichen Bewegungsunruhen bis hin zu Hyperkinesen mit verringertem Muskeltonus. Der spätere Verlauf der Krankheit ist eher durch Bewegungsarmut (Hypokinesie) mit einer Erhöhung des Muskeltonus gekennzeichnet. Patienten mit einem früheren Krankheitsbeginn zeigen oft einen schwereren Krankheitsverlauf. Zwar beeinträchtigt die Krankheit in erster Linie das Gehirn, aber die Betroffenen sterben meist an Komplikationen bedingt durch Schluck- und Atembeschwerden oder an den Folgen von Sturz bedingten Verletzungen. Die Diagnose kann klinisch anhand der Symptome gestellt werden. Neurologische, neuropsychologische und psychiatrische Untersuchungen sowie Familienanamnese müssen durchgeführt werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der genetischen Analyse bevor sich die ersten Symptome zeigen. Zusätzlich werden Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT) oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Analyse der Degeneration des Gehirns eingesetzt. Bislang ist keine neuroprotektive Therapie von Chorea Huntington möglich. Hyperkinesen werden durch Antihyperkinetika und Neuroepileptika gebessert. Die Behandlung von Verhaltensstörungen und psychiatrischen Symptomen besteht aus dem Einsatz von Serotonin-Reuptake-Hemmern und Neuroepileptika. Die medikamentösen

Therapien werden immer flankiert von ergotherapeutischer, logopädischer und physiotherapeutischer Behandlung, um die Schluck- und Sprachfähigkeit beziehungsweise Bewegungsfähigkeit zu verbessern.

1.1.1 Neurodegenerative Erkrankungen durch Expansion des Polyglutamin-Abschnitts

Neben der Krankheit Chorea Huntington gibt es noch weitere neurodegenerative Krankheiten, denen eine Expansion des Polyglutamin-Abschnitts zu Grunde liegt. Insgesamt 9 dieser Erbkrankheiten wurden beschrieben (Tab. 1). Hierzu zählen Chorea Huntington (HD), Dentatorubrale-pallidolysiale Atrophie (DRPLA), Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA) und die spinocerebellären Ataxien (SCA) 1, 2, 3, 6, 7, und 17 (Ross 1995). Auffallend ist, dass sich die Symptomatiken dieser Krankheiten sehr ähneln. Eine selektive Neurodegeneration von spezifischen Neuronen tritt trotz ubiquitärer Expression der entsprechenden krankheitsassoziierten Proteine auf (Ross 1995).

Tabelle 1: Neurodegenerative Krankheiten mit einem pathogenen Polyglutamin-Abschnitt.

Krankheit	Protein	Pathogener Polyglutamin-Abschnitt	Betroffene Gehirnregionen
HD	Huntingtin	36-121	Corpus striatum, Großhirnrinde
DRPLA	Atrophin-1	49-88	Kleinhirn, Großhirnrinde, Basalganglien, Luys-Körper
SBMA	Androgen-Rezeptor	38-62	Vorderhornneurone im Spinalmark, Spinalganglien
SCA1	Ataxin-1	40-82	Purkinje-Zellen, Hirnstamm, Nucleus dentatus
SCA2	Ataxin-2	32-200	Purkinje-Zellen, Frontallappen, Hirnstamm
SCA3	Ataxin-3	61-84	Nucleus dentatus, Hirnstamm, Basalganglien, Rückenmark
SCA6	P/Q-Typ Ca ²⁺ -Kanal α 1A-Untereinheit	20-29	Purkinje-Zellen, Nucleus dentatus, Nucleus olivaris inferior
SCA7	Ataxin-7	37-306	Kleinhirn, Hirnstamm, Makula, Visueller Cortex
SCA17	TATA-Box Bindeprotein	47-63	Purkinje-Zellen, Nucleus olivaris inferior

Bei all diesen Erkrankungen besteht eine Korrelation zwischen der Länge des Polyglutamin-Abschnitts und dem Ausprägungsgrad der Krankheit (Andrew *et al.* 1993, Duyao *et al.* 1993, Stine *et al.* 1993, Nance 1997). Anhand eines Maus-Modells konnte gezeigt werden, dass das Einführen einer zusätzlichen Gensequenz, kodierend für einen expandierten Polyglutamin-Abschnitt mit 146 Glutaminen, in das Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen, welches nicht mit Polyglutaminerkrankung assoziiert ist, ebenfalls nach Expression dieses Proteins Neurodegeneration hervorruft (Ordway JM 1997). Die Mäuse hatten einen ähnlichen Phänotyp, wie Mäuse mit einer Polyglutaminkrankheit. Diese Untersuchungen unterstützten die Annahme, dass ein verlängerter Polyglutamin-Abschnitt kontextunabhängig Neurodegeneration verursachen kann.

1.2 Neuropathologie von Chorea Huntington

Der Krankheit Chorea Huntington geht eine Atrophie des Gehirns einher, wobei verschiedene Hirnregionen unterschiedlich stark betroffen sind. Eine Degeneration von spezifischen Nervenzellen findet überwiegend im Corpus striatum, einem Teil der Basalganglien bestehend aus Neostriatum und Pallidum, und im geringeren Ausmaß in der Großhirnrinde, im Subthalamus und in der Substantia nigra statt (Vonsattel *et al.* 1985) (Abb. 1A). Das Kleinhirn und der Hirnstamm sind weitestgehend unbetroffen.

Am stärksten sind die mittelgroßen bedornten striatalen Neurone („medium spiny neurons“) degeneriert (Graveland *et al.* 1985). Diese GABAergen Nervenzellen sind inhibitorische Projektionsneurone, die vom Neostriatum zum Pallidum und zur Substantia nigra projizieren. Das Putamen, ein Teil des Neostriatums, ist für die Kontrolle der Motorik verantwortlich. Erregungen werden von hier aus normalerweise über die GABAergen Neuronen indirekt oder direkt über den Globus pallidus internus zum Thalamus und zur Großhirnrinde geleitet. Im Anfangsstadium der Krankheit gehen die indirekten Verbindungen verloren, so dass es zu unwillkürlichen Bewegungen (Hyperkinesie) kommt. Durch den Verlust der direkten Verbindungen in späteren Krankheitsstadien kommt es zu einer hochgradigen Bewegungsarmut (Akinesie) bis hin zur Muskelstarre (Rigor). Der Nucleus caudatus, ein weiterer Teil des Neostriatums, ist unter anderem verantwortlich für Kognition beziehungsweise Emotion und ist ebenfalls bei Chorea Huntington stark degeneriert. In fortgeschrittenen Stadien kann die Volumenreduktion des Corpus striatums 60-90 % betragen

und das Gewicht des Gehirns um etwa 20-30 % reduziert sein (Sanberg & Coyle 1984, Vonsattel *et al.* 1985) (Abb. 1B).

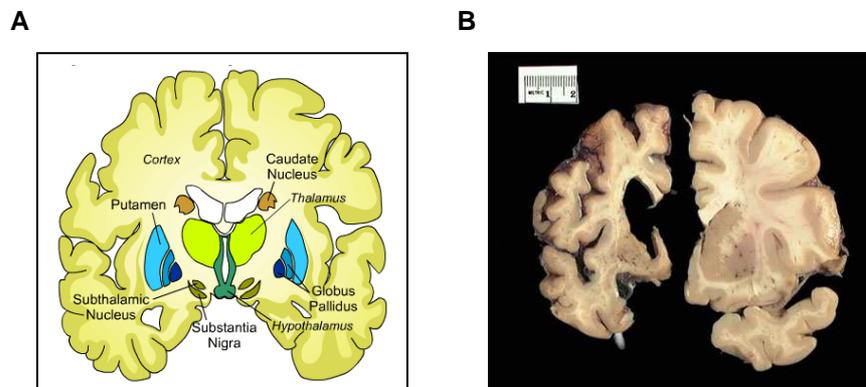


Abbildung 1: Atrophie des Gehirns bei Chorea Huntington. **A)** Die Basalganglien bestehen anatomisch und funktionell aus Nucleus caudatus, Putamen, Pallidum, Substantia nigra und Subthalamus. Die neurodegenerative Krankheit Chorea Huntington geht mit einer Funktionsstörung der Basalganglien einher. Quelle: <http://hopes.stanford.edu/basics/braintut/brain.swf>. **B)** Vergleich eines post-mortalen Chorea Huntington-Gehirns (links) mit einem post-mortalen Kontrollgehirn (rechts). Linke Gehirnhälfte eines betroffenen Individuums mit genereller Atrophie des Gesamtgehirns und fast vollständiger neuronaler Degeneration des Corpus striatum. Quelle: <http://hdroster.iu.edu/AboutHD/brainAndHD.asp>.

1.3 Genetischer Hintergrund von Chorea Huntington

Chorea Huntington ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit mit einer nahezu vollständigen Penetranz. Zusätzlich liegt bei etwa 5-10 % der Patienten eine Neumutation vor (Goldberg *et al.* 1994, Falush *et al.* 2001). 1993 gelang die Identifikation des Gens *IT15* („important transcript 15“) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 mit dem Locus 4p16.3, welches später in *huntingtin*-Gen (*htt*) umbenannt wurde (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993). Das *huntingtin*-Gen hat, abgesehen von den (CAG)_n-Wiederholungen, keine Ähnlichkeit zu bisher identifizierten Genen. *Huntingtin* besteht aus 67 Exons, die sich über 170 kb genomische Sequenz erstrecken. Bei gesunden Menschen wiederholt sich das *huntingtin*-Trinukleotid CAG 9-35 mal. Bei Wiederholungen von 36-40 CAGs wurde inkomplette Penetranz beobachtet und bei mehr als 40 CAGs bricht die Krankheit zu 100 % aus (McNeil *et al.* 1997). Die Länge des Trinukleotid-Abschnitts korreliert invers mit dem Zeitpunkt der Erkrankung (Andrew *et al.* 1993, Duyao *et al.* 1993, Snell *et al.* 1993, Zuhlke *et al.* 1993, Norremolle *et al.* 1993). Je größer die Anzahl der CAG-Triplets, desto früher ist die Manifestation der Erkrankung beziehungsweise desto früher stirbt der Patient. Sind mehr als 60 CAG-Triplets vorhanden, kommt es zu einem juvenilen Manifestationsalter (Gusella *et al.*

1997). Aufgrund meiotischer Instabilität kann sich die Länge des Trinukleotid-Abschnitts ändern und über die Keimzellen an die nächste Generation weitergegeben werden. Während bei normalen *huntingtin*-Allelen die Mutationshäufigkeit niedrig ist, beträgt sie bei mutierten *huntingtin*-Allelen mit einem expandierten Trinukleotid-Abschnitt circa 70 % (Zuhlke *et al.* 1993). Interessanterweise sind bei der paternalen Transmission Expansionen des Trinukleotid-Abschnitts häufiger als bei der maternalen Transmission. Juvenile Chorea Huntington-Patienten erben das mutierte *huntingtin*-Allel praktisch immer vom Vater (Ridley *et al.* 1988). Die Expansion des Trinukleotid-Abschnitts von einer Generation zur nächsten mit einem zunehmenden Schweregrad oder einer früheren Manifestation der Krankheit wird auch als Antizipation bezeichnet.

Seltene Individuen mit homozygoten mutierten *huntingtin*-Allelen sind klinisch nicht von Individuen mit heterozygoten mutierten *huntingtin*-Allelen zu unterscheiden (Wexler *et al.* 1987, Myers *et al.* 1989). Dies lässt vermuten, dass bei heterozygoten Patienten das normale *huntingtin*-Allel keinen Einfluss auf den Prozess der Krankheit hat und dass bei homozygoten Patienten das zusätzlich mutierte *huntingtin*-Allel keinen deutlich stärkeren Krankheitseffekt ausübt.

1.4 Das Protein Huntingtin

Huntingtin ist ein lösliches und hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiertes Protein mit 3144 Aminosäuren und einer Molekularmasse von 350 kDa (Abb. 2). Es hat keine Sequenzhomologie zu anderen humanen Proteinen und wird ubiquitär, mit dem höchsten Expressionslevel im Zentralnervensystem und in den Hoden, exprimiert (Trottier *et al.* 1995b, Ferrante *et al.* 1997). Das Expressionsmuster von Huntingtin im Gehirn und speziell im Corpus striatum erklärt nicht die Degeneration von spezifischen Neuronen (Fusco *et al.* 1999). Vergleicht man die Proteinsequenz von humanen Huntingtin mit der von anderen Arten, so zeigt sich, dass die Sequenzen hochgradig konserviert sind (Gusella *et al.* 1997, Harjes & Wanker 2003). Bei der Expression des Proteins Huntingtin werden die (CAG)_n-Wiederholungen in einen entsprechenden Polyglutamin-Abschnitt umgeschrieben. Nach den Aminosäuren 1-17 kommt der Polyglutamin-Abschnitt (PolyQ), gefolgt von zwei kurzen Polyprolin-Abschnitten (PolyP). Es konnte gezeigt werden, dass Huntingtin mittels des Polyglutamin-Abschnitts mit anderen Proteinen interagiert (Harjes & Wanker 2003, Li & Li 2004, Goehler *et al.* 2004). Die zwei kurzen Polyprolin-Abschnitte sind ebenfalls in der Lage

mit Proteinen, die eine SH3- oder WW-Domäne haben, zu interagieren und könnten eine Rolle in der Stabilität der N-terminalen Region spielen (Liu *et al.* 1997, Faber *et al.* 1998, Sittler *et al.* 1998, Passani *et al.* 2000).

Durch bioinformatische Analysen ist es möglich Huntingtin-Strukturen vorauszusagen. Eine postulierte Struktur besteht aus HEAT-Regionen (Huntingtin, Elongationsfaktor 3, PR65/A Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, Lipidkinase TOR) und PEST-Regionen (Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T)) (Takano & Gusella 2002, Andrade & Bork 1995, Rechsteiner & Rogers 1996). In Huntingtin wurden mehrere HEAT-Regionen identifiziert, die in 4 HEAT-Domänen geklustert sind. Eine HEAT-Region besteht aus circa 50 Aminosäuren, die eine sogenannte helikale Haarnadelstruktur bilden. Das derzeitige Struktur-Modell von Huntingtin ist ein flexibles, superhelikales Solenoid bestehend aus sich wiederholenden HEAT-Regionen mit einem hydrophoben Kern (Li *et al.* 2006). Wie andere Proteine, die HEAT-Regionen besitzen, scheint Huntingtin ein Gerüstprotein („scaffold protein“) zu sein, dessen Funktion die Vermittlung von Proteinkomplexen ist (Vetter *et al.* 1999, Cingolani *et al.* 1999, Groves *et al.* 1999, Chook & Blobel 1999). Huntingtin besitzt ebenfalls PEST-Regionen, wobei 3 von 4 bioinformatisch vorausgesagten PEST-Regionen zwischen den 4 HEAT-Domänen liegen. PEST-Regionen sind Polypeptid-Sequenzen mit einer unstrukturierten Konformation im Protein, welche für proteolytische Spaltung durch Endopeptidasen zugänglich sind (Rechsteiner & Rogers 1996).

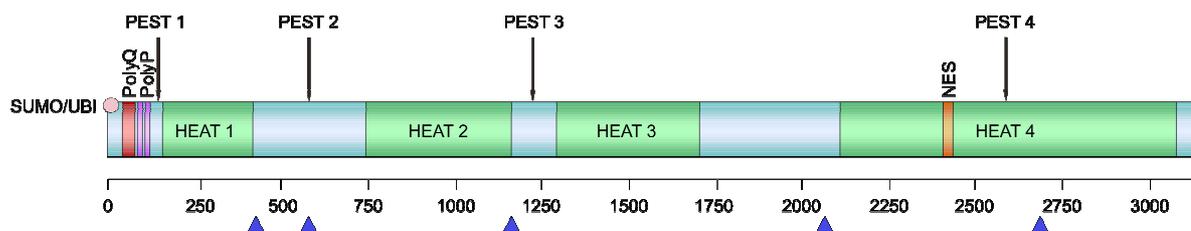


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz und Struktur von Huntingtin. Im N-terminalen Bereich kann sumoyliert (SUMO) und ubiquitinyliert (UBI) werden (Kreis). Huntingtin besitzt einen Polyglutamin-Abschnitt (PolyQ), gefolgt von zwei kurzen Polyprolin-Abschnitten (PolyP), 4 HEAT-Domänen und 4 PEST-Regionen. Blaue Dreiecke machen nachgewiesene Phosphorylierungsstellen deutlich. Im C-terminalen Bereich besitzt Huntingtin ein nukleäres Exportsignal (NES).

Das Protein Huntingtin unterliegt diversen posttranslationalen Modifikationen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass N-terminale Ubiquitinylierung von Huntingtin an den Lysin-Resten K6, K9 und K15 wichtig für die Degradierung durch den proteasomalen Abbauweg ist (Davies *et al.* 1997, Kalchman *et al.* 1996). Andere

posttranslationale Modifikationen von Huntingtin, wie Sumoylierung, Phosphorylierung und Palmitoylierung konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Steffan *et al.* 2004, Schilling *et al.* 2006, Yanai *et al.* 2006).

Die genaue Funktion von Huntingtin ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt. Sicher ist, dass Huntingtin für die Embryonalentwicklung und Neurogenese eine entscheidende, aber ungeklärte Rolle spielt. Huntingtin knock-out Mausembryonen (*Hdh*^{-/-}) zeigen einen erheblichen ektodermalen Zelltod und sterben am Tag E7.5 (Nasir *et al.* 1995, Duyao *et al.* 1995, Zeitlin *et al.* 1995, White *et al.* 1997). Huntingtin ist mit vielen Organellen und Strukturen in der Zelle, wie zum Beispiel Clathrin-coated Vesikel, Endosomen, Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Mikrotubuli und der Plasmamembran, assoziiert (DiFiglia *et al.* 1995, Trottier *et al.* 1995a, Gutekunst *et al.* 1995, Kegel *et al.* 2005) und scheint verschiedene zelluläre Funktionen im Zytoplasma und im Nukleus zu erfüllen. Es konnte in unabhängigen Arbeiten gezeigt werden, dass Huntingtin an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt ist und regulatorische Funktionen bei der Genexpression, dem Metabolismus, dem intrazellulären Transport und der Endozytose besitzt (siehe Kapitel 1.6) (Harjes & Wanker 2003, Li & Li 2004, Li & Li 2005, Zuccato *et al.* 2003, Singaraja *et al.* 2002, Gunawardena *et al.* 2003, Gauthier *et al.* 2004). Ein anti-apoptotischer Effekt von Huntingtin konnte ebenfalls nachgewiesen werden, da es die Aktivierung der Procaspase-8 runterreguliert (Gervais *et al.* 2002, Hackam *et al.* 2000).

1.5 Pathogenese von Chorea Huntington

Die (CAG)_n-Wiederholung im *huntingtin*-Gen kodiert für einen Polyglutamin-Abschnitt. Ist diese (CAG)_n-Wiederholung expandiert und besteht aus mehr als 40 CAG-Triplets bricht die Krankheit Chorea Huntington mit einer Penetranz von 100 % aus. Die Verlängerung dieses Abschnitts wird auch als „gain of function“-Mutation bezeichnet. Das heißt, Huntingtin gewinnt eine zusätzliche toxische Funktion dazu, welche bedeutend für die Krankheitsentstehung ist (Ambrose *et al.* 1994). Huntingtin-Proteine mit expandiertem Polyglutamin-Abschnitt neigen zur intrazellulären Aggregation unter Ausbildung einer β -Faltblattstruktur (Perutz *et al.* 1994). Die Zusammenlagerung dieser β -Stränge bildet einen polaren „Zipper“, der durch Wasserstoffbrückenbindungen zusätzlich stabilisiert wird. Intrazelluläre Aggregate, bestehend aus mutierten Huntingtin-Proteinen, konnten in diversen Zellkultur-Modellen, in verschiedenen Tier-Modellen und in post-mortalen Chorea

Huntington-Gehirnen nachgewiesen werden (DiFiglia *et al.* 1997, Gutekunst *et al.* 1999, Lunkes *et al.* 2002, Schilling *et al.* 2007).

Eines der ersten und am besten charakterisierten Tier-Modelle, die zur Aufklärung von Chorea Huntington generiert wurden, ist die transgene Mauslinie R6/2, die das Exon 1 des *huntingtin*-Gens mit circa 150 Glutaminen exprimiert. Diese Mäuse entwickeln einen progressiven neurologischen Phänotyp mit vielen Chorea Huntington-typischen Merkmalen, wie motorische Dysfunktionen oder sichtliche Verhaltensabnormalitäten schon nach 5 Wochen, gefolgt von einem frühzeitigen Tod nach etwa 12 Wochen (Mangiarini L 1996, Carter *et al.* 1999). Analysen der transgenen Mäuse bestätigten neuronale Dysfunktionen und intrazelluläre Huntingtin-Aggregation (Davies *et al.* 1997, Turmaine *et al.* 2000, Li *et al.* 1999). Immunhistochemische Untersuchungen von post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen ließen erkennen, dass mutierte Huntingtin-Proteine in zytoplasmatischen und nukleären Einschlusskörpern zu finden sind (DiFiglia *et al.* 1997, Schilling *et al.* 2007, Hoffner *et al.* 2005, Becher *et al.* 1998). Zelluläre Einschlusskörper sind mikroskopisch sichtbare ubiquitinylierte Huntingtin-Aggregate mit rekrutierten Interaktionspartnern. Es konnten ebenfalls Proteasomen-Untereinheiten und Chaperone in diesen Einschlüssen nachgewiesen werden (Wanderer & Morton 2007, Rousseau *et al.* 2009). Interessanterweise konnten die nukleären Einschlusskörper nur mit Antikörpern gegen N-terminale Bereiche von Huntingtin detektiert werden und nicht mit Antikörpern gegen C-terminale Bereiche, was darauf schließen ließ, dass nukleäre Aggregate aus N-terminalen Huntingtin-Fragmenten und nicht aus Vollängen-Huntingtin-Proteinen bestehen. Dies könnte auch die Lokalisation von Huntingtin im Zellkern erklären, da Huntingtin kein funktionell aktives nukleäres Lokalisationssignal (NLS) besitzt und als Vollängenprotein zu groß ist, um frei in den Zellkern zu diffundieren. Die Generierung von kleineren N-terminalen Fragmenten könnte somit ein Grund für den passiven Transport von Huntingtin in den Zellkern mit anschließender Aggregation sein (Ross *et al.* 1997, Hackam *et al.* 1998). Da Vollängen-Huntingtin ein klassisches nukleäres Exportsignal (NES) im C-terminalen Bereich besitzt und N-terminale Fragmente dieses durch proteolytische Prozessierung verlieren, könnte somit der Verbleib der Fragmente im Nukleus erklärt werden (Xia *et al.* 2003). Auf Grund dieser Erkenntnis wurden Untersuchungen durchgeführt, um zu klären, ob die nukleäre Lokalisation von mutiertem Huntingtin wichtig für die Pathogenese von Chorea Huntington ist. Nach der Expression von N-terminalem mutiertem Huntingtin mit 171 Aminosäuren in striatalen Zellen konnten intranukleäre Einschlusskörper und Apoptose detektiert werden (Saudou *et al.* 1998). Mutierte Huntingtin-Proteine mit den ersten 171 Aminosäuren und einem NES sind nicht in der Lage nukleär zu aggregieren. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass

zytoplasmatisch lokalisiertes Huntingtin keine Neurodegeneration auslöst und nicht toxisch für Zellen ist (Saudou *et al.* 1998). HD-N171-82Q transgene Mäuse, die N-terminales Huntingtin mit 171 Aminosäuren und 82 Glutaminen exprimieren, zeigen denselben Phänotyp wie transgene Mäuse, die dasselbe Protein exprimieren, welches aber mit einem NLS fusioniert ist (Schilling *et al.* 2004). Die NLS-N171-82Q Mauslinie unterscheidet sich von der HD-N171-82Q Mauslinie in der subzellulären Lokalisation des transgenen Proteinprodukts. HD-N171-82Q Mäuse haben zytoplasmatische und nukleäre Einschlüsse und NLS-N171-82Q Mäuse haben nur nukleäre Einschlüsse, was zeigt, dass zytoplasmatische Einschlusskörper *in vivo* nicht toxisch sind und dass nukleär lokalisiertes Huntingtin eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Chorea Huntington spielt. Die abnormale nukleäre Akkumulation und Aggregation von mutierten Huntingtin-Fragmenten führt zu einer dysregulierten Genexpression auf Transkriptionsebene (Abb. 3).

Mehrere Transkriptionsfaktoren, die Huntingtin binden, konnten identifiziert werden (Li & Li 2004, Sugars & Rubinsztein 2003). Mutiertes Huntingtin in löslicher Form oder aggregiert, kann mit basalen Transkriptionsfaktoren, wie TATA-Box-Bindeprotein (TBP), CREB-Bindeprotein (CBP), Transkriptionsfaktor II F (TFIIF), p53, NF- κ B und Sp1 interagieren und diese sequestrieren (Zhai *et al.* 2005, Li *et al.* 2002, Nucifora *et al.* 2001, Steffan *et al.* 2000, Bae *et al.* 2005). Die Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren in nukleäre Einschlusskörper reduziert deren Level zur transkriptionellen Regulation. Die Änderung der Expression von verschiedenen Genen in Chorea Huntington Maus-Modellen kann auf Grund der Sequestrierung von wichtigen Faktoren in nukleäre Einschlüsse oder durch die Interaktion von löslichem mutiertem Huntingtin mit Transkriptionsfaktoren erfolgen (Tallaksen-Greene *et al.* 2005, Yu *et al.* 2002, Dunah *et al.* 2002). Mutiertes Huntingtin interferiert zum Beispiel mit der transkriptionellen Regulation des Nervenwachstumsfaktors BDNF (brain-derived neurotrophic factor), welcher eine Schlüsselrolle für das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen hat und in Chorea Huntington-Patienten stark reduziert ist (Zuccato *et al.* 2001, Zuccato *et al.* 2003, Strand *et al.* 2007, Lynch *et al.* 2007). Eine natürliche Funktion von Huntingtin mit einem normalen Polyglutamin-Abschnitt ist die Sequestrierung des Faktors REST/NRSF (R element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor), ein Repressor der Transkription von BDNF, im Zytoplasma. Durch die Expansion des Polyglutamin-Abschnitts in Huntingtin verbleibt REST/NRSF im Nukleus und reprimiert die Expression von BDNF und anderen neuronalen Genen (Zuccato *et al.* 2001, Zuccato *et al.* 2003). Eine Reduktion der REST/NRSF-Aktivität erhöht die BDNF-Expression und ist neuroprotektiv (Rigamonti *et al.* 2007).

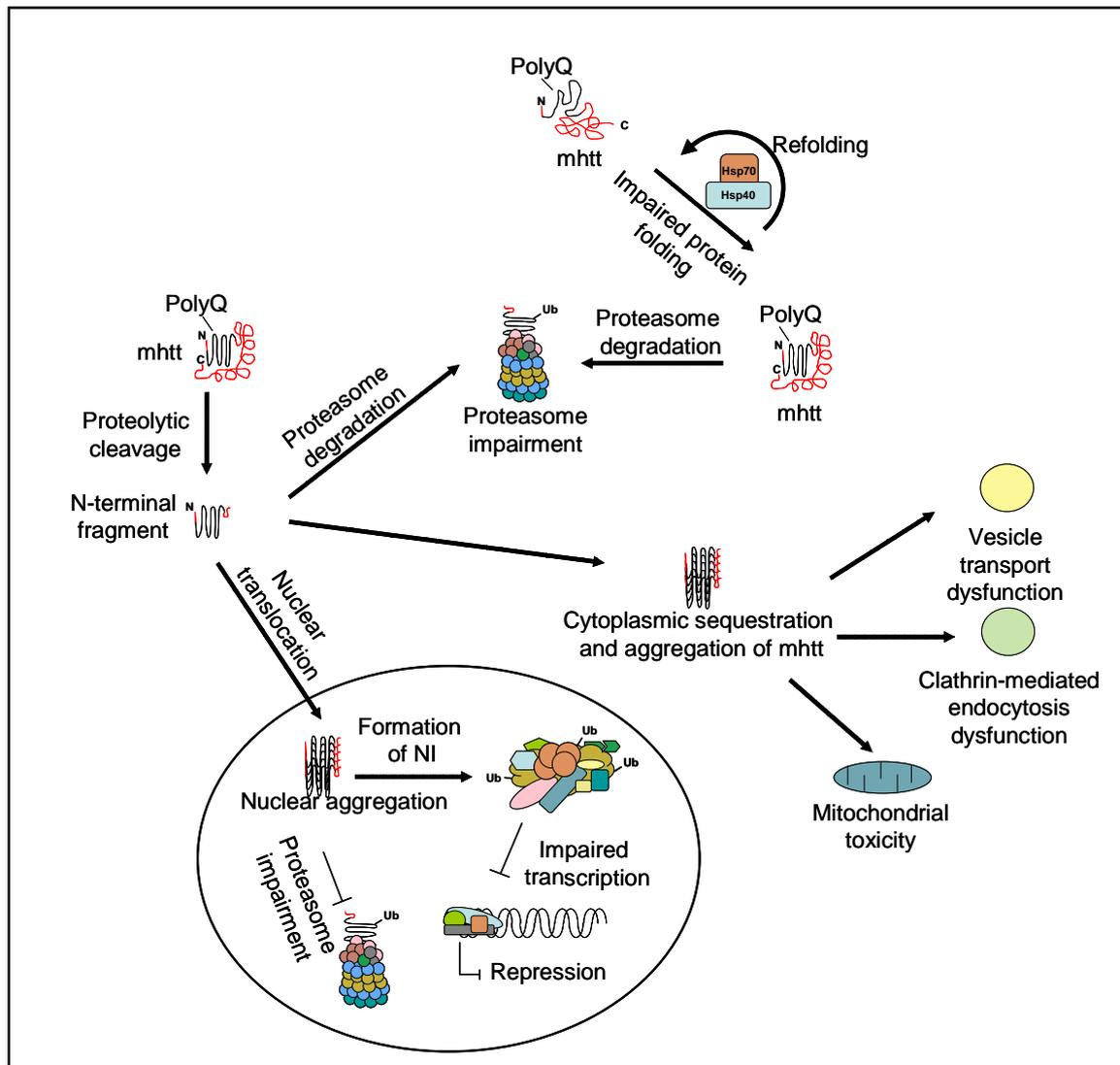


Abbildung 3: Modell für die Pathogenese von Chorea Huntington. Mutierte Huntingtin-Proteine (mhtt) können zytoplasmatisch und nukleär aggregieren und in mikroskopisch sichtbaren Einschlusskörpern detektiert werden. Mutiertes Huntingtin kann verschiedene zelluläre Prozesse beeinflussen. NI = nuclear inclusion (nukleärer Einschlusskörper). Modifiziert nach Landles & Bates, 2004.

Im Gegensatz dazu haben mehrere Studien bewiesen, dass mutiertes Huntingtin nicht nur im Nukleus sondern auch im Zytoplasma Dysfunktionen hervorruft. Eine intensive Suche nach Interaktionen zwischen zytoplasmatischen Proteinen und mutiertem beziehungsweise normalem Huntingtin mit Hilfe der Zweihybrid-Technologie und *in vitro*-Bindungsstudien bestätigte eine Vielzahl von Interaktionspartnern (Harjes & Wanker 2003, Sharp *et al.* 1995, Borrell-Pages *et al.* 2006). Zwei Interaktionspartner von Huntingtin, HAP1 (Huntingtin-associated protein 1) und HIP1 (Huntingtin-interacting protein 1), sind am intrazellulären Transport beteiligt. HAP1 ist assoziiert mit Dynaktin p150, einem Protein, das im Mikrotubuli-abhängigen retrograden Transport involviert ist, und mit Kinesin, welches den

anterograden Transport vermittelt (Engelender *et al.* 1997, Li *et al.* 1998, McGuire *et al.* 2006). Normales Huntingtin ist assoziiert mit HAP1 und stimuliert den Transport von Vesikeln entlang der Mikrotubuli (Gauthier *et al.* 2004). HAP1 bindet mutiertes Huntingtin stärker als normales Huntingtin, was zu einer Freisetzung des molekularen Motors von den Mikrotubuli führt. Es konnte gezeigt werden, dass mutiertes Huntingtin den vesikulären Transport von BDNF in striatalen Neuronen stark reduziert und die betroffenen Neuronen schneller absterben. Anders als HAP1 bindet HIP1 mutiertes Huntingtin schwächer als normales Huntingtin (Kalchman *et al.* 1997). HIP1 braucht die Interaktion mit normalem Huntingtin, um seine Zytoskelett- und Endozytose-assoziierte Funktion auszuüben. Eine andere Theorie besagt, wenn Huntingtin einen expandierten Polyglutamin-Abschnitt besitzt, kann es HIP1 nicht mehr binden, welches dann wiederum über seiner Todesdomäne mit dem Interaktionspartner HIPPI (HIP1 protein interactor) interagiert und durch Aktivierung der Caspase-8 Apoptose auslöst (Gervais *et al.* 2002).

Mutierte Huntingtin-Proteine können nicht nur in Nuklei von Neuronen sondern auch in Axonen Aggregate bilden (Li *et al.* 2000). Aggregation von mutiertem Huntingtin führt zu einem veränderten axonalen Transport und hat einen neuronalen Zelltod in Zellkultur- und Drosophila-Modellen zur Folge (Gunawardena *et al.* 2003, Li *et al.* 2000, Szebenyi *et al.* 2003, Trushina *et al.* 2004, Lee *et al.* 2004). Die Aggregate blockieren den Transport von Vesikeln und von Organellen, wie beispielsweise Mitochondrien. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass in frühen Phasen der Krankheit Chorea Huntington die fehlerhafte Interaktion von löslichem Huntingtin mit HAP1 durch den expandierten Polyglutamin-Abschnitt den intrazellulären Transport unterbricht. In späteren Phasen der Krankheit kommt es zu einem Defekt im Transport in Neuronen durch axonal lokalisierte Aggregate. Untersuchungen zur Funktion von normalem Huntingtin gaben Aufschluss, dass nicht nur die „gain of function“-Mutation und die darausfolgende neue toxische Eigenschaft von mutiertem Huntingtin wichtig für die Pathogenese von Chorea Huntington ist sondern dass ein Verlust der normalen und protektiven Funktion von Huntingtin („loss of function“) durch die Expansion des Polyglutamin-Abschnitts eine Rolle in dem zellulären Mechanismus spielt, welcher zum ultimativen Zelltod spezifischer Neuronen führt (Rigamonti *et al.* 2000, Leavitt *et al.* 2001, Busch *et al.* 2003).

Chorea Huntington-Patienten weisen metabolische Defekte, charakterisiert durch Gewichtsverlust trotz genügender Zufuhr von Energie, auf (Leenders *et al.* 1986, Jenkins *et al.* 1993). Diese Defekte konnten mit mitochondrialer Dysfunktion in Zusammenhang gebracht werden (Browne & Beal 2004, Browne & Beal 2006, Browne *et al.* 1997). Lange vor dem Eintreten von motorischen Dysfunktionen konnten Änderungen im striatalen Glucose-Metabolismus in

Chorea Huntington-Patienten nachgewiesen werden (Grafton *et al.* 1992, Antonini *et al.* 1996). Mutiertes Huntingtin kann die mitochondriale Funktion unterschiedlich beeinflussen. So wurde eine erhöhte mitochondriale Depolarisation und eine defekte Calcium-Homöostase in betroffenen Patienten und in einem transgenen Maus-Modell detektiert (Sawa *et al.* 1999, Panov *et al.* 2002). Ursache hierfür könnte entweder eine direkte Bindung von mutiertem Huntingtin an die mitochondriale Membran sein oder ein indirekter Effekt durch Repression der Transkription von PGC-1 α , ein Co-Aktivator der Transkription zur Regulation mitochondrialer Biogenese und oxidativer Phosphorylierung (Cui *et al.* 2006, Weydt *et al.* 2006).

Aggregation ist ein Merkmal fehlgefalteter Proteine und wenn die Menge der abnormal gefalteten Proteine die Degradierung dieser in der Zelle übersteigt, dann kommt es zur Bildung von unlöslichen Aggregaten. Normalerweise versuchen das Ubiquitin-Proteasom-System und molekulare Chaperone diese Aggregation zu verhindern (Fink 1999, Voges *et al.* 1999). Ein neuropathologisches Merkmal von Chorea Huntington und anderen neurodegenerativen Krankheiten ist das Vorkommen von intrazellulären Einschlüssen, bestehend aus aggregierten, ubiquitinylierten Huntingtin-Proteinen, verschiedenen Interaktionspartnern und einer Kolo-kalisation von Chaperonen und Proteasomen-Untereinheiten, was darauf schließen lässt, dass ein Fehler in der Degradierung der mutierten Polyglutamin-haltigen Proteine besteht (Ciechanover & Brundin 2003). *In vitro* und *in vivo* können Chaperone der Hsp70- und Hsp40-Familien mit mutiertem Huntingtin interagieren und sind mit Aggregaten kolokalisiert (Jana *et al.* 2000, Verhoef *et al.* 2002). Die Sequestrierung von Chaperonen in Aggregate verringert die Menge frei verfügbarer Chaperone in der Zelle und verstärkt wiederum die Fehlfaltung von Proteinen (Hay *et al.* 2004). Die Überexpression von Hsp70- und Hsp40-Chaperonen verhindert Neurodegeneration in einem Drosophila-Modell und ändert die biochemischen Eigenschaften von unlöslichen Aggregaten, so dass amorphe Strukturen entstehen (Muchowski *et al.* 2000, Chan *et al.* 2000). Das Proteasom selbst ist nicht in der Lage Polyglutamin-Abschnitte proteolytisch zu spalten. Folglich werden diese Polyglutamin-haltigen Peptide in das Zytoplasma zur weiteren Proteolyse durch Peptidasen entlassen (Venkatraman *et al.* 2004). Bence *et al.* konnten zeigen, dass die Expression N-terminaler mutierter Huntingtin-Fragmente nach transienter Transfektion eine vollständige Inhibierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems zur Folge hatte (Bence *et al.* 2001). Polyglutamin-haltige Peptide können direkt oder indirekt die proteasomale Funktion beeinträchtigen, aber weitere Untersuchungen sind nötig, um die vollständigen zellulären Mechanismen zu klären (Bennett *et al.* 2007).

Obwohl eine intensive Forschung in den letzten Jahren zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen in Chorea Huntington geführt hat, bleiben einige Fragen unbeantwortet. Warum mutiertes Huntingtin, obwohl es ubiquitär exprimiert wird, besonders für spezifische striatale Neuronen toxisch ist, bleibt unklar. Ebenfalls von Interesse ist die Beantwortung der Frage, ob die nukleäre oder/und zytoplasmatische Lokalisation von mutiertem Huntingtin wichtig für die Pathogenese von Chorea Huntington ist.

1.5.1 Aggregation von Huntingtin

Obwohl zelluläre Einschlusskörper ein pathologisches Merkmal von neurodegenerativen Erkrankungen sind, wird ihre Rolle in der Protein-Aggregation kontrovers diskutiert. Verschiedene Arbeiten gaben einen Hinweis darauf, dass die Formation von Einschlusskörpern einen zellulären Schutz darstellt und die Zellen Mechanismen entwickelt haben, um mit den fehlgefalteten und aggregierten Proteinen umgehen zu können (Ross & Poirier 2005).

In Chorea Huntington-Gehirnen sind zytoplasmatische und nukleäre Einschlüsse im Corpus striatum, dem am stärksten betroffenen Gehirnareal, zu finden. Interessanterweise ist die Menge der Einschlüsse in der Großhirnrinde, die mäßig betroffen ist, höher als im Corpus striatum (Gutekunst *et al.* 1999). Des Weiteren sind striatale Einschlüsse häufiger in Interneuronen als in den am stärksten betroffenen Neuronen, den mittelgroßen bedornten striatalen Neurone („medium spiny neurons“) (Kuemmerle *et al.* 1999). Eine *in vitro*-Studie von Saudou *et al.* wies eine geringe Korrelation zwischen Einschlusskörpern und neuronaler Toxizität nach der transienten Transfektion von striatalen Zellen mit N-terminalen Huntingtin-Konstrukten auf (Saudou *et al.* 1998). Mittels Lebendzell-Bildgebung konnten Arrasate *et al.* den Effekt von exprimierten N-terminalen Huntingtin-Fragmenten fusioniert mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) auf die Zellviabilität über die Zeit analysieren (Arrasate *et al.* 2004). Neurone, die keine Einschlusskörper gebildet hatten, starben eher als Neurone mit Einschlusskörpern. Obwohl diese Studie nicht bewies, dass zelluläre Einschlüsse protektiv sind, unterstützte sie diese Hypothese. Alle diese Untersuchungen lieferten Hinweise, dass unlösliches mutiertes Huntingtin in zellulären Einschlüssen nicht toxisch ist und lösliches mutiertes Huntingtin wahrscheinlich toxisch ist. Bei der Alzheimer-Krankheit gibt es ebenfalls nur eine schwache Korrelation zwischen der Menge an amyloiden Plaques in humanen post-mortalen Gehirnen und deren klinischen Krankheitsbild (Terry *et al.* 1991).

Ähnlich ist es bei der Parkinson-Krankheit mit einer geringen Korrelation zwischen dem Vorhandensein von zytoplasmatischen Aggregaten (Lewy-Körperchen) und dem Zelltod in der Substantia nigra (Tompkins & Hill 1997).

Eine wichtige Frage in der Untersuchung von Aggregation in neurodegenerativen Krankheiten ist: Was ist die toxische Spezies? Sind abnormal gefaltete Monomere oder oligomere Formen toxisch? Proteinaggregation scheint ein komplexer Prozess mit mehreren Zwischenstufen zu sein (Abb. 4). Es könnte ein linearer Weg von Monomeren über Oligomere, Protofibrillen und Fibrillen sein oder eine Serie von parallelen Prozessen, wo beispielsweise amyloide Fibrillen durch Anlagerung von Monomeren wachsen. Nagai *et al.* konnten nachweisen, dass fehlgefaltete β -Faltblatt-reiche Polyglutamin-Monomere toxisch für Zellen sind und deren Bildung durch das Polyglutamin-bindende Peptid QBP1 verhindert werden kann (Nagai *et al.* 2007). QBP1 kann die Transition von einem unstrukturierten Polyglutamin-Peptid in ein toxisches und lösliches Monomer mit fehlgefalteter β -Faltblattstruktur inhibieren.

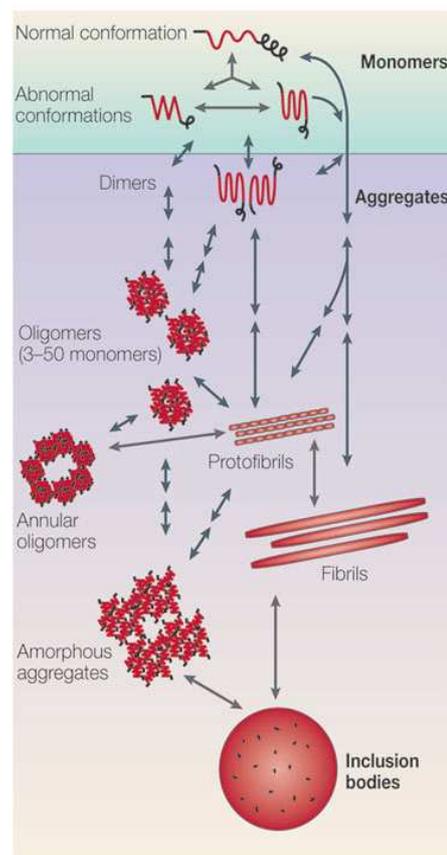


Abbildung 4: Potentielle Synthesewege zur Formation von Aggregaten und zellulären Einschlusskörpern in neurodegenerativen Krankheiten. Die abnormale Faltung des Monomers initiiert den Aggregationsprozess. Wenn ein Aggregat lichtmikroskopisch sichtbar ist, wird es als Einschlusskörper (inclusion body) bezeichnet. Quelle: Ross & Poirier 2005.

Gegensätzlich dazu konnten Takahashi *et al.* zeigen, dass neuronale Zellen, die Polyglutamin-Fusionsproteine exprimieren, toxische Oligomere bilden (Takahashi *et al.* 2008). Es ist noch ungeklärt, ob es nur eine oder mehrere toxische Spezies von Huntingtin gibt. Zusätzlich sollte der biologische Kontext nicht außer Acht gelassen werden. Verschiedene Zelltypen könnten unterschiedlich empfindlich für toxische Spezies sein und es gibt Hinweise, dass verschieden große Huntingtin-Fragmente unterschiedlich toxisch sein können, wobei hier die Polyglutamin-flankierenden Sequenzen eine Rolle spielen. Huntingtin ist ein Substrat für mehrere Proteasen und kann zu verschieden langen N-terminalen Fragmenten prozessiert werden, die jeweils ein unterschiedliches Potential für Toxizität haben (Slow *et al.* 2005). Weiterführende Untersuchungen des Aggregationsprozesses sind essentiell, um die pathogenen Mechanismen in Chorea Huntington vollständig zu verstehen.

1.5.2 Proteolyse von Huntingtin

Post-mortale Chorea Huntington-Gehirne wiesen Huntingtin-Fragmente auf, die nur mit N-terminalen Huntingtin-Antikörpern detektierbar waren (DiFiglia *et al.* 1997, Sieradzan *et al.* 1999, Lunkes *et al.* 2002). Diese N-terminalen Huntingtin-Fragmente waren hauptsächlich nukleär lokalisiert und in Einschlusskörpern zu finden. Darauf folgende Studien in Maus- und Zellkultur-Modellen gaben weitere Hinweise, dass Huntingtin proteolytisch prozessiert wird (Lunkes *et al.* 2002, Schilling *et al.* 1999, Schilling *et al.* 2007, Wellington *et al.* 1998, Wellington *et al.* 2000, Tanaka *et al.* 2006, Ratovitski *et al.* 2007). Kürzere N-terminale Fragmente, welche den expandierten Polyglutamin-Abschnitt besitzen, neigen stärker zur Aggregation im Vergleich zu Vollängen-Huntingtin (Cooper *et al.* 1998, Lunkes & Mandel 1998). Die Formation von Aggregaten ist abhängig von der Länge des Polyglutamin-Abschnitts und von der Länge des Huntingtin-Proteins, das heißt, je länger die (CAG)_n-Wiederholung im *huntingtin*-Gen und je kürzer die kodierte *huntingtin*-Sequenz, desto stärker die Aggregation (Martindale *et al.* 1998, Hackam *et al.* 1998, Wellington *et al.* 2002). Chorea Huntington Maus-Modelle, die mutierte N-terminale Huntingtin-Fragmente exprimieren, zeigen einen stärkeren Phänotyp und einen früheren Todeszeitpunkt als Maus-Modelle, die Vollängen-Huntingtin exprimieren (Hodgson *et al.* 1999, Wheeler *et al.* 2000, Schilling *et al.* 1999, Mangiarini L 1996). Durch die Abspaltung des langen C-terminalen Bereichs könnte der abnormal gefaltete expandierte Polyglutamin-Abschnitt im N-terminalen Huntingtin-Fragment besser zugänglich für Interaktionen sein und durch die konformelle Änderung

effizienter als N-terminale Fragmente mit einem normalen Polyglutamin-Abschnitt oder mutierte Vollängen-Protein aggregieren (Cooper *et al.* 1998, Martindale *et al.* 1998, Schilling *et al.* 1999).

Mehrere Studien demonstrierten, dass Vollängen-Huntingtin ein Substrat für verschiedene Proteasen ist (Goldberg *et al.* 1996, Wellington *et al.* 2002, Wellington *et al.* 1998, Lunkes *et al.* 2002, Gafni *et al.* 2004, Kim *et al.* 2006). Die ersten 600 N-terminalen Aminosäuren von Huntingtin besitzen Spaltstellen für Caspasen, Calpaine und Aspartylproteasen (Abb. 5). Es konnte in verschiedenen Tier- und Zellkultur-Modellen gezeigt werden, dass N-terminale Fragmente toxisch sind und die Toxizität proportional mit der Länge des Polyglutamin-Abschnitts steigt (Martindale *et al.* 1998, Cooper *et al.* 1998, Wellington *et al.* 2000, Gafni *et al.* 2004, Faber *et al.* 1999). Des Weiteren sind die löslichen N-terminalen Huntingtin-Fragmente deutlich früher detektierbar als intrazelluläre Aggregate und neurodegenerative Veränderungen (Wellington *et al.* 2002). Diese Erkenntnis führte zu der Annahme, dass kürzere N-terminale Fragmente, die durch Proteolyse generiert wurden, eine essentielle Rolle in der Neurodegeneration bei Chorea Huntington spielen.

Huntingtin wird *in vitro* und *in vivo* durch Caspasen gespalten, welche spezifisch nach Aspartat-Resten (P1) schneiden, wobei die Sequenz der nachfolgenden Aminosäuren (P2, P3, P4) die Substratspezifität der verschiedenen Caspasen bestimmt. Caspasen sind spezifische Cystein-Proteasen, die für die kontrollierte Proteolyse im apoptotischen Zelltod verantwortlich sind. Obwohl Caspasen wichtige Mediatoren der Apoptose sind, können sie andere zelluläre Bedeutungen haben und eine wichtige physiologische Rolle in lebenden Zellen spielen (Mattson 2000, Mattson & Duan 1999, Yan *et al.* 2001, Roy *et al.* 2001).

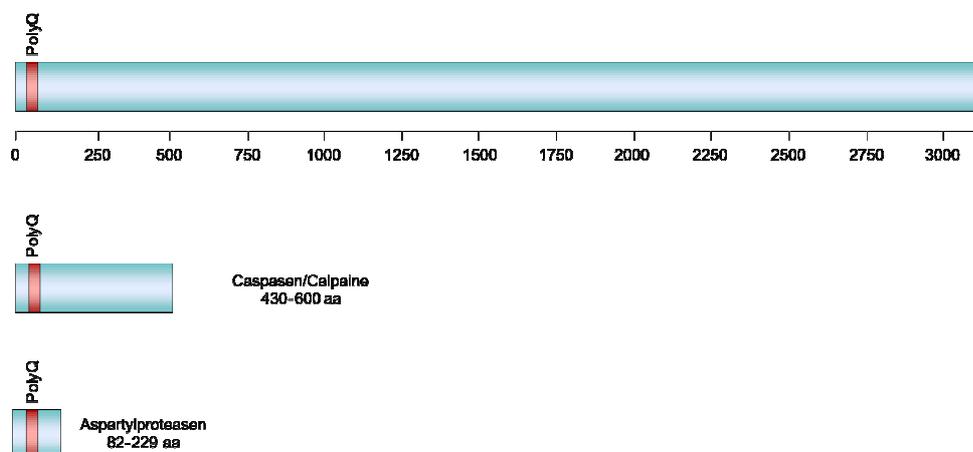


Abbildung 5: Schema der N-terminalen Proteolyse von Huntingtin. Caspasen, Calpaine und Aspartylproteasen können Huntingtin spalten und generieren somit N-terminale Fragmente mit dem Polyglutamin-Abschnitt.

Caspase 3 spaltet Huntingtin nach Aminosäure 513 und 552, Caspase 6 nach Aminosäure 586 und Caspase 2 nach Aminosäure 552 (Wellington *et al.* 2002, Wellington *et al.* 2000, Graham *et al.* 2006). Die Spaltung nach diesen spezifischen Aminosäuren wurde durch *in vitro*-Assays bestätigt, indem *in vitro*-translatiertes Huntingtin mit rekombinanten Caspasen inkubiert wurde (Wellington *et al.* 1998, Wellington *et al.* 2000, Goldberg *et al.* 1996). Caspase-generierte N-terminale Huntingtin-Fragmente mit normalem und expandiertem Polyglutamin-Abschnitt konnten mit Hilfe von Neopepitop-spezifischen Antikörpern (erkennen die neuen Spaltstellen in Caspase-Fragmenten) in post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen und in post-mortalen Kontrollgehirnen nachgewiesen werden (Wellington *et al.* 2002, Kim *et al.* 2001). In YAC128-Mäusen (Yeast arung artificial chromosome), die Vollängen-Huntingtin mit 128 Glutaminen exprimieren, konnten Caspase-Fragmente vor der Bildung von Aggregaten und den ersten Anzeichen von Neurodegeneration nachgewiesen werden (Wellington *et al.* 2002). YAC128-Mäuse, die entweder die Caspase 3- oder Caspase 2-Schnittstelle (Aminosäuren 513 und 552) mutiert hatten, zeigten keinen unterschiedlichen Phänotyp zu Kontrollmäusen. Interessanterweise haben YAC128-Mäuse mit mutierter Caspase 6-Schnittstelle (Aminosäure 586) keinen YAC128-typischen Phänotyp mit motorischen, kognitiven und neuropathologischen Defiziten, was darauf hindeutet, dass das Caspase 6-Fragment und nicht die Caspase 2- und 3-Fragmente *in vivo* toxisch ist (Graham *et al.* 2006). Caspasen spalten auch andere Polyglutamin-haltige Proteine, die in neurodegenerativen Krankheiten eine Rolle spielen. So werden unter anderem Atrophin-1, der Androgen-Rezeptor und Ataxin-7 durch Caspasen gespalten und kürzere Polyglutamin-haltige Fragmente generiert, welche toxisch in Zellkultur-Modellen sind (Ellerby *et al.* 1999a, Ellerby *et al.* 1999b, Young *et al.* 2007).

Eine zweite Gruppe von Proteasen, die Huntingtin spalten können, sind Calpaine. Calpaine sind eine Familie von ubiquitär exprimierten Ca^{2+} -abhängigen Cystein-Proteasen, die als Heterodimer mit einer katalytischen und einer regulatorischen Domäne agieren (Chan und Mattson, 1999). Huntingtin wird von Calpain 1 und 2 prozessiert, wobei Calpain 1 eine mikromolare und Calpain 2 eine millimolare Calcium-Konzentration zur Aktivierung benötigt (Kim *et al.* 2001, Goffredo *et al.* 2002, Gafni *et al.* 2004, Sun *et al.* 2002). Vermutlich spielen der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel und Calpaine eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Chorea Huntington (Gafni & Ellerby 2002). Defekte in der mitochondrialen Calcium-Regulation von YAC72-Mäusen konnten beobachtet und ein Zusammenhang mit der Aktivierung von Calpainen bestätigt werden (Panov *et al.* 2002). Die Störung der zellulären Calcium-Homöostase aktiviert Calcium-abhängige Enzyme wie Calpaine. Die verstärkte Aktivierung von Calpainen konnte in post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen im

Vergleich zu Gehirnen von gleichaltrigen Kontrollpersonen nachgewiesen werden (Gafni & Ellerby 2002). Zusätzlich konnten immunhistochemische Analysen mit Calpain-Antikörpern eine Kollokalisierung von Calpainen und Huntingtin-Aggregaten in Chorea Huntington-Gehirnen zeigen (Gafni & Ellerby 2002). Calpain 1 und 2 spalten Huntingtin im N-terminalen Bereich nach den Aminosäuren 469 und 536, wobei dieser Bereich mit den Caspase-Spaltstellen überlappt. In HEK 293-Zellen, die mit Thapsigargin behandelt und mit Caspase-resistenten Huntingtin-Konstrukten transfiziert wurden, konnte eine Caspase-unabhängige Calpain-Spaltung detektiert werden. Nach einer Deletion der beiden Calpain-Spaltstellen in Huntingtin konnte außerdem die Generierung von N-terminalen Fragmenten durch Calpaine unterdrückt und eine reduzierte Toxizität indirekt gemessen werden (Gafni & Ellerby 2002, Gafni *et al.* 2004).

Calpaine und Caspasen sind involviert in apoptotische Prozesse und können in Zusammenhang mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen gebracht werden, wobei derzeit noch unklar ist in welcher genauen wechselseitigen Beziehung diese beiden Protease-Familien in diesen Erkrankungen stehen (Tarlac & Storey 2003).

Wie bereits erwähnt, aggregieren mutierte N-terminale Huntingtin-Fragmente zytoplasmatisch und nukleär. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass N-terminale Fragmente, welche deutlich kürzer sind als die circa 500 Aminosäure langen Caspase- und Calpain-generierten Fragmente, in zellulären Einschlusskörpern oder als lösliche Proteine in post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen, Zellkultur- und Maus-Modellen zu finden sind (DiFiglia *et al.* 1997, Lunkes *et al.* 2002, Li *et al.* 2000, Schilling *et al.* 1999, Schilling *et al.* 2007, Tanaka *et al.* 2006). Lunkes *et al.* wiesen zwei N-terminale Fragmente, die sie cp-A und cp-B nannten, in einem neuronalen Zellkultur-Modell und in post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Western Blot Analyse nach (Lunkes *et al.* 2002). Interessanterweise war das Spaltprodukt cp-A nur im Nukleus und das Spaltprodukt cp-B nur im Zytoplasma lokalisiert. Mit Hilfe von Antikörpern gegen N-terminale Epitope von Huntingtin konnten die Spaltregionen eingeeengt werden. Cp-A wurde mit dem Huntingtin-Antikörper gegen Aminosäure 1-82, aber nicht mit dem Antikörper gegen Aminosäure 115-129 nukleär detektiert. Cp-B wiederum konnte mit dem Antikörper gegen Aminosäure 115-129, aber nicht mit dem Antikörper gegen Aminosäure 214-229 detektiert werden. Mutationsanalysen zeigten, dass die Deletion Aminosäure 105-114 die Generierung von cp-A verhindert und die Deletion von Aminosäure 205-214 die Bildung von cp-B stark reduziert (Lunkes *et al.* 2002, Kim *et al.* 2006). Die Fragmentierung konnte durch den Protease-Inhibitor Pepstatin verhindert werden, was darauf hinweist, dass Aspartylproteasen verantwortlich für die Generierung von cp-A und cp-B sind. Ratovitski *et al.* detektierten

ebenfalls, in stabilen PC12-Zellen mit der Expression von Vollängen-Huntingtin und 126 Glutaminen, zwei N-terminale Spaltprodukte (cp-1 und cp-2) mit vergleichbaren Größen zu cp-A und cp-B, welche durch eine Caspase-unabhängige Proteolyse generiert wurden (Ratovitski *et al.* 2007). Massenspektrometrische Analysen von cp-2 lokalisierten die Spaltstelle nach Aminosäure 167 und die Deletion von Aminosäure 167-170 verhinderte die Bildung von cp-2 mit einer Verbesserung der Zellviabilität (Ratovitski *et al.* 2009). Im transgenen Maus-Modell mit den ersten N-terminalen 171 Aminosäuren von Huntingtin und 82, 44 oder 18 Glutaminen konnte die Generierung eines N-terminalen Fragments, mit einer Größe vergleichbar zu cp-A, unabhängig von der Länge des Polyglutamin-Abschnitts nachgewiesen werden (Schilling *et al.* 1999). N-terminale Proteolyse von Huntingtin ist ein normaler Prozess und kann in unterschiedlichen Gehirnarealen von post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen sowie Kontrollgehirnen beobachtet werden (Mende-Mueller *et al.* 2001, Kim *et al.* 2001, Toneff *et al.* 2002). Die Spaltung von normalen Huntingtin durch Proteasen könnte eine physiologische Bedeutung haben.

Bis jetzt ist wenig über die Generierung von kurzen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten bekannt. Da die proteolytische Prozessierung und die Bildung von N-terminalen Fragmenten wahrscheinlich ein initialer Schritte in der Pathogenese von Chorea Huntington ist, sind umfangreichere Studien essentiell, um die pathogenen Ereignisse dieser und anderer Polyglutamin-Krankheiten zu verstehen.

1.6 Zielstellung

Chorea Huntington ist eine von neun neurodegenerativen Polyglutamin-Erkrankungen. Die Expansion des Polyglutamin-Abschnitts von Huntingtin führt zu einer abnormalen Konformation, was eine Aggregation mutierter Huntingtin-Proteine und eine veränderte Interaktion mit anderen Proteinen zur Folge hat. Aggregate im Zytoplasma und im Nukleus bestehen aus N-terminalen Huntingtin-Fragmenten, das heißt, bevor die Initiierung des Aggregationsprozesses erfolgt, wird lösliches Vollängen-Huntingtin proteolytisch prozessiert, wobei anschließend die kürzeren N-terminalen Fragmente ein höheres Aggregationspotential als die Vollängen-Proteine haben. Zusätzlich zu den Caspase- und Calpain-generierten Fragmenten wurden viel kürzere N-terminale Fragmente detektiert, die zytoplasmatisch und nukleär aggregieren, aber kaum charakterisiert sind. Es besteht die

Hypothese, dass kurze N-terminale Huntingtin-Fragmente krankheitsassoziiert sind und eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Chorea Huntington spielen.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Zellkultur-Modells zur Analyse der N-terminalen Proteolyse von Huntingtin. Es sollte die Spaltregion identifiziert und die Beeinflussung der Spalteffizienz mit Hilfe von Mutationen ermittelt sowie die daraus resultierenden zellulären Effekte untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α TM	F ⁻ , ϕ 80lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, λ -	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
XL1 blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F ['] , proAB, lacI Δ M15, Tn10 (Tet)]	Stratagene (La Jolla, USA)

2.1.2 Zelllinien

HeLa:

Humane Zervixkarzinom-Zelllinie, ATCC-Nr. CCL-2, 1952 etabliert (Gey *et al.* 1952), epithelartige Zellen, adhärenent als Monolayer wachsend

HEK 293:

Humane embryonale Nieren-Zelllinie, transformiert mit Adenovirus Typ 5 DNA, ATCC-Nr. CRL-1573, 1977 etabliert (Graham *et al.* 1977), epithelartige Zellen, adhärenent als Monolayer wachsend

COS-7:

Immortalisierte Fibroblasten-Zellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze (green african monkey), isoliert aus dem Gewebe der Niere, ATCC-Nr. CRL-1651, 1981 etabliert (Gluzman 1981), adhärenent als Monolayer wachsend

N2a:

Murine Neuroblasten-Zelllinie, isoliert aus einem Neuroblastom, ATCC-Nr. CCL-131, 1969 etabliert (Klebe & Ruddle 1969), adhärenent als Monolayer wachsend

***STHdh⁺/Hdh⁺*:**

Immortalisierte striatale Progenitorzellen der Maus, exprimieren normales endogenes Huntingtin mit 7 Glutaminen (Wildtyp), isoliert aus Wildtyp-Mausembryonen und anschließende neuronale Differenzierung, 2000 etabliert (Trettel *et al.* 2000), von Prof. Marcy MacDonald zur Verfügung gestellt, adhärenent als Monolayer wachsend

***STHdh^{Q111}/Hdh^{Q111}*:**

Immortalisierte striatale Progenitorzellen der Maus, exprimieren mutiertes Huntingtin mit 111 Glutaminen, isoliert aus homozygoten *Hdh^{Q111/Q111}* Knock-in-Mausembryonen und anschließende neuronale Differenzierung, 2000 etabliert (Trettel *et al.* 2000), von Prof. Marcy MacDonald zur Verfügung gestellt, adhärenent als Monolayer wachsend

2.1.3 Medien**2.1.3.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*-Zellen**

LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pH 7,0 ad 1 l Aqua bidest. 15 min bei 121 °C autoklavieren
LB _{amp} -Medium	1 l LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin
LB _{amp} -Agar	40 g LB-Agar ad 1 l Aqua bidest. 15 min bei 121 °C autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin

2.1.3.2 Medien für die Zellkultur

HEK 293-, COS-7-, HeLa-, N2a-Zellen	DMEM mit hohem Glucoseanteil (4,5 µg/µl) und stabilem L-Glutamin, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
STHdh ⁺ /Hdh ⁻ -, STHdh ^{Q111} /Hdh ^{Q111} - Zellen	DMEM mit hohem Glucoseanteil (4,5 µg/µl) und stabilem L-Glutamin, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin), 400 µg/ml G418

2.1.4 Puffer und Lösungen

TFB I	30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl ₂ , 100 mM KCl, 10 mM CaCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin
TFB II	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerin
Lösung 1	0,9 g Glucose, 2,5 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0), 2 ml 0,5 M EDTA ad 100 ml Aqua bidest.
Lösung 2	250 µl 20 % SDS, 500 µl 2 M NaOH ad 5 ml Aqua bidest.
Lösung 3	60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Essigsäure ad 100 ml Aqua bidest.
50x TAE-Puffer	242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l Aqua bidest.
6x Gelladepuffer	0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA Aqua bidest.
Ethidiumbromid-SL	10 mg Ethidiumbromid ad 1 ml Aqua bidest.
10x PBS	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, 20 mM KH ₂ PO ₄ , auf pH 7,4 einstellen ad 1 l Aqua bidest.

BSA/FCS in PBS	1 % (w/v) BSA, 2 % (v/v) FCS in 1x PBS
DAPI-SL	10 mg DAPI ad 1 ml Aqua bidest.
Eindeckmedium	Lösung A: 4,8 g Mowiol 4-88, 12 g Glycerin, 12 ml Aqua bidest., 24 ml 0.2 M Tris/HCl (pH 8,5) Lösung B: 10 mg <i>p</i> -Phenylenediamin, ad 1 ml Aqua bidest. Lösung C: 9x Lösung A und 1x Lösung B vereinigen
Lysispuffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail ad 50 ml Aqua bidest.
BSA-SL	1 mg BSA ad 1 ml Aqua bidest.
6x SDS-Ladepuffer	1,95 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,9 g SDS, 1,5 ml β -Mercapto- ethanol, 3 ml Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau ad 5 ml Aqua bidest.
2x Harnstoff-SDS- Ladepuffer	0,65 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,3 g SDS, 0,5 ml β -Mercapto- ethanol, ad 5 ml 8 M Harnstoff-Lösung 3 ml Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
10x SDS-Laufpuffer	30,3 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS ad 1 l Aqua bidest.
Coomassie-Färbelösung	450 ml Methanol p.a., 63 ml Essigsäure, 27 ml 1 % Coomassie brilliant blue R250 in 50 % (v/v) Methanol ad 1 l Aqua bidest.
Entfärbelösung	50 ml Methanol p.a., 34 ml Essigsäure, ad 1 l Aqua bidest.
Anodenpuffer I	25 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, auf pH 10,4 einstellen
Anodenpuffer II	300 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, auf pH 10,4 einstellen
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, 6-Aminohexan-Säure, auf pH 9,4 einstellen
Ponceau S-Lösung	2,5 g Ponceau-S, 400 ml Methanol p.a., 75 ml Essigsäure ad 1 l Aqua bidest.

1x PBST	1x PBS mit 0,2 % Tween [®] 20
---------	--

2.1.4.1 Trenngel und Sammelgel für die SDS-PAGE

	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (15 %)	Sammelgel (4 %)
Aqua bidest.	4,0 ml	3,3 ml	2,3 ml	3,0 ml
30 % Acrylamid 1:29	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml	0,66 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	-	-	1,26 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,025 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml	0,005 ml

2.1.4.2 Trenngel und Sammelgel für die SDS-Harnstoff-PAGE

	Trenngel (12 %)	Sammelgel (4 %)
Aqua bidest.	-	0,75 ml
30 % Acrylamid 1:29	4 ml	0,6 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	1,25 ml
8 M Harnstoff-Lösung	3,5 ml	2,4 ml
10 % APS	0,019 ml	0,015 ml
TEMED	0,019 ml	0,015 ml

2.1.5 Nukleinsäuren

2.1.5.1 Vektoren

Vektor	Verwendung / Merkmale	Herkunft
pBluescript® II KS (+)	Klonierungsvektor, MCS, Amp ^R , T7-Promotor	Stratagene (La Jolla, USA)
pRC/CMV	Expressionsvektor, MCS, Amp ^R , Neo ^R , CMV-Promotor	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
pcDNA3	Expressionsvektor, MCS, Amp ^R , Neo ^R , CMV-Promotor	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

2.1.5.2 Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese

Name	Sequenz
Δ93-116 forw	5' cgctgcaccgaccaaagaaatctgtcagaaattctccag 3'
Δ93-116 rev	5' ctggagaatttctgacagatttcttggctcggcagcg 3'
Δ116-125 forw	5' catagtggcacagcttctgggcatcgctatg 3'
Δ116-125 rev	5' catagcgatgccagaagctgtgccactatg 3'
Δ105-114 forw	5' gaccgtgtgaatcatcagctgtcagaaattctc 3'
Δ105-114 rev	5' gagaatttctgacagactgatgattcacacggtc 3'
Δ121-122 forw	5' gtctgtcagaaattctttcagaaacttctg 3'
Δ121-122 rev	5' cagaagtttctgaaaagaatttctgacagac 3'
Δ123-124 forw	5' cagaaattctccagaaaaacttctgggcatcg 3'
Δ123-124 rev	5' cgatgccagaagtttctggagaatttctg 3'
Δ125-126 forw	5' ctccagaatttcagctgggcatcgctatgg 3'

Δ125-126 rev	5' ccatagcgatgccagctgaaattctggag 3'
Δ127-128 forw	5' cagaatttcagaaacttatcgctatggaac 3'
Δ127-128 rev	5' gttccatagcgataagtttctgaaattctg 3'
Δ129-130 forw	5' cagaaacttctgggcatggaacttttctg 3'
Δ129-130 rev	5' cagaaaaagttccatgccagaagtttctg 3'
AA120-121 forw	5' gtctgtcagaaatgcagcagaatttcagaaac 3'
AA120-121 rev	5' gtttctgaaattctgctgcatttctgacagac 3'
AA122-123 forw	5' cagaaattctccagcagcacagaaacttctg 3'
AA122-123 rev	5' cagaagtttctgtgctgctggagaatttctg 3'
AA124-125 forw	5' ctccagaatttcagcacttctgggcatcg 3'
AA124-125 rev	5' cgatgcccagaagtgtgcaaattctggag 3'
AA126-127 forw	5' gaatttcagaaagcagcagcagcatcgctatg 3'
AA126-127 rev	5' catagcgatgctgtgcttctgaaattc 3'
AA128-129 forw	5' cagaaacttctggcagcagctatggaacttttc 3'
AA128-129 rev	5' gaaaaagttccatagctgctgccagaagtttctg 3'
117-stop forw	5' catagtggcacagtctgtctagaatttccagaatttcag 3'
117-stop rev	5' ctgaaattctggagaattctagacagactgtgccactatg 3'
118-stop forw	5' gtggcacagtctgtcagatagtctccagaatttcagaaac 3'
118-stop rev	5' gtttctgaaattctggagactatctgacagactgtgccac 3'
119-stop forw	5' gcacagtctgtcagaaattagccagaatttcagaaacttc 3'
119-stop rev	5' gaagtttctgaaattctggctaatttctgacagactgtgc 3'
120-stop forw	5' ctgtcagaaattcttaggaatttcagaaacttctgggc 3'
120-stop rev	5' gcccagaagtttctgaaattcctaagaatttctgacag 3'
121-stop forw	5' cagtctgtcagaaattctccatagtttcagaaacttctgggcatc 3'
121-stop rev	5' gatgcccagaagtttctgaaactatggagaatttctgacagactg 3'
122-stop forw	5' gtcagaaattctccagaatagcagaaacttctgggcatcg 3'
122-stop rev	5' cgatgcccagaagtttctgctatttctggagaatttctgac 3'

123-stop forw	5' cagaaattctccagaatttagaaacttctgggcatcgc 3'
123-stop rev	5' gcgatgcccaagaagtttctaaaattctggagaatttctg 3'

2.1.5.3 Oligonukleotide für die PCR mit anschließender Klonierung

Name	Sequenz mit integrierter Restriktionsschnittstelle
180-p3x forw	5' ctc <u>ggatcc</u> cactagtaacgg 3' <i>BamHI</i>
115-stop rev	5' cgc <u>ggatcc</u> tactgtgccactatgtttcaca 3' <i>BamHI</i>
120-stop rev	5' cggg <u>atcc</u> tcaagaatttctgacagactgtg 3' <i>BamHI</i>
18-171-p3x forw	5' cgatagatctgatatc <u>gtaccg</u> 3' <i>KpnI</i>
Myc rev	5' gct <u>ctagac</u> agatcctcttctgagatgagttttgttcctcgagctgtaacctgg 3' <i>XbaI</i>

2.1.5.4 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Name	Sequenz
T7-Promotor	5' taatacgaactcactataggg 3'
902 reverse	5' tgagccagctcagcaaa 3'

2.1.6 Primäre und sekundäre Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Name	Herkunft
Mouse Anti-Polyglutamine (1C2) (MAB1574)	Millipore (Schwalbach)
Mouse Anti-htt 115-129 (MAB5490)	Millipore (Schwalbach)
Mouse Anti-htt 1247-1646 (MAB2170)	Millipore (Schwalbach)

Rabbit Anti-htt 55-66	Zur Verfügung gestellt von G. Schilling
Rabbit Anti-htt 81-90	Zur Verfügung gestellt von G. Schilling
Goat Anti-htt N-18 (sc-8767)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Mouse Anti-c-Myc (sc-40)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Mouse Anti-Histones (MAB052)	Millipore (Schwalbach)
Mouse Anti- β -Tubulin (GTX11307)	GeneTex (San Antonio, USA)
Mouse Anti- β -Actin (sc-47778)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Mouse Anti-Cytochrome c	BioVision (Mountain View, USA)

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Name	Herkunft
ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Pierce (Rockford, USA)
ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Pierce (Rockford, USA)
ImmunoPure Peroxidase Conjugated Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)	Pierce (Rockford, USA)
Alexa Fluor® 680 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Alexa Fluor® 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Alexa Fluor® 594 Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

2.1.7 Spezielle Reagenzien, Komplett-Systeme (Kits), Marker und Enzyme

Wizard [®] Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega GmbH (Mannheim)
PureYield [™] Plasmid Midiprep System	Promega GmbH (Mannheim)
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH (Mannheim)
Caspase-Glo [®] 3/7 Assay	Promega GmbH (Mannheim)
Proteasome-Glo [™] Cymotrypsin-Like Cell-Based Assay	Promega GmbH (Mannheim)
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
TNT [®] T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega GmbH (Mannheim)
QuikChange [®] II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (La Jolla, USA)
Fast-Link [™] DNA Ligation Kit	Epicentre Biotechnologies (Madison, USA)
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
PageRuler [™] Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
<i>Bam</i> HI	Jena Bioscience GmbH (Jena)
<i>Xba</i> I	Jena Bioscience GmbH (Jena)
<i>Kpn</i> I	Jena Bioscience GmbH (Jena)
CIP (Calf Intestinal Phosphatase)	New England BioLabs GmbH (Frankfurt)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
NE-PER [™] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Pierce (Rockford, USA)
ECL Western Blotting Substrate	Pierce (Rockford, USA)
50x Complete (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Lipofectamine [™] 2000	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Cytochrome c Releasing Apoptosis Assay	BioVision (Mountain View, USA)

2.1.8 Chemikalien

Acrylamid-Lösung (30 %)-Mix 29:1	AppliChem GmbH (Darmstadt)
ALLN	MERCK KGaA (Darmstadt)
Agarose	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
APS	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ameisensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
6-Aminohexan-Säure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Bromphenolblau Natriumsalz	MERCK KGaA (Darmstadt)
BSA	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Calciumchlorid	MERCK KGaA (Darmstadt)
Coomassie brilliant blue R250	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
DAPI	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
DMEM	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ethanol	MERCK KGaA (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
FCS	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
G418	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Harnstoff	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

Kaliumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
LB-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Manganchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Methanol	MERCK KGaA (Darmstadt)
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
MOPS	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Mowiol 4-88	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH (München)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Optimem	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
<i>p</i> -Phenylenediamin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH (München)
Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
SDS	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH (München)
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH (München)

Trypsin/EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Tween [®] 20	MERCK KGaA (Darmstadt)

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Zellkultur-Platten 10 cm Ø	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel GmbH (Braunschweig)
runde Deckgläser 12 mm Ø	Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen)
6 Well Zellkultur-Platten	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Einmal-Küvetten aus PMMA (d = 1 cm)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Filme FUJI Medical X-ray film Super RX	A. Hartenstein GmbH (Würzburg)
Whatman Nitrocellulose-Membran (0,45 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Whatman Membranfilter, CA (0,2 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
96 Well Polystyrol Mikroplatten, weiss	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)

2.1.10 Geräte

Bakterienschüttler Multitron HT	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Elektrophorese-Netzgerät PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Lichtmikroskop Leica DM IL Bio	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
Steri-Cult CO ₂ Inkubator HEPA CLASS 100	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg)
Steril-Werkbank EN 12469 Clean Air	VWR International GmbH (Darmstadt)

Vortex-Genie 2	Scientific-Industries (Bohemia, USA)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 ApoTome	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena)
PCR Mastercycler epgradient S	Eppendorf AG (Hamburg)
Concentrator 5301	Eppendorf AG (Hamburg)
Bakterienbrutschrank BD 115	Binder GmbH (Tuttlingen)
Photometer Biomate3	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Geldokumentationsanlage GENE FLASH	Syngene Bio Imaging (Cambridge, UK)
Multilabel-Reader Mitras LB940	Berthold Technologies GmbH (Bad Wildbad)
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Bioscience GmbH (Bad Homburg)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg)
Magnetrührer big-squid	IKA Werke GmbH (Stauffen)
pH-Meter Seven Easy	Mettler-Toledo GmbH (Im Langacher, Schweiz)
Wasserbad GFL 1083	Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen)
Mikrowelle	Robert Bosch GmbH (Stuttgart)
Scanner CanoScan Lide 90	Canon Deutschland GmbH (Krefeld)
Schüttler UNIMAX 2010	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach)
Stabsonifikator UW/HD 2070	Bandelin electronic GmbH (Berlin)
Analysenwaage handy H110	Sartorius AG (Göttingen)
Präzisionswaage Acculab ALC-3100.2	Sartorius AG (Göttingen)
Homogenisator Dounce 15 ml	Wheaton Science Products (Millville,USA)

Dot-Blot-System Minifold-1 Whatman	Schleicher & Schuell (Dassel)
Thermodrucker UP-860 CE	Sony Deutschland GmbH (Berlin)
Kühlkombination NoFrost Premium	Liebherr GmbH (Ochsenhausen)
Tiefkühlschrank (-80°C) Thermo VXE490	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Entwicklermaschine CLASSIC E.O.S.	Agfa HealthCare GmbH (Berlin)
Semi-Dry-Elektroblotter PerfectBlue Sedec M	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Vertikale Elektrophoresekammer Mini-Protean 3	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Horizontale Elektrophoresekammer Midi 1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Autoradiographie-Röntgenkassette (18 x 24 cm)	G. Kisker GbR (Steinfurt)
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ²)	Paul Marienfeld GmbH + Co. KG (Lauda-Königshofen)

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli*-Zellen

E. coli wurde in flüssigem LB-Medium bei 37 °C auf einem Bakterienschüttler (180 Upm) kultiviert. Klone, die mit einem Plasmid eine Ampicillin-Resistenz erworben hatten, wurden in Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin selektiert. Kulturen auf LB-Agar wurden im Brutschrank bei 37 °C angezogen. Für die dauerhafte Konservierung von *E. coli* wurden Glycerinkulturen angelegt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen nach Hanahan *et al.* 1983

Für die Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit Zellmaterial aus einer Glycerinkultur des entsprechenden Stammes beimpft und über Nacht unter Standardbedingungen (37 °C, 180 Upm) kultiviert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 100 ml Hauptkultur überimpft, mit 1 ml 1 M KCl sowie 2 ml 1 M MgSO₄ versetzt und bei 37 °C für 2 Stunden geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden je 50 ml Kultur durch Zentrifugation (5 min, 4 °C, 2500 g) pelletiert, vorsichtig in 15 ml eiskaltem TFB I resuspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Die durch erneute Zentrifugation (10 min, 4 °C, 1000 g) gewonnenen Zellpellets wurden in je 2 ml TFB II resuspendiert und anschließend in vorgekühlte Reaktionsgefäße zu je 200 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Für eine Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz wurde 30 min unter gelegentlichem Mischen auf Eis inkubiert und danach einem Hitzeschock (45 sek, 42 °C) ausgesetzt. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit je 1 ml LB-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C temperiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 4 °C, 700 g) und die Aufnahme des Zellpellets in 100 µl LB-Medium. Die Zellsuspension wurde auf Agarplatten mit Selektionsmedium (LB_{amp}-Platten) ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht angezogen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurden das Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System beziehungsweise das PureYield[™] Plasmid Midiprep System nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen nach Birnboim & Doly 1979

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch alkalische Lyse erfolgte nach einer veränderten Methode von Birnboim & Doly, 1979. In der nachfolgenden Beschreibung sind die Volumina der verwendeten Lösungen und Inkubationszeiten für die DNA-Minipräparationen aufgeführt.

Für die Plasmidgewinnung wurde eine 5 ml LB_{amp}-Übernachtskultur mit dem entsprechenden Bakterienstamm angeimpft und bei 37 °C/180 Upm inkubiert. Aus der Übernachtskultur wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 2500 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 erfolgte, während einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken, die Lyse der Zellen. Proteine, chromosomale DNA und Lipide wurden durch Zugabe von 150 µl Lösung 3 und 5-minütiger Inkubation bei -20 °C ausgefällt. Nach einer Zentrifugation (5 min, 4 °C, 18000 g) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, mit 500 µl Isopropanol gemischt und bei -20 °C für 10 min inkubiert. Das auf diese Weise gefällte Nukleinsäuregemisch konnte nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 18000g pelletiert und in 200 µl 70 % Ethanol gewaschen werden. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 4 °C, 18000 g) wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch unter Verwendung des Spektrophotometers NanoDrop™ 1000 bestimmt. Dabei wurde jeweils 1,2 µl DNA auf die Messvorrichtung aufgetragen und die Konzentration (ng/µl) ermittelt.

2.2.2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach der PCR und DNA Gelelektrophorese

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder einem Verdau mittels Restriktionsendonukleasen wurde das Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System verwendet. Die DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in einem 1-2 % igem Agarosegel

aufgetrennt, ausgeschnitten, nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.2.5 DNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach DNA-Größe in 1-2 % igen Agarosegelen mit 1x TAE Elektrophoresepuffer bei 50-110 Volt. Den Agarosegelen wurde Ethidiumbromid (SL 10 mg/ml) in einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugegeben. Vor dem Auftragen auf das Agarosegel wurden die Proben mit einem 6-fachen Gelladepuffer im Verhältnis 1:5 gemischt. Als DNA-Längenstandard diente der 1 Kb Plus DNA Ladder von 100-12000 bp.

2.2.2.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Die in dieser Arbeit verwendeten Mutationen wurden mit Hilfe des QuikChange™ II Site Directed Mutagenesis Kits eingeführt. Dabei wurden die vom Hersteller beschriebenen Bedingungen eingehalten. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.1.5.2 aufgelistet. Die Selektion positiver Klone erfolgte durch DNA-Sequenzierung bei der Firma Eurofins MWG Operon.

2.2.2.7 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die selektive Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) verwendet. Die Reaktionen wurden jeweils im 50 µl-Ansatz unter Verwendung des Expand Long Template PCR Systems durchgeführt. Der Reaktionsansatz beinhaltet Aqua bidest. und die DNA-Matritze. Diesem wird nach dem zweiten Denaturierungsschritt ein PCR-Mix zugesetzt und die PCR-Reaktion fortgesetzt. Zur Optimierung der Ausbeute des PCR-Produktes kamen im Laufe der Arbeit verschiedene Protokolle und PCR-Programme zum Einsatz. Die nachfolgend aufgeführte Methode erwies sich als die günstigste.

Reaktionsansatz:

1 μ l	DNA-Matrize (50 ng/ μ l)
40,9 μ l	Aqua bidest.

PCR-Mix:

0,5 μ l	DMSO
0,4 μ l	Primer 1 (50 pmol/ μ l)
0,4 μ l	Primer 2 (50 pmol/ μ l)
1,5 μ l	dNTPs (10 mM)
5 μ l	10x Puffer 1
0,3 μ l	Expand Long Template enzyme mix

PCR-Programm:

Erst-Denaturierung	94 °C	5 min	1 Zyklus	
Denaturierung	94 °C	2 min		Zugabe von PCR-Mix
Primeranlagerung	55 °C	2 min	35 Zyklen	
Verlängerung	72 °C	2 min		
End-Verlängerung	72 °C	5 min	1 Zyklus	
Kühlen	4 °C			

Zur Amplifikation definierter DNA-Fragmente aus Plasmid-DNA mit Hilfe spezifischer Primerpaare wurde die Temperatur der Primeranlagerung jeweils angepasst. Die amplifizierten Produkte wurden mittels DNA-Gelelektrophorese analysiert und vor der weiteren Verwendung für Klonierungen aufgereinigt.

2.2.2.8 Restriktion von DNA

Zur Überprüfung isolierter DNA und zur Erzeugung kompatibler Enden für die Klonierung unterschiedlicher DNA-Fragmente in Vektoren mussten diese mit geeigneten Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Die DNA wurde mit 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme unter Zugabe von 2 μ l des dazugehörigen 10x Puffers gespalten. Die Inkubation erfolgte in 20 μ l-Ansätzen für 1-2 Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur (in der Regel 37 °C). Zur präparativen DNA-Restriktion wurde das Ansatzvolumen vergrößert und die Reaktionszeit auf 3 Stunden erhöht.

2.2.2.9 Dephosphorylierung des Vektors

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurde der Vektor vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) am 5'-Ende dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgte im Restriktionsansatz nach dem Verdau. Dazu wurde dem Restriktionsansatz 1 µl (1U) alkalische Phosphatase zugesetzt und 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

2.2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation überhängender beziehungsweise glatter DNA-Enden wurde das Insert im Verhältnis zum geschnittenen Vektor im 3-fachen molaren Überschuss eingesetzt. In einem Reaktionsvolumen von 15 µl erfolgte die Ligation mit der Fast-Link™ DNA Ligase und dem entsprechenden 10x Ligationspuffer für 5 min bei Raumtemperatur nach Angaben des Herstellers. Nach der Ligation folgte eine Hitzeinaktivierung (15 min, 70 °C) und der Ligationsansatz wurde in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Anschließend erfolgte eine Plasmid-Minipräparation mit dem dazugehörigen Kontrollverdau, um den Erfolg der Ligation zu kontrollieren.

2.2.2.11 Gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation

Mit Hilfe des TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems können Gen-Sequenzen, die in einem Plasmid, das über einen T7-Promotor verfügt, vorliegen, *in vitro* transkribiert und translatiert werden. Die Markierung des Proteins erfolgt dabei über den Einbau von [³⁵S]-Methionin. Für die Reaktion wurde 1 µg linearisierte Plasmid-DNA und 2 µl [³⁵S]-Methionin (1000 Ci/mmol) zu 40 µl TNT® T7 Quick Master Mix hinzugefügt und mit Nuklease-freiem Aqua bidest. auf 50 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 90 min bei 30 °C inkubiert, mit 2-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellkulturen erfolgte mit dem entsprechenden Medium im CO₂-begasteten Feuchtbrutschrank mit einem CO₂-Gehalt von 5 %, einer Temperatur von 37 °C (HEK 293, COS-7, HeLa, N2a) beziehungsweise 33 °C (STHdh⁺/Hdh⁺, STHdh^{Q111}/Hdh^{Q111}) und einer Luftfeuchte von 90 %. Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.3.2 Passagieren von Säugetierzellen

Einer 100 % konfluenten Kultur wurde das Medium abgezogen und diese mit 1x PBS-Lösung gewaschen. Die Zellschicht wurde anschließend mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung dünn benetzt. Nach 3 min Inkubation im Brutschrank wurden die abtrypsinieren Zellen in Medium suspendiert, im Verhältnis 1:3 gesplittet und in neue Zellkultur-Platten mit vorgewärmten Medium aufgenommen. Nach jedem Passagieren wurde den STHdh⁺/Hdh⁺- und STHdh^{Q111}/Hdh^{Q111}-Zellen zur Selektion G418, mit einer Endkonzentration von 400 µg/ml, zugeführt.

2.2.3.3 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion ist ein Verfahren zum Einschleusen von DNA in eukaryotische Zellen, wobei die in die Wirtszellen eingebrachten Gene nur vorübergehend exprimiert werden. Die extrachromosomale Plasmid-DNA wird nicht repliziert, sondern nur für einen limitierten Zeitraum exprimiert und geht im Verlauf der Zellteilung verloren. Für die Transfektion von Plasmiden wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 eingesetzt. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 6 Well Zellkultur-Platten oder in 10 cm Ø Zellkultur-Platten mit dem entsprechenden Medium ausgesät, damit die Zellen vollständig adhären konnten und zum Zeitpunkt der Transfektion 50 % beziehungsweise 95 %

konfluent waren (50 % Konfluenz für die anschließende Immunfluoreszenz-Mikroskopie). Für die Transfektion pro 6 Well wurden 12 µl Lipofectamine™ 2000 und 6 µg Plasmid-DNA und für die Transfektion pro 10 cm Ø Zellkultur-Platte wurden 70 µl Lipofectamine™ 2000 und 35 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Der Lipofectamine™ 2000-DNA-Komplex wurde den zu transfizierenden Zellen zugegeben. Nach 24 bis 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die transfizierten Zellen für anschließende Versuche verwendet.

2.2.3.4 Vorbereitung von Zellpräparaten für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden Proteine mit spezifischen primären Antikörpern erkannt. Sekundäre Antikörper, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, richten sich gegen primäre Antikörper.

COS-7-Zellen wurden in 6 Well Zellkultur-Platten auf sterilen runden Deckgläsern 24 Stunden vor der Transfektion ausgesät und wie unter Kapitel 2.2.3.3 beschrieben transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 37 °C warmer 1x PBS-Lösung gewaschen, mit eiskaltem Methanol p.a. fixiert und 20 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser dreimal mit 1x PBS-Lösung innerhalb von 10 min gewaschen und mit BSA/FCS in PBS-Lösung für 20 min blockiert. Die primären Antikörper wurden mit BSA/FCS in PBS-Lösung verdünnt und die Deckgläser für 45 min damit überschichtet und inkubiert. Folgend wurden die Deckgläser viermal mit 1x PBS-Lösung innerhalb von 10 min gewaschen und mit sekundären Antikörpern, welche ebenfalls mit BSA/FCS in PBS-Lösung verdünnt waren, für 45 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend viermal mit 1x PBS-Lösung innerhalb von 10 min gewaschen, die Zellkerne mit 1 µg/ml DAPI für 10 min gefärbt und anschließend wieder viermal mit 1x PBS-Lösung innerhalb von 10 min gewaschen. Die Deckgläser wurden mit der Zellschicht nach unten und 5 µl Eindeckmedium luftblasenfrei auf Objektträger aufgetragen.

2.2.3.5 Quantifizierung von Huntingtin-Aggregaten

Für die Quantifizierung von Aggregaten wurden COS-7-Zellen transfiziert (siehe Kapitel 2.2.3.3) und für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie vorbereitet (siehe Kapitel 2.2.3.4). Pro Deckglas wurden 200 Zellen untersucht. Zellen, die mindestens ein mikroskopisch sichtbares

Aggregat, auch intrazellulärer Einschlusskörper genannt, besitzen, wurden als positive Zellen gezählt. Ein intrazellulärer Einschlusskörper mit aggregierten Huntingtin-Proteinen konnte mit dem primären Anti-Huntingtin Antikörper htt 81-90 und dem dazugehörigen sekundären Antikörper detektiert werden. Die unterschiedlich transfizierten Zellen wurden unabhängig voneinander untersucht. Für die statistische Auswertung wurden drei unabhängige Versuche in je zweifacher Ausführung durchgeführt.

2.2.3.6 Inhibierung des Proteasoms mit ALLN

30 min vor der Transfektion von HEK 293-Zellen wurde der Proteasom-Inhibitor ALLN (N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO) der Firma Calbiochem zugegeben. ALLN ist ein Calpain 1/2- und Cathepsin L-Inhibitor, der auch das Proteasom reversibel hemmt. Zum Kulturmedium der zu transfizierenden Zellen wurde ALLN mit einer Endkonzentration von 80 μM beziehungsweise 200 μM in DMSO (0,2 %, 0,5 %) zugesetzt. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit DMSO (0,2 %, 0,5 %) behandelt. Nach der Inkubationsdauer von 24 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert.

Für den Nachweis, dass ALLN tatsächlich das Proteasom inhibiert, wurde der Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay durchgeführt. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Den kultivierten Zellen wurde das Medium abgezogen und diese mit eiskalter 1x PBS-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden in eiskalter 1x PBS-Lösung resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 4 °C, 700 g). Der Zellaufschluss erfolgte durch das Resuspendieren des Pellets in Lysispuffer und durch Sonifizieren. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 4 °C, 18000 g) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und die Proteinkonzentration des Lysats mit der Bradford Methode bestimmt.

Für die Proteinextraktion aus dem Gehirn von Mäusen wurden die Gehirne von 4-5 Monate alten HD-N171-82Q Linie 81-transgenen Mäusen (Schilling *et al.* 1999) und nicht-transgenen

Wildtyp-Mäusen präpariert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Extraktion der Proteine wurde das Gehirn gewogen und mit dem 10-fachen an Lysispuffer versetzt. Das Gehirn wurde auf Eis homogenisiert und sonifiziert. Das Homogenat wurde zentrifugiert (2 min, 4 °C, 18000 g), der Überstand abgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 Subzelluläre Fraktionierung

Um zytoplasmatische und nukleäre Proteine aus transfizierten HEK 293-Zellen getrennt voneinander zu isolieren, wurde der NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Solubilisierung von SDS-unlöslichen Huntingtin-Aggregaten aus dem Zellkern wurde dem Pellet der nukleären Fraktion 100 % Ameisensäure zugesetzt und 40 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch Vakuum eingetrocknet und das verbleibende Pellet in 10 µl 2-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer resuspendiert und mit 10 µl 1 M Tris (pH 10) neutralisiert.

Für eine zytoplasmatische und mitochondriale Fraktionierung von transfizierten HEK 293-Zellen wurde der Cytochrome c Releasing Apoptosis Assay Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Bei der Bradford-Methode verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G250 durch Bindung an Proteine von 465 nm zu 595 nm, wobei die Proteine bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden können. In dieser Arbeit wurde auf dieser Methode beruhend das Protein Assay Dye Reagent Concentrate nach Angaben des Herstellers benutzt. Der Proteingehalt einer Probe wurde mittels Erstellung einer Eichkurve mit BSA als Standard in 4 Konzentrationen von 1 µg/ml bis 20 µg/ml berechnet.

2.2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese trennt Proteine entsprechend ihrer Molekularmasse auf. Die Proteine binden im Überschuss zugesetztes SDS und erhalten somit eine negative Ladung, so dass sie der Größe nach aufgetrennt werden (Sambrook & Gething 1989). Bei der verwendeten Methode nach Laemmli (Laemmli 1970) wurden 10-15 % ige Gele verwendet, wobei das Mini-Protean-3-System der Firma Bio-Rad zum Einsatz kam. Die Proben wurden mit 6-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 100 °C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 Volt in 1-2 Stunden.

2.2.4.5 SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Harnstoff-PAGE)

Für eine vollständige Denaturierung der Proteine wurden Harnstoff-Gele verwendet, wobei die SDS-Harnstoff-PAGE ähnlich zur SDS-PAGE ist, außer dass das Sammelgel, das Trenngel und der Ladepuffer unterschiedlich zusammengesetzt sind und Harnstoff enthalten.

2.2.4.6 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die SDS-Gele mit den aufgetrennten Proteinen wurden nach der Elektrophorese mit dem Farbstoff Coomassie brilliant blue R250 angefärbt. Dies erfolgte durch Inkubation der Gele mit der Coomassie-Färbelösung für 10-30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln. Anschließend wurden die Gele, zum Sichtbarwerden der Proteinbanden, mittels Entfärbelösung entfärbt.

2.2.4.7 Western Blot Analyse

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE wurden diese zum immunologischen Nachweis auf eine Nitrocellulose-Membran mit Hilfe einer Semi-Dry-Blotapparatur übertragen. Im Semi-Dry-Blotting System wurden drei Lagen 3 MM Whatman Papier, in Anodenpuffer II getränkt, gefolgt von weiteren drei Lagen und der Nitrocellulose-Membran, in Anodenpuffer I getränkt, auf die Anode geschichtet. Nachdem das Gel und

3 weitere Lagen Whatman Papier, getränkt in Kathoden-Puffer, blasenfrei auf die Membran geschichtet und die Kathode aufgelegt wurde, konnte mit einer Stromstärke von 3 mA/cm^2 Filterfläche für 2 Stunden geblottet werden. Um den Erfolg des Proteintransfers auf die Nitrocellulose-Membran zu überprüfen, erfolgte eine 5-minütige Ponceau-S-Färbung. Durch anschließendes mehrmaliges Waschen mit Aqua bidest. waren die Proteinbanden sichtbar.

Um die zu analysierenden Proteine auf der Membran selektiv sichtbar zu machen, wurden spezifische primäre Antikörper eingesetzt. Zuerst wurden jedoch unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation der Membran mit 5 % Magermilchpulver in 1x PBS-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Es folgte die Inkubation des primären Antikörpers, verdünnt in 5 % Magermilchpulver in 1x PBS-Lösung, über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Membran wurde dreimal für 5 min in PBST gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper, der in 5% Magermilchpulver in 1x PBS-Lösung verdünnt war, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran nochmals dreimal für 5 min mit PBST gewaschen. Die Detektion der immunmarkierten Proteinbanden erfolgte mittels Chemolumineszenz (ECL Western Blotting Substrate). Die Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers gemischt und mit der Membran inkubiert. Der auf die Membran aufgelegte Röntgenfilm wurde, zum Sichtbarmachen der Proteinbanden, in der Entwicklermaschine CLASSIC E.O.S. entwickelt. Zusätzlich wurden Blots für die Proteinquantifizierung mit dem auf infrarot basierenden Odyssey Infrared Imaging System analysiert. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Auswertung der Intensitäten der einzelnen Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der Software des Odyssey Infrared Imaging Systems. Da die Intensitäten von den Proteinbanden der zu vergleichenden Spaltprodukte abhängig von der Expression der einzelnen Huntingtin-Proteine ist, erfolgte eine Normierung über die zugehörigen exprimierten Huntingtin-Proteine. Für die Quantifizierung wurden drei unabhängige Versuche in je dreifacher Ausführung durchgeführt.

2.2.4.8 Filter-Retardations-Assay

Zur Detektion von SDS-unlöslichen Huntingtin-Aggregaten wurde ein Filtertest durchgeführt. Auf einer Celluloseacetatmembran ($0,2 \text{ }\mu\text{m}$ Porengröße) werden SDS-unlösliche Aggregate zurückgehalten und SDS-lösliche Proteine des Zelllysats durch die Membran gefiltert. Die geernteten Zellen wurden in 1x PBS-Lösung mit Proteaseinhibitoren (1x Complete)

aufgenommen, für den Zellaufschluss sonifiziert und zentrifugiert (5 min, 4 °C, 18000 g). Der Überstand wurden mit einer Endkonzentration von 2 % SDS und 8 % β -Mercaptoethanol für 5 min auf 100 °C erhitzt. Ein MiniFold-1 Dot-Blot System wurde mit einem feuchten Filter und einer feuchten Membran luftblasenfrei belegt und dicht verschlossen. Je 200 μ l Zelllysate mit einer Proteinkonzentration von 200 μ g, 400 μ g beziehungsweise 600 μ g wurden pro Loch pipettiert und die Proben mittels Vakuum durch die Membran gesaugt. Im Anschluss wurde die Membran mit Aqua bidest. gewaschen und wie bei der Immundetektion eines Western Blots prozessiert.

2.2.5 Apoptose-Assay

Zur Bestimmung der Aktivitäten von Caspase 3 und 7 wurde der Caspase-Glo[®] 3/7 Assay verwendet. Dieser Assay beruht auf der Spaltung eines luminogenen Caspase 3/7 Substrats mit der Tetrapeptid-Sequenz DEVD. Durch die Spaltung dieses Substrats wird ein Lumineszenzsignal freigesetzt, welches mit Hilfe des Multilabel-Reader Mitras LB940 gemessen wurde. Die Lumineszenz verhält sich hierbei proportional zur Caspaseaktivität. Hierfür wurden HEK 293-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank 15000 Zellen in 100 μ l pro Well (96 Well Mikroplatte) pipettiert und mit demselben Volumen Caspase-Glo[®] 3/7 Reagenz gemischt. Nach 3 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lumineszenzsignal gemessen. Für die statistische Auswertung wurden 3 unabhängige Versuche in je dreifacher Ausführung durchgeführt.

2.2.6 Vitalitätsbestimmung

Zur Vitalitätsbestimmung von Zellen diente die Trypanblau-Methode. Die Vitalität von N2a-Zellen wurde mit Hilfe der Trypanblau-Färbung ermittelt, wobei vitale Zellen nicht durch den Farbstoff blau angefärbt werden können. 48 Stunden nach der Transfektion wurden 40 μ l Zellsuspension mit 40 μ l Trypanblau-Lösung gemischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 10 μ l des Gemischs in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Anzahl der lebenden und toten Zellen in 3 großen Quadraten ermittelt. Für die statistische Auswertung wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt.

2.2.7 Statistische Analysen

Die Daten aus den Apoptose-Assays, aus der Zellvitalitätsbestimmung und aus den Aggregationsstudien wurden mittels Student's-*t*-Test auf Signifikanz geprüft. Die verschiedenen Signifikanzniveaus wurden wie folgt gekennzeichnet: Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner 5% = $p < 0,05$ (signifikant) und Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner 1% = $p < 0,01$ (hochsignifikant). Die graphische Darstellung erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM; Standard error of the mean). Als Programm zur Berechnung der Statistik und zur graphischen Darstellung der Daten wurde Excel 2004 und CorelDraw X3 benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der N-terminalen proteolytischen Prozessierung verschiedener Huntingtin-Fragmente im Zellkultur-Modell

3.1.1 Herstellung von N-terminalen Huntingtin-Konstrukten

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der N-terminalen proteolytischen Spaltung des Proteins Huntingtin und die daraus folgende Fragmentierung in Bezug auf die Pathogenese von Chorea Huntington. Für die Etablierung eines Zell-basierten Systems zur Analyse der Expression von N-terminalen Huntingtin und der anschließenden proteolytischen Prozessierung wurden unterschiedlich lange N-terminale *huntingtin*-cDNA-Sequenzen in Expressionsvektoren integriert. Die hierfür eingesetzten Expressionsvektoren waren pRC/CMV und pcDNA3. Für die Analyse der proteolytischen Spaltung wurden N-terminale Fragmente von Huntingtin verwendet, da diese eine deutlich höhere Proteinexpression gegenüber dem Vollängenprotein aufweisen und somit besser immunologisch nachweisbar sind. N-terminale *huntingtin*-cDNA, kodierend für die ersten 171 oder 233 Aminosäuren, mit nicht-pathogenen 18 Glutaminen (18Q) und pathogenen 82 Glutaminen (82Q) wurde in die multiple Klonierungsstelle (MCS) der Expressionsvektoren integriert. Um zu überprüfen, ob es sich um eine N-terminale Proteolyse handelt, wurde der *huntingtin*-cDNA, kodierend für die ersten 171 Aminosäuren mit 18 Glutaminen, eine C-terminale *myc*-Epitop-Sequenz mittels PCR angefügt. Diese Sequenz wurde ebenfalls in einen Expressionsvektor integriert. Durch DNA-Sequenzierung konnten die erfolgreichen Klonierungen bestätigt werden. Abbildung 6A zeigt ein Schema der exprimierten N-terminalen Huntingtin Proteine. Die Proteine werden als Htt N233 und Htt N171 bezeichnet, wobei „Htt“ für Huntingtin und das „N“ für die Anzahl der ersten N-terminalen Aminosäuren von Huntingtin steht.

3.1.2 Nachweis eines N-terminalen Huntingtin-Spaltprodukts im Zellkultur-Modell

N-terminale Huntingtin-Proteine mit 171 beziehungsweise 233 Aminosäuren und 18 oder 82 Glutaminen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, in HEK 293-Zellen

exprimiert, 48 Stunden nach der Transfektion lysiert und mittels Western Blot analysiert. Zur immunologischen Detektion von Huntingtin wurde der Peptid-spezifische Antikörper htt 81-90 eingesetzt, welcher das N-terminale Huntingtin-Epitop von Aminosäure 81 bis 90 erkennt. Endogen exprimiertes Huntingtin-Volllängenprotein konnte in diesem Zellsystem nicht detektiert werden, da es vergleichsweise in sehr geringen Mengen exprimiert wird.

Nach der Transfektion von *htt* N171-18Q und *htt* N233-18Q konnte jeweils das exprimierte Huntingtin-Protein im Western Blot detektiert werden, wobei zu erwähnen ist, dass Huntingtin durch seinen Polyglutamin-Abschnitt nicht mit der errechneten Molekularmasse im SDS-Gel läuft, sondern etwas höher (Abb. 6B). Zusätzlich zu den beiden Protein-Hauptbanden erschien in beiden Spuren jeweils eine kleinere Proteinbande von circa 18 kDa (Pfeil). Des Weiteren wurden die Proteine Htt N171-82Q und Htt N233-82Q exprimiert. Hier konnten mit dem N-terminalen Huntingtin-Antikörper neben den Protein-Hauptbanden kleinere Huntingtin-Proteine auf gleicher Höhe (circa 38 kDa) detektiert werden (Abb. 6C, Pfeil).

Nach der Expression von Huntingtin-Proteinen mit unterschiedlicher N-terminaler Proteinlänge und equivalentem Polyglutamin-Abschnitt wurde zusätzlich zu den Huntingtin-Hauptproteinen jeweils ein kleineres Huntingtin-Fragment mit identischer Molekularmasse detektiert. Dieses Huntingtin-Fragment wurde unabhängig von der Länge des Polyglutamin-Abschnitts generiert (Abb. 6B und C, Pfeile). Interessanterweise ist die Spaltung von Htt N233-82Q viel effizienter im Vergleich zu der Spaltung anderer Huntingtin-Proteine (Abb. 6C). Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Experimenten für die Analyse des zellulären Effekts von Huntingtin mit einem pathogenen Polyglutamin-Abschnitt das Protein Htt N233-82Q eingesetzt.

Dass es sich hierbei um ein N-terminales Fragment handelt und proteolytische Spaltung nach dem Epitop Aminosäure 81-90 stattfindet, konnte mittels C-terminalen *myc*-Epitop nachgewiesen werden. Abbildung 6D zeigt einen Western Blot von HEK 293-Zelllysat 48 Stunden nach der Transfektion mit *htt* N171-18Q-*myc*. Der Antikörper htt 81-90 detektierte die Protein-Hauptbande von Htt N171-18Q-*myc* mit einer Größe von circa 30 kDa und zusätzlich ein 10 kDa kleineres Fragment. Der Antikörper Anti-c-Myc detektierte nur die Protein-Hauptbande von 30 kDa und nicht die kleinere Huntingtin-Proteinbande, was darauf schließen lässt, dass das 10 kDa kleinere Fragment ein N-terminales Spaltprodukt ist, welches das Epitop Aminosäure 81-90, aber nicht mehr das C-terminalen *myc*-Epitop besitzt. Ein kleineres C-terminales Spaltprodukt konnte nicht nachgewiesen werden, da dieses möglicherweise sehr schnell in der Zelle abgebaut wurde.

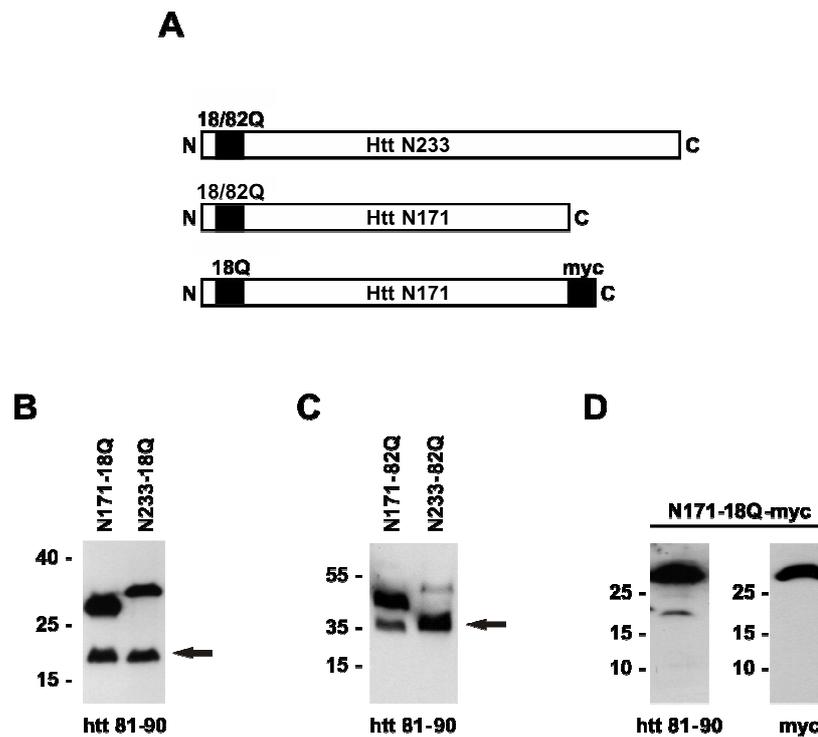


Abbildung 6: N-terminale proteolytische Prozessierung von Huntingtin. **A)** Schema der exprimierten Huntingtin-Proteine mit 171 beziehungsweise 233 Aminosäuren. Immunologischer Nachweis eines Huntingtin-Spaltprodukts mit **B)** 18 Glutaminen und **C)** 82 Glutaminen im Western Blot mit dem Antikörper htt 81-90 (Pfeile). Die Generierung des Fragments ist unabhängig von der Huntingtin-Proteinlänge und der Länge des Polyglutamin-Abschnitts. **D)** Nachweis von N-terminaler Huntingtin-Spaltung mittels Antikörper gegen den N-terminalen Bereich (htt 81-90) und C-terminalen Bereich (Anti-c-Myc).

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass diese proteolytische Prozessierung spezifisch für HEK 293-Zellen ist, wurden neben HEK 293-Zellen auch HeLa-Zellen, COS-7-Zellen, striatale *STHdh⁺/Hdh⁺*-Zellen und N2a-Zellen mit dem Konstrukt *htt* N233-82Q transfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert. Der immunologische Nachweis mit dem Antikörpern 1C2 (Abb. 7A), welcher den expandierten Polyglutamin-Abschnitt erkennt, und htt 81-90 (Abb. 7B) zeigte bei den verwendeten Zelllinien neben dem Hauptprodukt ein identisches 10 kDa kleineres Fragment (Pfeile).

Diese Daten geben einen Hinweis, dass proteolytische Spaltung in einer spezifischen N-terminalen Region von Huntingtin erfolgt und dass diese N-terminalen Fragmente durch identische Proteasen in unterschiedlichen Zelltypen generiert werden. Da das Huntingtin-Spaltmuster in allen getesteten Zelllinien identisch ist und es keinen Unterschied zwischen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen gibt, wurden für die weiteren Experimente HEK 293-Zellen (Western Blot) und COS-7-Zellen (Immunfluoreszenz) verwendet.

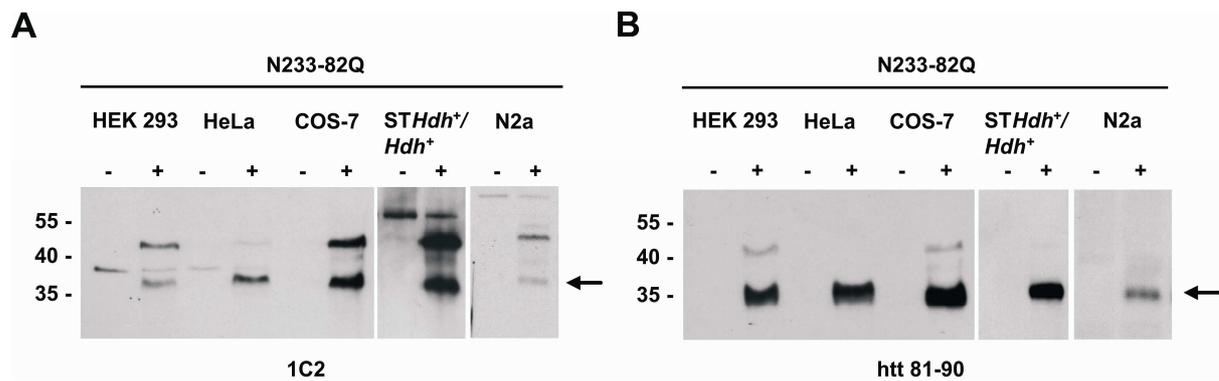


Abbildung 7: Generierung des N-terminalen Huntingtin-Spaltprodukts in verschiedenen Zelllinien. Expression von Htt N233-82Q in HEK 293-, HeLa-, COS-7-, *STHdh⁺/Hdh⁺*- und N2a-Zellen. Western Blot Analyse mit dem Antikörper **A**) 1C2 und **B**) htt 81-90 zeigt zusätzlich zum Hauptprodukt das N-terminale Spaltprodukt (Pfeile). + transfizierte Zellen; - untransfizierte Zellen.

Um ausschließen zu können, dass mehr als eine Form des Huntingtin-Proteins exprimiert wird oder Huntingtin durch SDS nicht vollständig denaturiert und mit zwei unterschiedlichen Strukturen im SDS-Gel läuft, wurden weitere Experimente durchgeführt. Einerseits wurde die verwendete *huntingtin*-cDNA in pRC/CMV, kodierend für *htt* N233-82Q, mit Hilfe des TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems *in vitro* transkribiert und translatiert. Die Markierung der *in vitro*-translatierten Huntingtin-Proteine durch den Einbau von [³⁵S]-Methionin konnte mittels Autoradiographie analysiert werden. Auf dem Röntgenfilm wurde nur eine Proteinbande als Signal detektiert, wobei das markierte Protein im SDS-Gel mit derselben Molekularmasse wie das in HEK 293-Zellen exprimierte und ungeschnittene Htt N233-82Q lief (Abb. 8A). Htt N233-82Q aus transfizierten HEK 293-Zellen wurde mit dem Antikörper 1C2 nachgewiesen.

Um mögliche nicht vollständig denaturierte Huntingtin-Strukturen zu identifizieren, wurde andererseits eine SDS-Harnstoff-PAGE durchgeführt. Es wurde postuliert, dass Harnstoff und SDS zusammen Polypeptide besser denaturieren können (Lacks *et al.* 1979). Wie in Abbildung 8B zu erkennen ist, wurden nach Zugabe von Harnstoff in der SDS-PAGE ebenfalls zwei Huntingtin-Proteinbanden nach Expression von Htt N233-82Q in HEK 293-Zellen mit dem Antikörper htt 81-90 nachgewiesen. Eine Konzentrationserhöhung von β -Mercaptoethanol im SDS-Ladepuffer oder Zugabe von hohen DTT-Konzentrationen zum SDS-Ladepuffer zur Reduktion von Disulfidbrückenbindungen zeigte ebenfalls keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Es konnte gezeigt werden, dass in dem hier etablierten Zellsystem ein N-terminales Huntingtin-Fragment durch Proteolyse generiert wird, welches in weiteren Experimenten analysiert werden sollte.

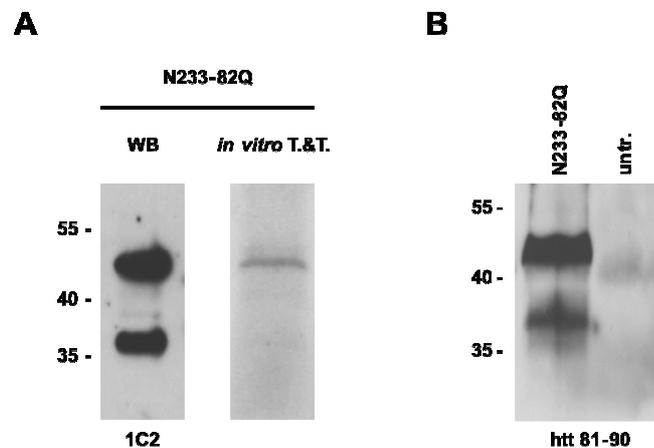


Abbildung 8: Nachweis für posttranslationale Proteolyse. **A)** Mittels *in vitro* Transkription und Translation von Htt N233-82Q konnte ein Expressionsprodukt mit derselben Molekularmasse wie das Hauptprodukt von Htt N233-82Q in transfizierten HEK 293-Zellen identifiziert werden. Proteinbanden wurden mit dem Antikörper 1C2 detektiert. **B)** Nach totaler Denaturierung von Htt N233-82Q in der SDS-Harnstoff-PAGE zur Auflösung von möglichen Huntingtin-Strukturen detektierte der Antikörper htt 81-90 zwei Huntingtin-Proteine. Untr. = untransfizierte HEK 293-Zellen.

3.1.3 Analyse des N-terminalen Spaltprodukts von Huntingtin induziert proteolytische Prozessierung um Aminosäure 120

3.1.3.1 Nachweis N-terminaler Huntingtin-Sequenzen mittels Epitop-spezifischer Antikörper

Wie zuvor in Kapitel 3.1.2 beschrieben, findet eine proteolytische Spaltung im N-terminalen Bereich von Huntingtin statt, was zur Generierung eines kleineren N-terminalen Fragments führt. Um die Region in Huntingtin, welche der N-terminalen Proteolyse zugänglich ist, enger eingrenzen zu können, wurden sequentielle N-terminale Huntingtin Epitop-spezifische Antikörper zum immunologischen Nachweis des N-terminalen Spaltprodukts verwendet (Abb. 9). Dazu wurden HEK 293-Zellen mit *htt* N233-82Q transfiziert, nach 48 Stunden lysiert und der gewonnene Zellextrakt in der SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot detektierten die sequentiellen N-terminalen Antikörper N18 (erkennt Aminosäure 1-17), 1C2 (erkennt expandiertes Polyglutamin), htt 55-66 (erkennt Aminosäure 55-66) und htt 81-90

(erkennt Aminosäure 81-90) beide Huntingtin-Proteinbanden: das ungespaltene Hauptprodukt und das 10 kDa kleinere N-terminale Fragment mit einer Molekularmasse von ungefähr 38 kDa (Abb. 9, Pfeil). Im Vergleich dazu detektierte der N-terminale Huntingtin-Antikörper htt 115-129 (erkennt Aminosäure 115-129) nur das ungespaltene Hauptprodukt und nicht das N-terminale Fragment, was darauf hinweist, dass entweder das Epitop Aminosäure 115-129 C-terminal zur Spaltstelle liegt oder durch Proteolyse zerstört wurde. Die Charakterisierung des Spaltprodukts mit Hilfe von Epitop-spezifischen Huntingtin-Antikörpern zeigt, dass eine proteolytische Prozessierung zwischen Aminosäure 90 und 129 erfolgt.

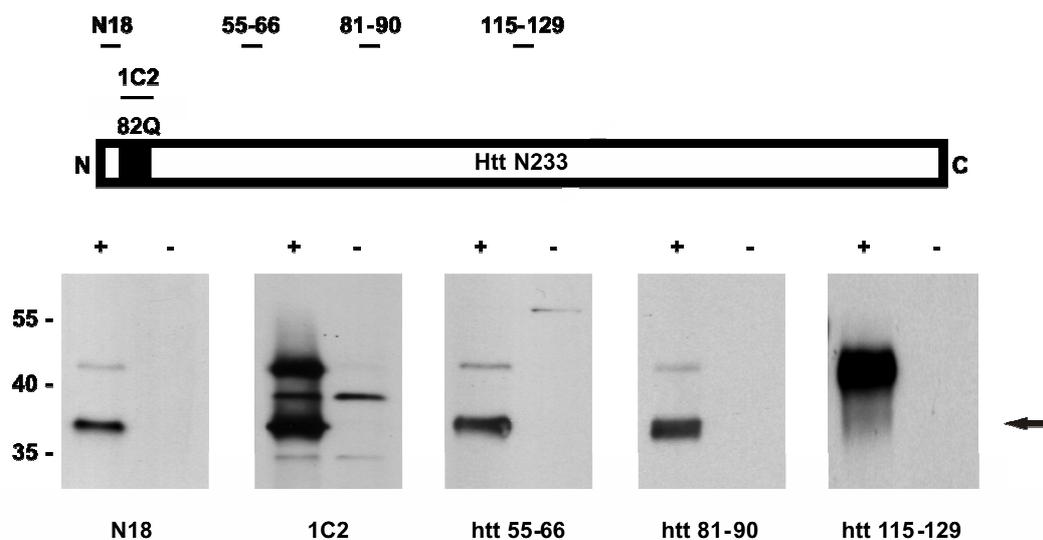


Abbildung 9: Nachweis N-terminaler Huntingtin-Sequenzen mit verschiedenen Antikörpern. Western Blot Analyse von *htt* N233-82Q-transfizierten (+) und untransfizierten (-) HEK 293-Zellen unter Verwendung der sequentiellen N-terminalen Huntingtin-Antikörper N18, 1C2, htt 55-66, htt 81-90 und htt 115-129. Alle Antikörper, außer htt 115-129, konnten das N-terminale Spaltprodukt detektieren (Pfeil).

3.1.3.2 N-terminale Proteolyse von Huntingtin um Aminosäure 120 *in vitro* und *in vivo*

Ergänzend zur Eingrenzung der N-terminalen Spaltregion in Huntingtin mittels Epitop-spezifischer Antikörper wurden Stoppkodons in *htt* N171-18Q bei Aminosäure 116 und 121 eingeführt. Die drei unterschiedlich langen N-terminalen Huntingtin-Proteine mit 115, 120 beziehungsweise 171 Aminosäuren und identischem Polyglutamin-Abschnitt wurden in HEK 293-Zellen für 48 Stunden exprimiert. Der gesamte HEK 293-Proteinextrakt wurde in einem 15 % igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Huntingtin-Proteine mit dem Antikörper htt 81-90 detektiert (Abb. 10A). Das Protein Htt N120-18Q besaß in der SDS-PAGE dieselbe elektrophoretische Mobilität wie das N-terminale Spaltprodukt von Htt N171-

18Q, was vermuten lässt, dass die N-terminale Spaltung bei circa Aminosäure 120 stattfindet. Darüber hinaus hat das N-terminale Fragment von Htt N171-82Q, welches im Homogenat des Gehirns der transgenen HD-Mauslinie HD-N171-82Q detektiert wurde (Schilling *et al.* 1999), das N-terminale Fragment von Htt N233-82Q und das Protein Htt N120-82Q, beide detektiert in transfizierten HEK 293-Zellen, dieselbe Molekularmasse im SDS-Gel (Abb. 10B, Pfeil). Es ist zu erwähnen, dass im Mausgehirn-Homogenat von HD-N171-82Q kaum ungespaltenes Htt N171-82Q-Protein mit dem Antikörper htt 81-90 detektierbar war. Ein Grund hierfür könnte die sehr effiziente Spaltung des Proteins *in vivo* über mehrere Monate hinweg sein oder der Antikörper htt 81-90 kann das vorhandene Hauptprodukt in der Maus nicht detektieren.

Diese Daten zeigen, dass proteolytische Spaltung von Huntingtin um die Aminosäure 120 *in vitro* und *in vivo* erfolgt und bestätigt den Nachweis der Spaltregion zwischen Aminosäure 90-129 mit Hilfe von Epitop-spezifischen Huntingtin-Antikörpern.

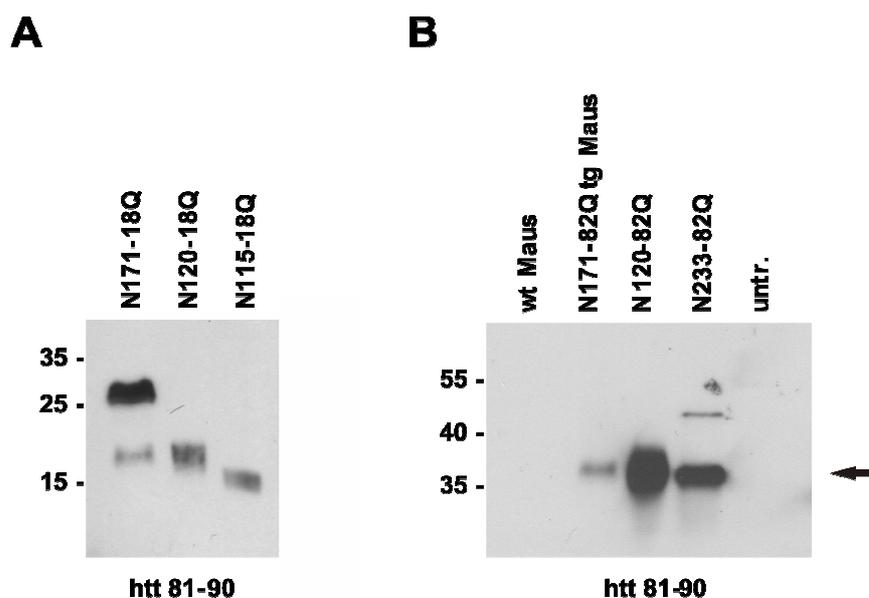


Abbildung 10: N-terminale Huntingtin-Spaltung *in vitro* und *in vivo* bei circa Aminosäure 120. **A)** Das N-terminale Spaltprodukt nach Expression von Htt N171-18Q läuft mit derselben Mobilität im SDS-Gel wie Htt N120-18Q. **B)** Das N-terminale Spaltprodukt von Htt N233-82Q läuft im SDS-Gel auf derselben Höhe wie Htt N120-82Q und das N-terminale Spaltprodukt der transgenen (tg) Mauslinie HD-N171-82Q (Pfeil). Wt = wildtyp; untr. = untransfizierte HEK 293-Zellen.

3.1.4 Analyse der Aggregation von Huntingtin-Fragmenten im Zellkultur-Modell

3.1.4.1 Aggregation von mutierten N-terminalen Huntingtin-Fragmenten

Um die Aggregation und subzelluläre Lokalisation von mutierten Huntingtin-Fragmenten zu untersuchen, wurde indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. 48 Stunden nach der Transfektion von COS-7-Zellen mit *htt* N233-82Q konnten Aggregate von Huntingtin mit spezifischen Antikörpern gegen den N-terminus nachgewiesen werden. Die Epitop-spezifischen Antikörper *htt* 81-90 und *htt* 115-129 detektierten zytoplasmatische und nukleäre Einschlusskörper in transfizierten COS-7-Zellen (Abb. 11 Reihe 1-3). Aggregate des Proteins Htt N233-82Q konnten mit beiden N-terminalen Huntingtin-Antikörpern in der perinukleären Region (Abb. 11 Reihe 1) und im Nukleus (Abb. 11 Reihe 2, Pfeilspitze) nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden nukleäre Huntingtin-Aggregate detektiert, die nur von *htt* 81-90 erkannt wurden (Abb. 11 Reihe 3, Pfeil). Dies lässt darauf schließen, dass kleinere N-terminale Spaltprodukte von Htt N233-82Q ohne das Epitop Aminosäure 115-129 in der Lage sind im Nukleus zu aggregieren.

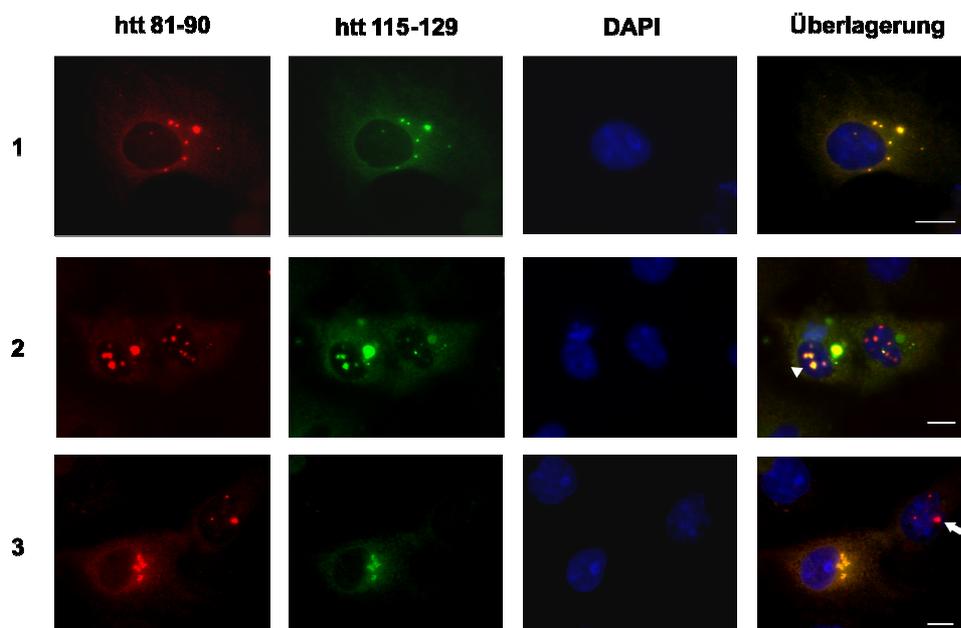


Abbildung 11: Aggregation von Huntingtin in COS-7-Zellen. Transfizierte COS-7-Zellen, die Htt N233-82Q exprimierten, wiesen perinukleäre und nukleäre Einschlüsse auf. Das Epitop Aminosäure 81-90 ist rot, das Epitop Aminosäure 115-129 ist grün und der Nukleus ist durch DAPI blau gekennzeichnet. Perinukleäre (Reihe 1) und nukleäre (Reihe 2, Pfeilspitze) Einschlüsse wurden mit *htt* 81-90 und *htt* 115-129 detektiert. Zusätzlich konnten nukleäre Einschlüsse aus aggregierten N-terminalen Spaltprodukten nachgewiesen werden, die nur mit *htt* 81-90 interagierten (Reihe 3, Pfeil). Der Maßstab ist 10 μ m.

Es besteht die Möglichkeit, dass im perinukleären und nukleären Bereich gemischte Aggregate aus ungespaltenen Htt N233-82Q-Proteinen und N-terminalen Spaltprodukten gebildet wurden, was mit der Methode der Immunfluoreszenz-Mikroskopie nicht auflösbar war.

3.1.4.2 Nachweis von nukleären Aggregaten bestehend aus mutierten N-terminalen Huntingtin-Fragmenten

Da durch die übliche Immunfluoreszenz-Mikroskopie nicht eindeutig festgestellt werden konnte, ob sich mikroskopisch sichtbare Aggregate direkt im Nukleus befinden oder nur auf diesem aufliegen und perinukleär lokalisiert sind, wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200 ApoTome optische Schnitte erstellt. Mit dem Z-Stapel Modul konnten verschiedene Fokusebenen des Zellkerns als Bildstapel aufgenommen und dreidimensional dargestellt werden. Einschlusskörper, die im Nukleus lokalisiert sind, werden nur in einigen Schnitten sichtbar und verschwinden dann wieder. Durchgehend oder nur am Anfang beziehungsweise am Ende sichtbare Aggregate könnten auch im Zytoplasma lokalisiert sein. Abbildung 12A-F zeigt eine Serie von optischen Schnitten mit einer optischen Distanz von 0,5 μm durch eine mit *htt* N233-82Q-transfizierte Zelle, die nukleäres Huntingtin aufweist und zuvor in Abbildung 11 Reihe 3 gezeigt wurde. Ein Einschlusskörper, der mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit im Nukleus lokalisiert ist, wurde mit einem weißen Pfeil markiert.

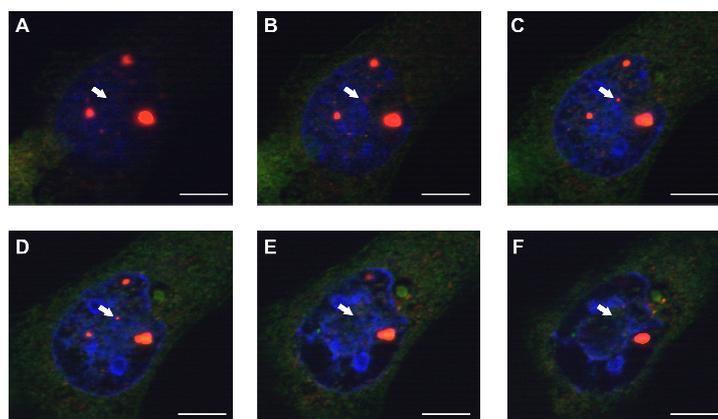


Abbildung 12: Optische Schnitte durch eine mit *htt* N233-82Q-transfizierte COS-7-Zelle. **A-F)** Optische Schnitte mit einer optischen Distanz von 0,5 μm zeigen einen nukleären Einschluss, welcher nur in den mittleren Schnitten detektiert wurde und somit nachweislich im Zellkern lokalisiert war (Pfeil). Nukleäre Einschlüsse wurden mit dem Antikörper htt 81-90 (rot) detektiert und der Zellkern mit DAPI angefärbt (blau). Der Maßstab ist 10 μm .

3.1.4.3 Untersuchung der Expression und Aggregation von mutierten N-terminalen Huntingtin-Fragmenten über die Zeit

Um das Aggregationsverhalten von Htt N233-82Q und dem N-terminalen Spaltprodukt näher zu untersuchen, wurde die Formation von mikroskopisch sichtbaren Einschlusskörpern über die Zeit beobachtet. COS-7-Zellen wurden 0, 6, 9, 12, 15, 24 beziehungsweise 48 Stunden nach der Transfektion mit *htt* N233-82Q auf Deckgläsern fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung des Antikörpers *htt* 81-90 inkubiert. Huntingtin-Einschlusskörper waren 15 Stunden nach der Transfektion mit *htt* N233-82Q detektierbar (Tab. 2 und Abb. 13A).

Parallel wurden HEK 293-Zellen 0, 6, 9, 12, 24 beziehungsweise 48 Stunden nach der Transfektion mit *htt* N233-82Q geerntet und die Huntingtin-Proteine mit dem Antikörper *htt* 81-90 immunologisch im Western Blot nachgewiesen (Abb. 13B).

Tabelle 2: Aggregation von mutierten Huntingtin-Proteinen über die Zeit.

0	6	9	12	15	24	48	Stunden (nach der Transfektion)
-	-	-	-	+	+	+	intrazelluläre Einschlusskörper

- keine Huntingtin-Aggregation sichtbar

+ transfizierte Zellen mit mikroskopisch sichtbaren Einschlusskörpern

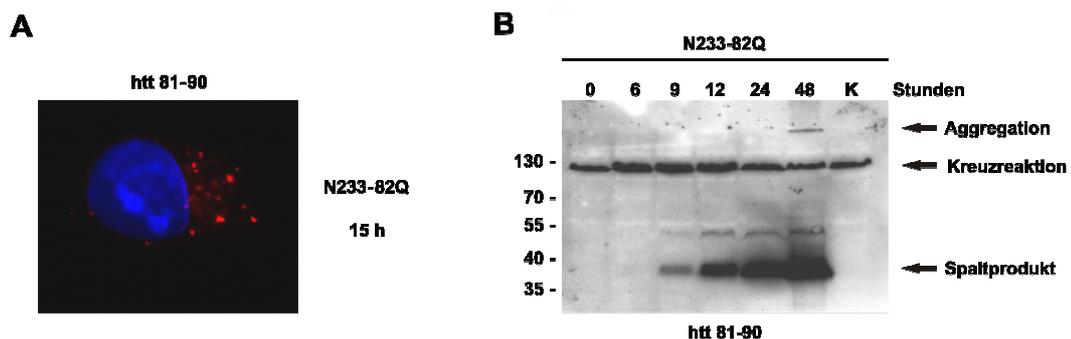


Abbildung 13: Aggregation von mutierten Huntingtin-Proteinen über die Zeit. **A)** 15 Stunden nach der Transfektion von COS-7-Zellen mit *htt* N233-82Q konnten zelluläre Einschlüsse mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung des Antikörpers *htt* 81-90 detektiert werden. **B)** 9 Stunden nach der Transfektion von HEK 293-Zellen mit *htt* N233-82Q konnte das exprimierte Huntingtin-Protein und das N-terminale Spaltprodukt mit dem Antikörper *htt* 81-90 im Western Blot nachgewiesen werden. 48 Stunden nach der Transfektion konnten SDS-unlösliche Huntingtin-Aggregate im Sammelgel immunologisch detektiert werden. K = Kontrolle (untransfizierte HEK 293-Zellen).

9 Stunden nach der Transfektion waren die Expression von Htt N233-82Q und die N-terminale proteolytische Spaltung detektierbar. 48 Stunden nach der Transfektion konnten schließlich SDS-unlösliche Huntingtin-Aggregate im Sammelgel nachgewiesen werden.

3.1.5 Beeinflussung der Spalteffizienz durch Mutationen in der putativen N-terminalen Spaltregion von Huntingtin

3.1.5.1 Einfluss von Mutationen auf die N-terminale proteolytische Prozessierung von Huntingtin

Für die weiterführende Analyse der putativen N-terminalen Spaltregion wurden sequentielle Deletionen von je zwei Aminosäuren in der Region Aminosäure 120-130 (Abb. 14A, Rahmen) und zusätzlich zwei größere Deletionen $\Delta 93-116$ und $\Delta 116-125$ in die Sequenz *htt* N171-18Q mittels ortsgerichteter Mutagenese eingeführt. Nach der Transfektion von HEK 293-Zellen mit den verschiedenen *huntingtin*-Konstrukten wurden die mutierten Huntingtin-Proteine mit dem Antikörper *htt* 81-90 immunologisch nachgewiesen. Alle Mutanten mit Doppel-Deletionen innerhalb der putativen Spaltregion zeigten mit geringen Variationen in der Intensität der Protein-Banden in unabhängigen Western Blot Analysen ($n = 3$) das kleinere N-terminale Spaltprodukt (Abb. 14B, Pfeil). Interessanterweise führte die Expression der Mutanten Htt N171-18Q $\Delta 121-122$ und Htt N171-18Q $\Delta 129-130$ immer zu einer erhöhten Spalteffizienz in allen unabhängigen Experimenten. Die größere Mutation $\Delta 93-116$ zeigte keinen Effekt auf die Fragmentbildung. Im Gegensatz zu dieser und zu den Doppel-Deletionen zeigte die Mutation $\Delta 116-125$ eine deutliche Reduktion der proteolytischen Spaltung. Zusätzlich wurden Doppel-Substitutionen mit Alanin eingeführt und die Generierung des N-terminalen Fragments analysiert (Abb. 14C, Pfeil). Die Mutanten Htt N171-18Q AA124-125 und Htt N171-18Q AA128-129 reduzierten die proteolytische Spaltung deutlich. Des Weiteren zeigten die Mutanten Htt N171-18Q AA122-123 und Htt N171-18Q AA126-127 stetig eine deutliche Verstärkung der Proteolyse.

Die Untersuchung spezifischer Mutationen innerhalb der putativen Spaltregion ergab, dass der Bereich um die Aminosäure 120 wichtig für die proteolytische Prozessierung ist und dass Mutationen innerhalb dieser Region einen Effekt auf die Effizienz der Spaltung haben. Da die Mutationen $\Delta 116-125$, $\Delta 121-122$ und AA124-125 die N-terminale Spaltung am deutlichsten beeinflusst haben, wurden diese Mutationen für weitere Versuche verwendet.

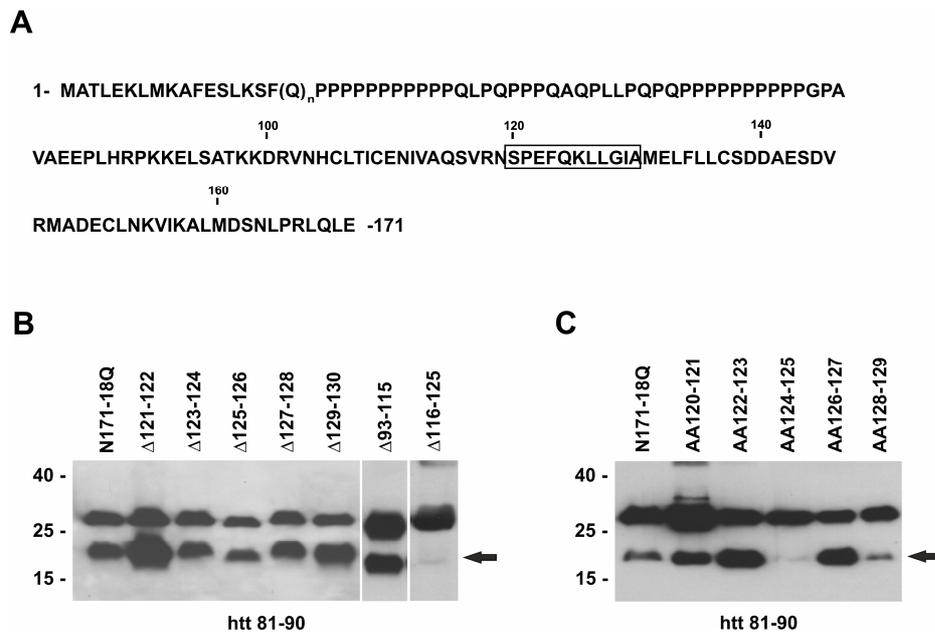


Abbildung 14: Mutationen in der putativen Spaltregion. **A)** Sequenz der ersten 171 Aminosäuren von Huntingtin mit der Region Aminosäure 120-130, in welche Doppel-Deletionen und Doppel-Alanin-Substitutionen eingeführt wurden (Rahmen). Htt N171-18Q-Proteine mit **B)** sequentiellen Doppel-Deletionen, Δ 93-116, Δ 116-125 und **C)** sequentiellen Doppel-Alanin-Substitutionen wurden in HEK 293-Zellen exprimiert und mit dem Antikörper htt 81-90 immunologisch detektiert. Das N-terminale Spaltprodukt ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.1.5.2 Modulation N-terminaler Proteolyse von mutiertem Huntingtin

Die bisherigen Analysen der putativen N-terminalen Spaltregion wurden durch Expression von Huntingtin mit einem normalen Polyglutamin-Abschnitt (18Q) durchgeführt. Um die biologischen Konsequenzen der Verstärkung oder Verringerung der N-terminalen Fragmentierung zu analysieren, wurden die Mutationen Δ 116-125, Δ 121-122 und AA124-125 in das Konstrukt *htt* N233-82Q-pRC/CMV mit der Sequenz für einen pathogenen Polyglutamin-Abschnitt eingeführt, da nach der Expression dieses Proteins eine deutlich stärkere N-terminale Spaltung detektierbar war als nach der Expression von Htt N171-82Q. Ein N-terminales Huntingtin-Protein mit pathogenem Polyglutamin-Abschnitt ist im Vergleich zu einem N-terminalen Huntingtin-Protein mit nicht-pathogenem Polyglutamin-Abschnitt in der Lage intrazellulär zu aggregieren (Li & Li 1998). Das N-terminale Fragment der jeweiligen Mutante wurde nach der Expression in HEK 293-Zellen mit Hilfe des Odyssey Infrared Imaging System detektiert und quantifiziert. Wie im Htt N171-18Q-Hintergrund konnten die Mutationen Δ 116-125 und AA124-125 im Htt N233-82Q-Hintergrund die proteolytische Spaltung mit einer deutlichen Reduzierung der N-terminalen Fragmentierung

beeinflussen. Die Fragmentbildung bei Htt N233-82Q Δ 116-125 ist $2,8 \pm 0,4$ -fach und die Fragmentbildung bei Htt N233-82Q AA124-125 ist $3,2 \pm 0,3$ -fach im Vergleich zu Htt N233-82Q reduziert ($n = 3$). Die Mutation Δ 121-122 bewirkte im Htt N233-82Q-Hintergrund eine $2,5 \pm 0,1$ -fache Zunahme des Spaltprodukts ($n = 3$). Alle Mutanten mit 82 Glutaminen verhalten sich analog zu den Mutanten mit 18 Glutaminen. Abbildung 15A-C zeigt die Quantifizierung der Mutanten Htt N233-82Q AA124-125 und Htt N233-82Q Δ 121-122, welche einen gegensätzlichen Effekt in der Generierung des N-terminalen Fragments aufweisen und aus diesem Grund für weitere Experimente eingesetzt wurden.

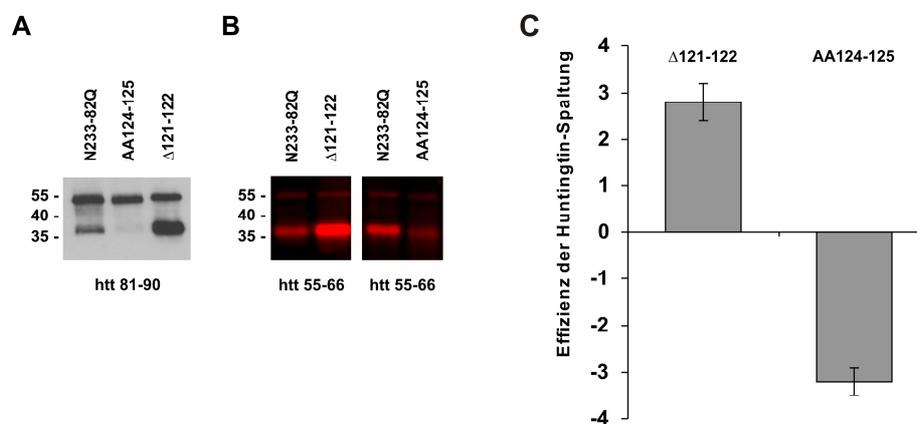


Abbildung 15: Quantifizierung der N-terminalen Spaltprodukte. Expression der Proteine Htt N233-82Q, Htt N233-82Q AA124-125 und Htt N233-82Q Δ 121-122 in HEK 293-Zellen mit anschließender **A)** Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90 und **B)** Odyssey Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers htt 55-66 zur Quantifizierung der Proteinbanden. **C)** Diagramm zur Darstellung der Huntingtin-Spalteffizienz nach den Mutationen Δ 121-122 und AA124-125.

Lunkes *et al.* zeigten, dass die Deletion von Aminosäure 105-114 in Huntingtin mit 502 Aminosäuren und 73 Glutaminen, exprimiert in differenzierten neuronalen NG108-15-Zellen, die Generierung des N-terminalen Fragments cp-A verhindert (Lunkes *et al.* 2002). Um diesen Effekt in transfizierten HEK 293-Zellen zu prüfen, wurde zusätzlich zu den drei beschriebenen Mutationen die Aminosäuren 105-114 in Htt N233-82Q deletiert.

Interessanterweise zeigte diese Mutante im Vergleich zu nicht-mutiertem Htt N233-82Q-Protein keine Änderung in der Generierung des N-terminalen Fragments (Abb. 16, Pfeil). Eine weitere Studie belegte ebenfalls, dass die Deletion der Aminosäuren 105-114 im Vollängen-Huntingtin, stabil exprimiert in PC12-Zellen, keinen Einfluss auf die N-terminale Spaltung hat (Ratovitski *et al.* 2007).

Die Region von Aminosäure 116-125 scheint wichtig für die N-terminale Proteolyse von Huntingtin in dem hier verwendeten Zellkultur-Modell zu sein. Mutationen innerhalb der putativen Spaltregion können einen reduzierenden Effekt (AA124-125) oder verstärkenden Effekt (Δ 121-122) auf die Generierung des N-terminalen Fragments in der Zelle haben.

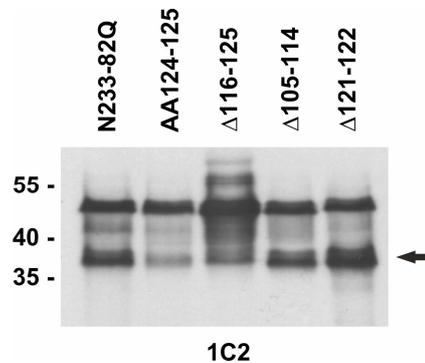


Abbildung 16: Einfluss verschiedener Mutationen in Htt N233-82Q auf die Spalteffizienz. Expression von Htt N233-82Q und den entsprechenden Mutanten in HEK 293-Zellen mit anschließender Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers 1C2. Das N-terminale Spaltprodukt ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.1.5.3 N-terminale Proteolyse von Huntingtin nach Inhibierung des Proteasoms

Die proteasomalen und lysosomalen Protein-Abbauwege stellen die zwei wichtigsten Arten der Protein-Degradierung in eukaryotischen Zellen dar (Hilt & Wolf 2004, Pillay *et al.* 2002). Um ausschließen zu können, dass die Mutationen in der Spaltregion die Degradierung von Huntingtin durch den proteasomalen Abbauweg beeinflussen, wurde die Substanz ALLN eingesetzt. Dieser reversible Inhibitor kann die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms und gleichzeitig die Aktivität von Calpain 1/2 und Cathepsin L hemmen (Figueiredo-Pereira *et al.* 1994, Sasaki *et al.* 1990). Die Western Blot Analyse der HEK 293-Zellextrakte nach der Transfektion mit *htt* N233-82Q und ihren Mutanten bei gleichzeitiger Zugabe von 80 μ M beziehungsweise 200 μ M ALLN zeigte einerseits, dass der Proteasom-Inhibitor keine Auswirkung auf die Generierung des N-terminalen Spaltprodukts von Htt N233-82Q hat. Andererseits hat die Hemmung des Proteasoms keinen Einfluss auf das Verhältnis von Hauptprodukt zu Spaltprodukt nach der Expression von Htt N233-82Q und den entsprechenden Mutanten (Abb. 17A). Die schwachen Proteinbanden bei Htt N233-82Q AA124-125 ohne Zugabe des Inhibitors (0 μ M) ist eine Folge von zu geringer Proteinexpression nach der Transfektion.

Um die Wirksamkeit des Inhibitors ALLN im HEK 293-Zellsystem zu bestätigen, wurde die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms unter Verwendung des Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay gemessen. Nach Zugabe von 80 μM ALLN konnte eine Reduktion der Proteasom-Aktivität von 80 % und nach Zugabe von 200 μM ALLN eine Reduktion von 93 % verzeichnet werden (Abb. 17B).

Aus diesen Untersuchungen ist zu schlussfolgern, dass der proteasomale Abbauweg keinen direkten Einfluss auf die Generierung des N-terminalen Fragments von Htt N233-82Q und der entsprechenden Mutanten in der Zelle hat.

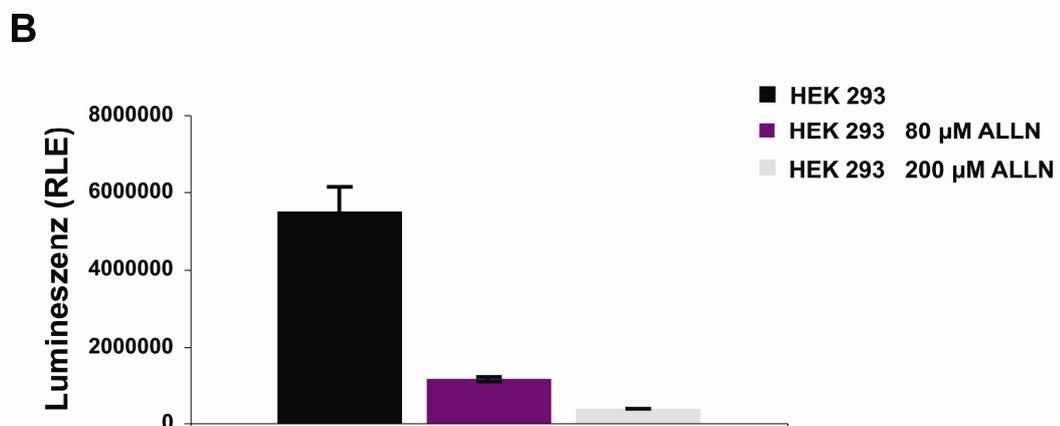
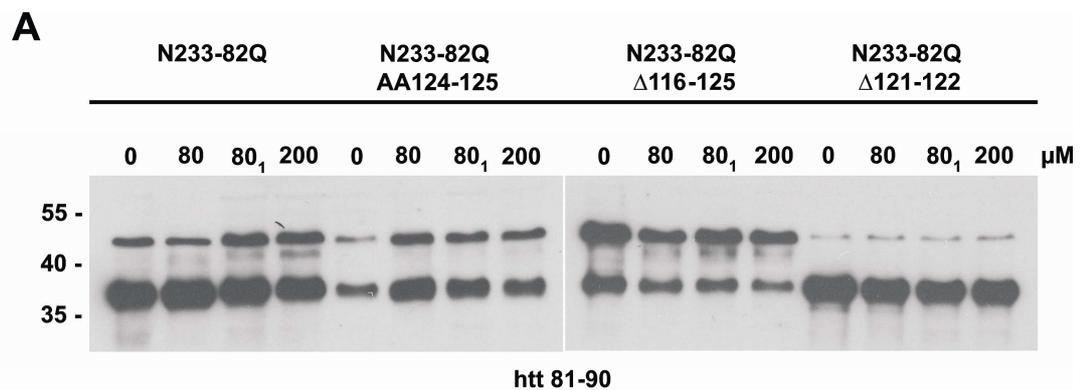


Abbildung 17: Inhibierung des Proteasoms durch ALLN. **A)** Expression von Htt N233-82Q und den entsprechenden Mutanten in HEK 293-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung des Proteasoms. Die Endkonzentration von DMSO im Medium war 0,5 % (0, 80, 200) beziehungsweise 0,2 % (80₁). Immunologischer Nachweis von Huntingtin mit dem Antikörper htt 81-90. **B)** Nachweis der Inhibierung des Proteasoms in untransfizierten HEK 293-Zellen nach Zugabe von ALLN. Die Aktivität des Proteasoms wurde als Relativen Licht-Einheiten (RLE) dargestellt. Die Lumineszenz-Daten wurden 24 Stunden nach Zugabe des Inhibitors erstellt.

3.1.6 Analyse der Huntingtin-Mutanten

3.1.6.1 Einfluss der Mutationen in der putativen Spaltregion von Huntingtin auf die Caspase 3 und 7-Aktivitäten

Die Aktivierung der Caspase 3 und 7 ist ein wichtiges Merkmal der Exekutionsphase in der Apoptose (Kelly *et al.* 2003). Zur Bestimmung der Aktivitäten dieser Effektor-Caspasen wurde der Caspase-Glo[®] 3/7 Assay verwendet. Caspasen sind Cystein-Aspartat-Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat spalten. Mit dem Caspase-Glo[®] 3/7 Assay sollten die Aktivitäten der Caspase 3 und 7 in HEK 293-Zellen bestimmt werden, nachdem die Zellen mit *htt* N233-82Q und den entsprechenden Mutanten transfiziert wurden. Abbildung 18A zeigt eine signifikante Erhöhung der Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach Expression der Mutante Htt N233-82Q Δ 121-122, welche die Generierung des Spaltprodukts erhöht. Es wurde $1,98 \pm 0,16$ -fach ($n = 3$, $***p < 0,001$) mehr Aktivität gemessen im Vergleich zum Htt N233-82Q-Protein. Im Gegensatz dazu war kein statistisch signifikanter Unterschied in den Caspase 3 und 7-Aktivitäten in Zellen erkennbar, welche mit pRC/CMV, *htt* N233-82Q und *htt* N233-82Q AA124-125 transfiziert wurden. Eine Reduktion des N-terminalen Fragments durch die Mutation AA124-125 hatte daher keine Minderung der Effektorcaspase-Aktivitäten zur Folge. Abbildung 18B zeigt die dazugehörige Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers 1C2. Die Mutation Δ 121-122 zeigte wie erwartet eine Verstärkung der proteolytischen Spaltung und die Mutation AA124-125 eine Verringerung der proteolytischen Spaltung in HEK 293-Zellen, während die Hauptprodukt-Levels vergleichbar waren. Da die Mutante Htt N233-82Q Δ 116-125 nicht in vergleichbaren Mengen exprimiert werden konnte, wurde sie in diesem Experiment nicht eingesetzt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression von Htt N233-82Q und die Generierung des entsprechenden N-terminalen Fragments keine Wirkung auf die Caspase 3 und 7-Aktivitäten in HEK 293-Zellen haben. Gegensätzlich dazu führt die Mutation Δ 121-122 in Htt N233-82Q zu erhöhten Effektorcaspase-Aktivitäten und einer gesteigerten Akkumulation der spezifischen N-terminalen Fragmente in der Zelle.

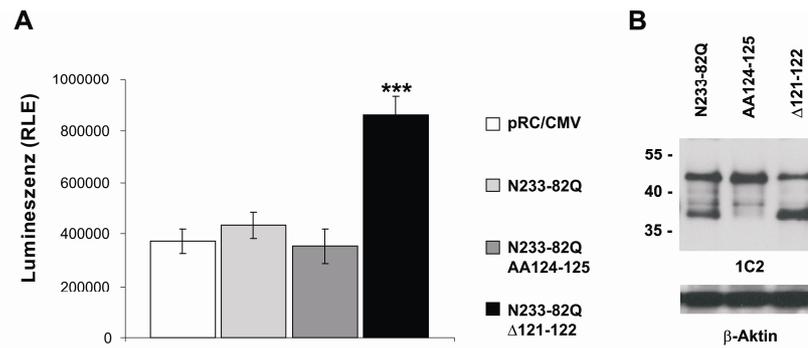


Abbildung 18: Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression mutierter Huntingtin-Proteine. **A)** Caspase 3 und 7-Aktivitäten in transfizierten HEK 293-Zellen, die Htt N233-82Q und die entsprechenden Mutanten exprimieren. Transfektion von pRC/CMV diente als Kontrolle. Caspase 3 und 7-Aktivitäten sind als Relative Licht-Einheiten (RLE) dargestellt. Die Lumineszenz-Daten wurden 48 Stunden nach der Transfektion erstellt ($n = 3$, $***p < 0,001$). **B)** Western Blot Analyse der Zelllysate, welche gleichzeitig für den Luziferase-Assay eingesetzt wurden, unter Verwendung des Antikörpers 1C2. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.1.6.2 Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol durch die Mutation $\Delta 121-122$ in Huntingtin

Apoptose kann auf verschiedenen Signalwegen eingeleitet werden. Bei dem extrinsischen Weg werden Zellmembranrezeptoren, sogenannte Todesrezeptoren aktiviert. Die Bindung von Liganden, wie TNF, Apo oder Fas an die jeweiligen Rezeptoren führt über einen Komplex zur Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 10 (Ashkenazi & Dixit 1998). Bei dem intrinsischen Weg spielt das Cytochrom c eine zentrale Rolle. Bei diesem Signalweg kann eine mitochondriale Signalkaskade durch viele unterschiedliche Stimuli, die eine Zellschädigung hervorrufen, ausgelöst werden. Es werden die Membranporen der äußeren Mitochondrienmembran geöffnet und Cytochrom c ins Zytoplasma freigesetzt. Im Zytoplasma bilden das Cytochrom c, Apaf-1 und die Pro-Caspase 9 das Apoptosom. Nach der Aktivierung von Caspase 9 kann diese wiederum die Effektorcaspasen 3 und 7 aktivieren (Li *et al.* 1997).

Die Mutation $\Delta 121-122$, mit einer verstärkten N-terminalen Proteolyse, führte zu erhöhten Effektorcaspase 3 und 7-Aktivitäten (siehe Kapitel 3.1.6.1). Als nächstes sollte daher untersucht werden, ob auch ein früherer apoptotischer Marker, wie die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium, nachweisbar ist. Hierfür wurde eine subzelluläre Fraktionierung von HEK 293-Zellen, die 9 Stunden beziehungsweise 48 Stunden nach der Transfektion mit pRC/CMV, *htt* N233-82Q und *htt* N233-82Q $\Delta 121-122$ geerntet wurden,

durchgeführt. 9 Stunden beziehungsweise 48 Stunden nach der Transfektion war in Zellen, die Htt N233-82Q Δ 121-122 exprimierten im Vergleich zu Htt N233-82Q-exprimierenden Zellen ein Anstieg der zytosolischen Cytochrome c-Menge detektierbar (Abb. 19A und B).

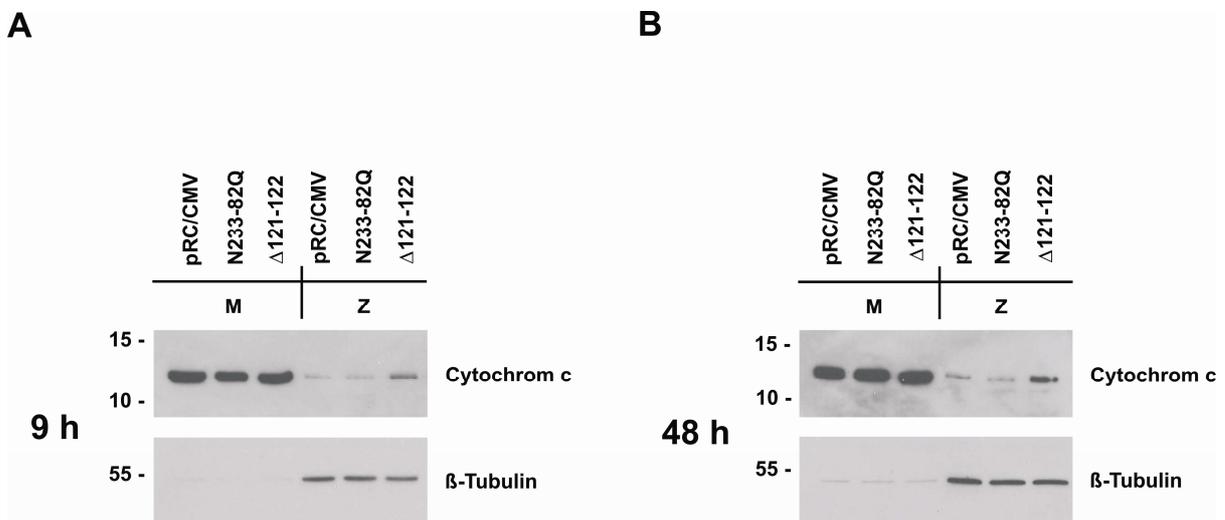


Abbildung 19: Detektion von Cytochrome c im Zytosol von Huntingtin-exprimierenden HEK 293-Zellen. Western Blot Analyse zum Nachweis von Cytochrome c in der mitochondrialen (M) und zytosolischen (Z) Fraktion **A**) 9 Stunden und **B**) 48 Stunden nach der Transfektion von pRC/CMV, *htt* N233-82Q und *htt* N233-82Q Δ 121-122 mit dem Antikörper Anti-Cytochrome c. Die Mutation Δ 121-122 in Huntingtin führt zu einem Anstieg der Cytochrome c-Menge im Zytosol. β -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol und die nachweislich erhöhte Effektor-caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression von Htt N233-82Q Δ 121-122 zeigen, dass Huntingtin mit dieser spezifischen Mutation apoptotische Prozesse in der Zelle verstärkt. Da Cytochrom c in geringen Mengen auch in der zytosolischen Fraktion nach der Transfektion mit pRC/CMV oder Htt N233-82Q detektiert wurde, könnte beispielsweise eine Verunreinigung in der subzellulären Fraktionierung entstanden sein oder die Transfektion ist per se schwach toxisch für HEK 293-Zellen. Eine vermehrte Freisetzung von Cytochrome c war schon 9 Stunden nach der Transfektion mit *htt* N233-82Q Δ 121-122 erkennbar gewesen, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keine Einschlusskörper mikroskopisch sichtbar waren. Das Protein wurde jedoch exprimiert und Proteolyse erfolgte (Daten nicht gezeigt). Daraus ist zu schließen, dass submikroskopische Spezies von N-terminalen Huntingtin durch die Mutation Δ 121-122 apoptotische Prozesse aktivieren.

3.1.6.3 Verringerung der Vitalität von neuronalen Zellen durch die Mutation $\Delta 121-122$ in Huntingtin

Die Mutation $\Delta 121-122$ in Htt N233-82Q führte in HEK 293-Zellen zu erhöhten Caspase 3 und 7-Aktivitäten und zu einer verstärkten Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol. Chorea Huntington ist eine neurodegenerative Erbkrankheit und es war zu untersuchen, ob Htt N233-82Q mit dieser spezifischen Mutation in neuronalen Zellen toxisch ist. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden N2a-Zellen mit den Konstrukten *htt* N233-82Q, *htt* N233-82Q $\Delta 121-122$ und dem Kontroll-Vektor pRC/CMV transfiziert, nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank mit Trypanblau-Lösung angefärbt und die Anzahl der vitalen und toten N2a-Zellen bestimmt. Nach der Expression von Htt N233-82Q $\Delta 121-122$ wurden 16,5 % weniger lebende Zellen im Vergleich zur Expression von Htt N233-82Q detektiert ($n = 3$, $**p < 0,01$). Es war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Vitalität von N2a-Zellen erkennbar, welche mit pRC/CMV und *htt* N233-82Q transfiziert wurden (Abb. 20A). Das Protein Htt N233-82Q und das dazugehörige N-terminale Spaltprodukt sind dementsprechend nicht toxisch. Abbildung 20B zeigt die dazugehörige Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers 1C2 mit vergleichbaren Expressionslevels der Proteine.

Mit der Bestimmung der Zellvitalität von neuronalen Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Mutation $\Delta 121-122$ in Huntingtin mit einem pathogenen Polyglutamin-Abschnitt toxisch ist und eine erhöhte Zelltodrate verursacht.

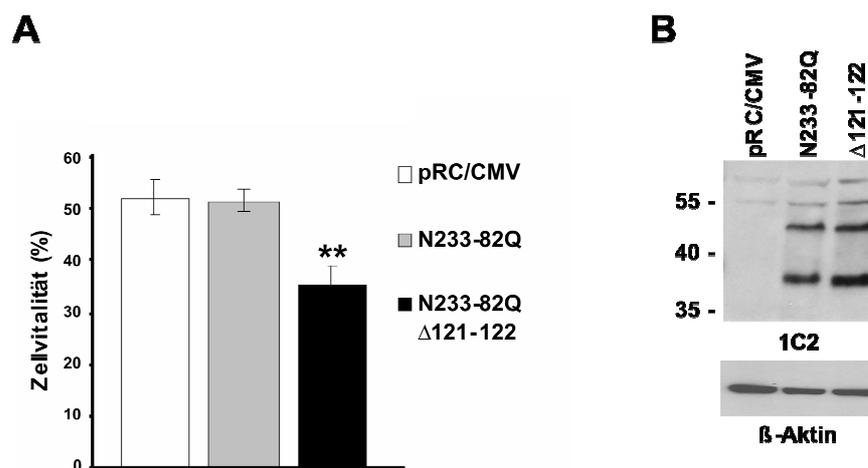


Abbildung 20: Zellvitalität nach der Expression mutierter Huntingtin-Proteine. **A)** Zellvitalität von transfizierten N2a-Zellen, die Htt N233-82Q und die entsprechende Mutante exprimieren. Transfektion von pRC/CMV diente als Kontrolle. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit Trypanblau-Färbung auf Vitalität untersucht ($n = 3$, $**p < 0,01$). **B)** Western Blot Analyse der Zellysate, welche gleichzeitig für die Bestimmung der Zellvitalität eingesetzt wurden, unter Verwendung des Antikörpers 1C2. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.1.6.4 Einfluss der proteolytischen Huntingtin-Spaltung auf das Aggregationsverhalten im Zellkultur-Modell

Wie bereits in COS-7-Zellen gezeigt wurde, aggregieren kurze N-terminale Huntingtin-Proteine mit einem pathogenen Polyglutamin-Abschnitt im Zytoplasma und im Zellkern (siehe Kapitel 3.1.4.1). Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Mutanten von Huntingtin ein unterschiedliches Aggregationsverhalten zeigen, wurden COS-7-Zellen mit den Konstrukten *htt* N233-82Q, *htt* N233-82Q AA124-125 und *htt* N233-82Q Δ 121-122 transfiziert und nach 48 Stunden auf Deckgläsern fixiert. Durch anschließende indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten Huntingtin-Aggregate, welche immunologisch mit dem Antikörper 81-90 markiert wurden, detektiert werden. Eine Quantifizierung der mikroskopisch sichtbaren Aggregate zeigte, dass 18 % der mit *htt* N233-82Q-transfizierten Zellen mindestens einen Huntingtin-Einschlusskörper besaßen ($n = 6$). Zellen, welche Htt N233-82Q AA124-125 exprimierten und eine Verringerung der N-terminalen Spaltung aufwiesen, zeigten eine signifikante Reduktion der Formation von Aggregaten und nur 10 % der transfizierten Zellen besaßen mindestens ein sichtbares Aggregat ($n = 6$, $*p < 0,05$). Im Vergleich dazu war die Aggregation von Huntingtin nach Expression der Mutante Htt N233-82Q Δ 121-122, mit einer 2,5-fach verstärkten N-terminalen Spaltung, interessanterweise mit 45 % Aggregat-haltigen Zellen 2,5-fach höher als nach der Expression von Htt N233-82Q ($n = 6$, $***p < 0,0001$) (Abb. 21A). Zusätzlich zu der Quantifizierung von Aggregaten wurde ein Filter-Retardations-Assay durchgeführt (Abb. 21B). HEK 293-Zellen, die Htt N233-82Q und die entsprechenden Mutanten exprimierten, wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Hauptproteinbanden mittels Odyssey Infrared Imaging System analysiert und normiert. Der Zellextrakt wurde mit Vakuum durch eine Celluloseacetatmembran (0,2 μ m Porengröße) gesaugt und die SDS-unlöslichen Aggregate, die auf der Membran verblieben, mit dem Antikörper *htt* 81-90 detektiert. Die Mutation Δ 121-122, die das meiste Spaltprodukt lieferte, zeigte die stärkste Formation von SDS-unlöslichen Huntingtin-Aggregaten. Die Mutanten Htt N233-82Q AA124-125 und Htt N233-82Q Δ 116-125 ließen keinen Unterschied zu Htt N233-82Q erkennen, was auch mit einer geringen Sensitivität der Methode zu begründen ist.

Die Daten der Aggregationsstudien zeigen, dass eine verminderte beziehungsweise verstärkte Generierung spezifischer N-terminaler Fragmente einen Effekt auf die Quantität von Huntingtin-Aggregaten hat.

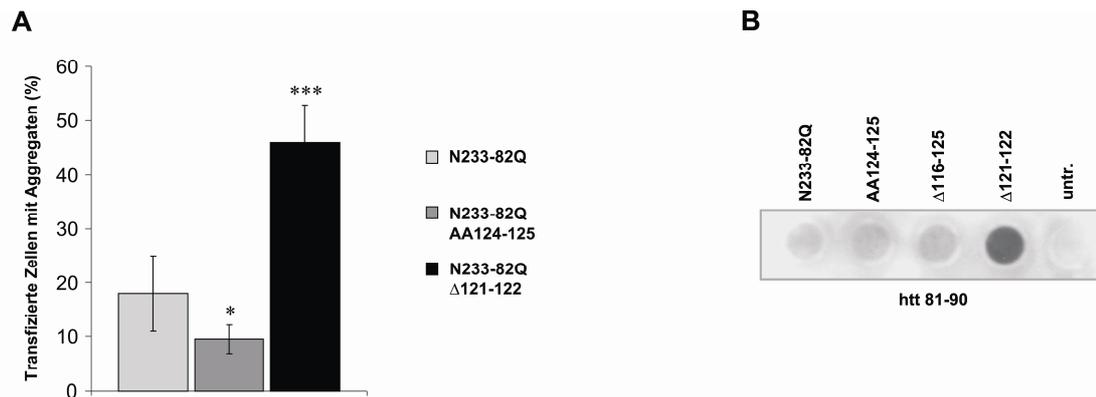


Abbildung 21: Analyse von Huntingtin-Aggregaten. **A)** Quantifizierung von Aggregaten in COS-7-Zellen nach der Transfektion mit *htt* N233-82Q und den entsprechenden Mutanten mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie ($n = 6$, $*p < 0,05$, $***p < 0,0001$). **B)** Aggregation von Htt N233-82Q und den entsprechenden Mutanten in transfizierten HEK 293-Zellen wurde mittels Filter-Retardations-Assay unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90 detektiert. Untr. = untransfizierte HEK 293-Zellen.

3.1.7 Analyse N-terminaler Huntingtin-Proteine mit unterschiedlicher Proteinlänge

3.1.7.1 Untersuchung der Aggregation von mutierten N-terminalen Huntingtin-Proteinen mit 120 Aminosäuren

Wie in Kapitel 3.1.3.2 nachgewiesen, hat das Protein Htt N120-82Q dieselbe elektrophoretische Mobilität in der SDS-PAGE wie das N-terminale Spaltprodukt von Htt N233-82Q. Die Expression der Mutante Htt N233-82Q Δ121-122 führte zu erhöhten Caspasen 3 und 7-Aktivitäten sowie zu einer verstärkten Akkumulation des N-terminalen Fragments mit einer vermehrten Formation von Aggregaten. Es war zu überprüfen, ob das kürzere Huntingtin-Protein mit 120 Aminosäuren und 82 Glutaminen, welches in etwa der Größe des spezifischen N-terminalen Fragments entspricht, auch in der Lage ist zu aggregieren.

Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Htt N120-82Q-Proteine mit einem pathogenen Polyglutamin-Abschnitt im Unterschied zu Htt N120-18Q-Proteinen mit einem nicht-pathogenen Polyglutamin-Abschnitt in COS-7-Zellen stark aggregieren und in zytoplasmatischen und nukleären Einschlusskörpern zu finden sind (Abb. 22A).

Im Filter-Retardations-Assay zeigte sich eine starke Aggregation von Htt N120-82Q im Vergleich zu Htt N233-82Q und der Mutante Htt N233-82Q Δ 121-122. Da jedoch die Proteinexpression von Htt N120-82Q in HEK 293-Zellen viel höher war, lässt sich davon eine hohe Aggregationsrate ableiten. (Abb. 22B, C).

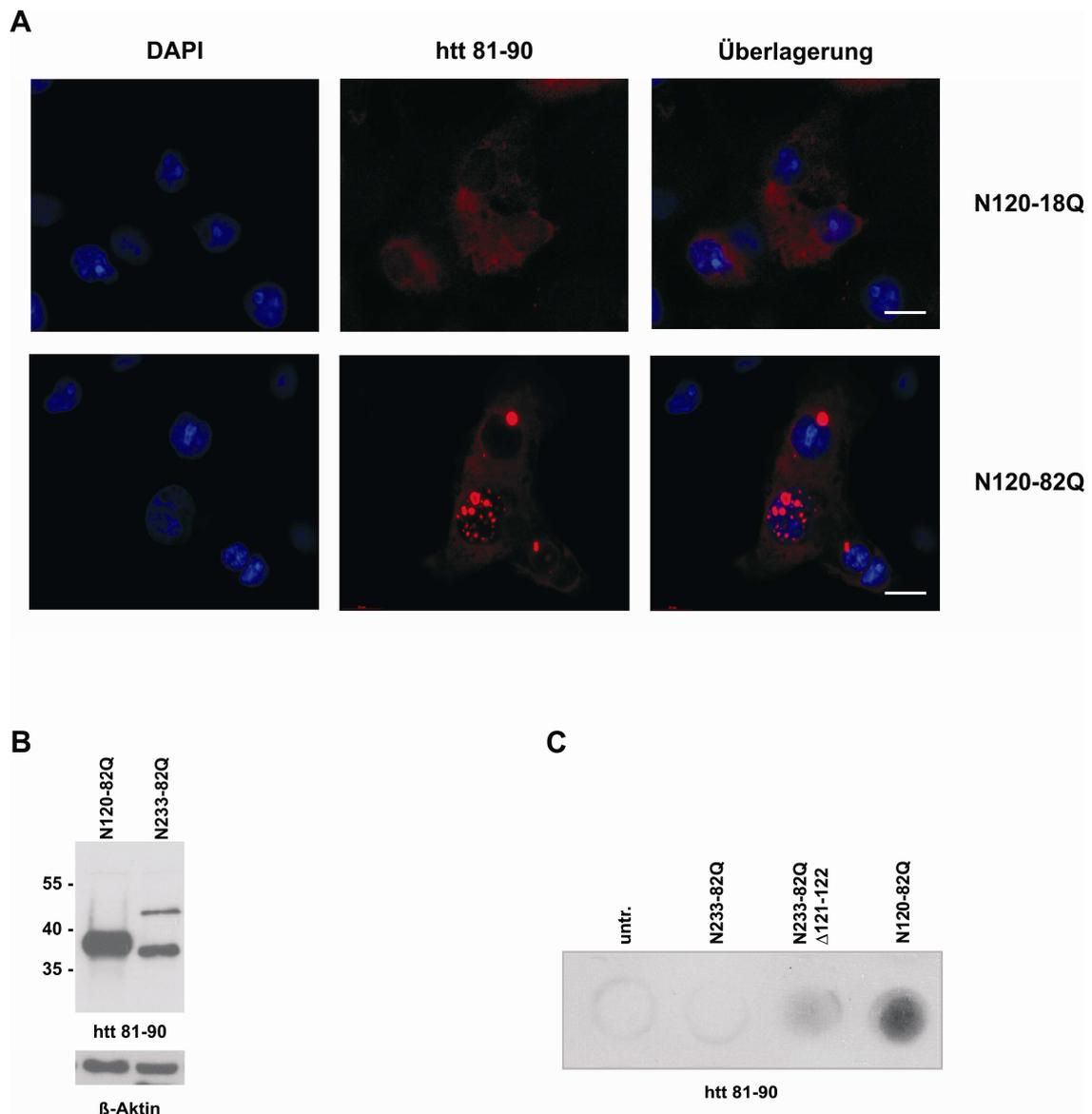


Abbildung 22: Aggregation von N-terminalen Huntingtin-Proteinen mit 120 Aminosäuren. **A)** Immunfluoreszenz-Analyse von transfizierten COS-7-Zellen, die Htt N120-18Q und Htt N120-82Q exprimieren unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90 (rot). Der Zellkern ist mit DAPI angefärbt (blau). Der Maßstab ist 10 μ m. **B)** Vergleich der Expressionslevels von Htt N120-82Q und Htt N233-82Q in HEK 293-Zellen mittels Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90. **C)** SDS-unlösliche Aggregate von Htt N233-82Q, Htt N233-82Q Δ 121-122 und Htt N120-82Q in transfizierten HEK 293-Zellen wurde mittels Filter-Retardations-Assay unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90 detektiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Untr. = untransfizierte HEK 293-Zellen.

3.1.7.2 Bestimmung der Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression verschieden langer Huntingtin-Fragmente

Es war zu untersuchen, ob die hohe Expression von Htt N120-82Q in HEK 293-Zellen verstärkte Caspase 3 und 7-Aktivitäten zur Folge hat. Daher wurde ein Luziferase-Assay wie in Kapitel 3.1.6.1 durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Expression von Htt N120-82Q interessanterweise keinen statistisch signifikanten Anstieg in den Aktivitäten von Caspase 3 und 7 hat (Abb. 23A). Vergleichend dazu führte die Expression von Htt N171-82Q, mit demselben Proteinexpressionslevel wie Htt N120-82Q, zu einer verstärkten Aktivität der Effektorcaspasen ($n = 3$, $**p < 0,01$). Da die Menge des N-terminalen Spaltprodukts von Htt N171-82Q zum Hauptprodukt vergleichsweise gering war, scheint das Hauptprodukt die Effektorcaspase-Aktivitäten zu erhöhen (Abb. 23B). In einer vorherigen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von Htt N171-82Q in transgenen Mäusen Chorea Huntington-ähnliche Symptome verursacht und diese Mäuse vorzeitig sterben (Schilling *et al.* 1999).

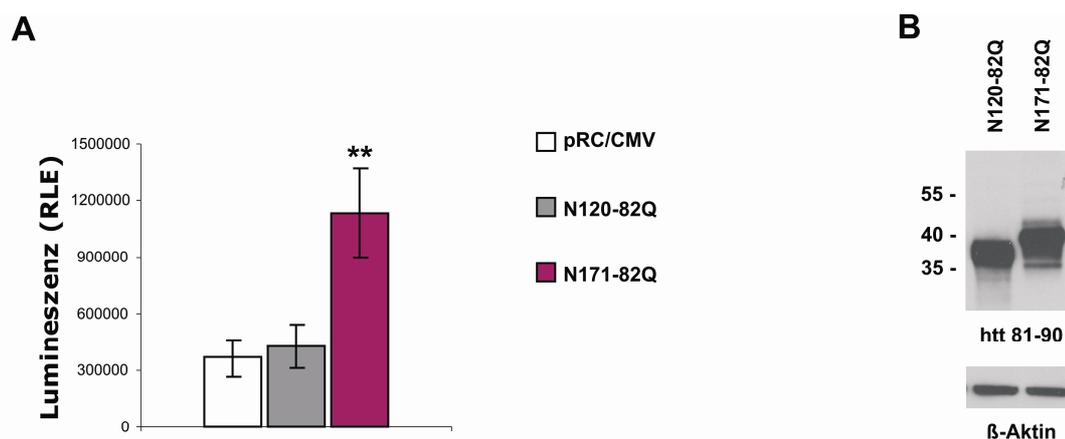


Abbildung 23: Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression verschieden langer Huntingtin-Proteine. **A)** Caspase 3 und 7-Aktivitäten in transfizierten HEK 293-Zellen, die pRC/CMV, Htt N120-82Q und Htt N171-82Q exprimieren. Caspase 3 und 7-Aktivitäten sind als Relative Licht-Einheiten (RLE) dargestellt. Die Lumineszenz-Daten wurden 48 Stunden nach der Transfektion erstellt ($n = 3$, $**p < 0,01$). **B)** Western Blot Analyse der Zelllysate, welche gleichzeitig für den Luziferase-Assay eingesetzt wurden, unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Um die N-terminale Spaltung bei circa Aminosäure 120 näher zu untersuchen, wurden weitere Stoppmutanten neben Htt N120-82Q, durch Einführung eines Stoppkodons nach Aminosäure 117, 118, 119, 121, 122, und 123 mittels ortsgerichteter Mutagenese, generiert. Alle Stoppmutanten wurden in HEK 293-Zellen exprimiert und ebenfalls im Caspase-Glo[®] 3/7 Assay eingesetzt, um zu untersuchen, ob N-terminale Huntingtin-Proteine, die sich in

ihrer Länge nur in einer C-terminalen Aminosäure unterscheiden, einen Effekt auf die Caspasen 3 und 7-Aktivitäten haben. Keine der Stoppmutanten zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied im Luziferase-Assay verglichen zu Htt N120-82Q (Abb. 24A). Wie Htt N120-82Q haben alle anderen Stoppmutanten mit identischem Polyglutamin-Abschnitt sehr hohe Expressionslevel im Vergleich zu der Mutante Htt N233-82Q Δ 121-122, was mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden konnte (Abb. 24B).

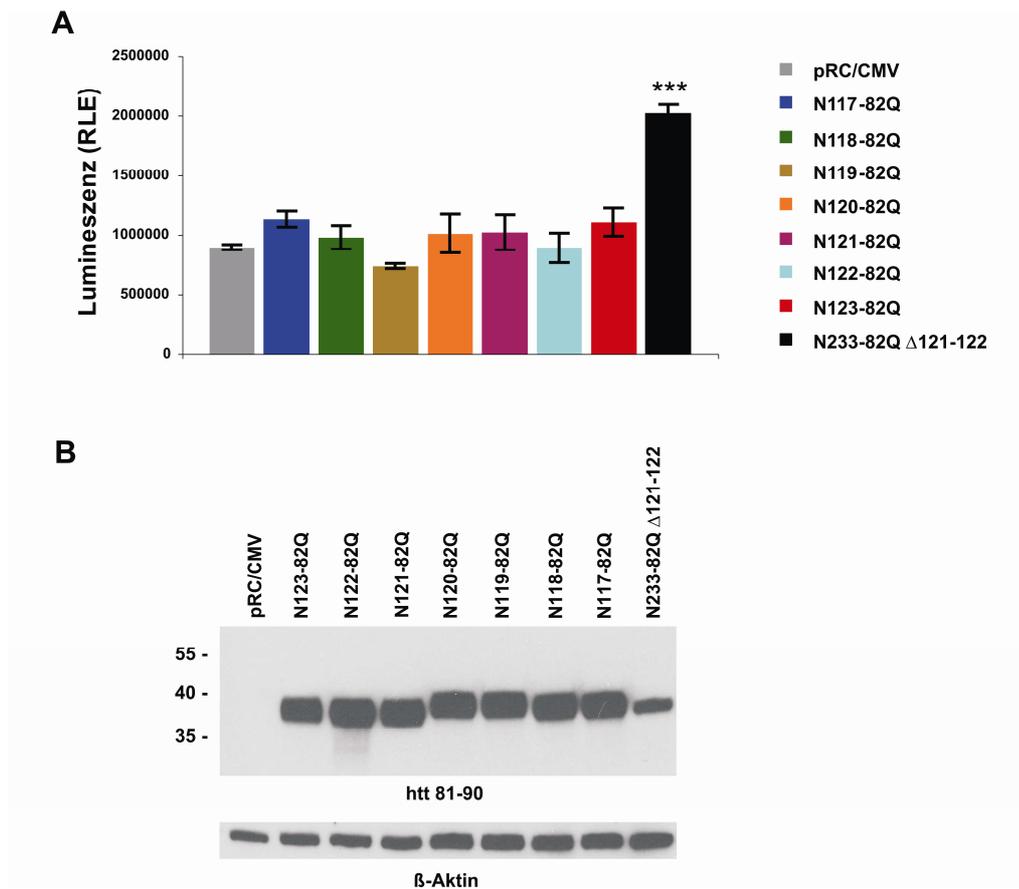


Abbildung 24: Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression N-terminaler Huntingtin-Stoppmutanten. **A)** Caspase 3 und 7-Aktivitäten in transfizierten HEK 293-Zellen, die Htt N117-82Q – Htt N123-82Q und Htt N233-82Q Δ 121-122 exprimieren ($n = 3$, $***p < 0,001$). Die Transfektion von pRC/CMV diente als Kontrolle. Caspase 3 und 7-Aktivitäten sind als Relative Licht-Einheiten (RLE) dargestellt. Die Lumineszenz-Daten wurden 48 Stunden nach der Transfektion erstellt. **B)** Western Blot Analyse der Zelllysate, welche gleichzeitig für den Luziferase-Assay eingesetzt wurden, unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Des Weiteren zeigte die Mutante Htt N233-82Q Δ 116-125, mit einer Reduktion der N-terminalen Spaltung, aber einem hohen Protein-Expressionslevel, anders als die Mutante Htt N233-82Q Δ 121-122 keinen statistisch signifikanten Unterschied in den Caspase 3 und 7-Aktivitäten im Vergleich zu Htt N233-82Q (Abb. 25A, B).

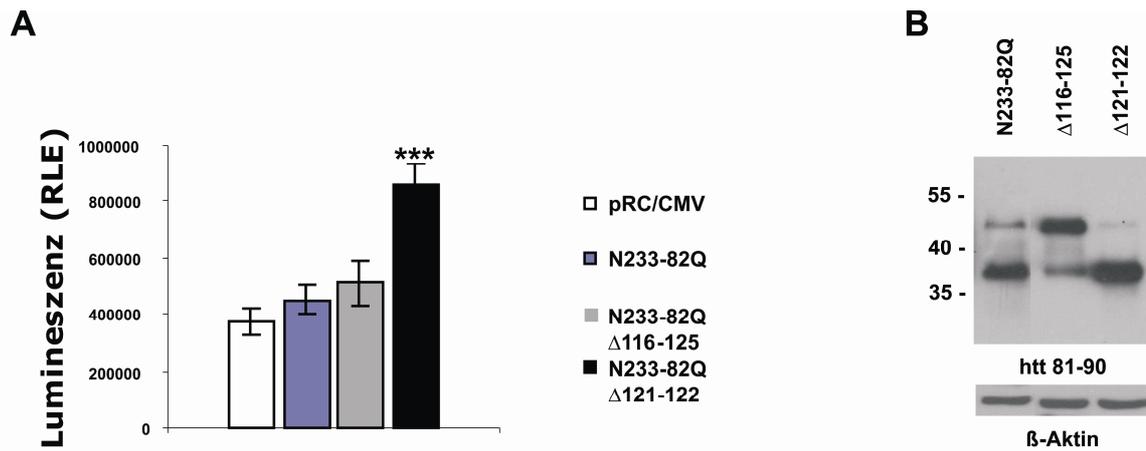


Abbildung 25: Caspase 3 und 7-Aktivitäten nach der Expression mutierter Huntingtin-Proteine. **A)** Caspase 3 und 7-Aktivitäten in transfizierten HEK 293-Zellen, welche Htt N233-82Q und die entsprechenden Mutanten exprimieren. Transfektion von pRC/CMV diente als Kontrolle. Caspase 3 und 7-Aktivitäten sind als Relative Licht-Einheiten (RLE) dargestellt. Die Lumineszenz-Daten wurden 48 Stunden nach der Transfektion erstellt (n = 3, *** $p < 0,001$). **B)** Western Blot Analyse der Zelllysate, welche gleichzeitig für den Luziferase-Assay eingesetzt wurden, unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Durch die Expression verschieden langer Huntingtin-Proteine konnte gezeigt werden, dass nicht alle N-terminalen Huntingtin-Proteine apoptotische Prozesse auslösen. Die Daten zeigen, dass die Expression der ersten 233 Aminosäuren von Huntingtin mit einem pathogenen Polyglutamin-Abschnitt und das entsprechende N-terminale Spaltprodukt allein keine apoptotische Wirkung für HEK 293-Zellen haben. Durch die Mutation Δ 121-122 in Htt N233-82Q mit einer verstärkten Akkumulation des endogen gespaltenen Huntingtin-Fragments wurden nachweislich Effektorcaspase-Aktivitäten erhöht.

Überexprimierte Huntingtin-Proteine mit einer Länge von 117 bis 123 Aminosäuren, was in etwa der Länge des zu untersuchenden N-terminalen Huntingtin-Spaltprodukts entspricht, hatten ebenfalls keinen Effekt auf Effektorcaspase-Aktivitäten, obwohl diese Proteine im Zytoplasma und im Nukleus stark aggregierten. Im Vergleich dazu konnte Htt N171-82Q wiederum Effektorcaspasen aktivieren. Die Resultate zeigen, dass verschieden lange N-terminale Huntingtin-Proteine mit identischem Polyglutamin-Abschnitt ein unterschiedliches Potential für die Verstärkung apoptotischer Prozesse in der Zelle haben.

3.1.7.3 Verschieden lange Huntingtin-Proteine besitzen ein unterschiedliches Potential für Toxizität

In Kapitel 3.1.7.2 konnte gezeigt werden, dass die Expression von Htt N171-82Q im Vergleich zu der Expression des kürzeren Proteins Htt N120-82Q apoptotische Prozesse verstärkt. Um zu untersuchen, ob das Protein Htt N171-82Q, welches im transgenen Mausmodell einen Chorea Huntington-ähnlichen Phänotyp verursacht, in Zellkultur toxisch ist und die Zellviabilität von neuronalen Zellen beeinflusst, wurden N2a-Zellen mit den Konstrukten *htt* N171-82Q, *htt* N120-82Q und dem Kontroll-Vektor pRC/CMV transfiziert, 48 Stunden im Brutschrank inkubiert und die Anzahl der vitalen und toten N2a-Zellen mit der Trypanblau-Methode bestimmt. Nach der Expression von Htt N171-82Q wurde eine Reduktion der Zellvitalität um 14,5 % ($n = 3$, $*p < 0,05$) im Vergleich zur Expression von Htt N120-82Q detektiert (Abb. 26A). Es war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Vitalität von N2a-Zellen erkennbar, welche mit pRC/CMV und *htt* N120-82Q transfiziert wurden. Das Protein Htt N120-82Q ist dementsprechend nicht toxisch. Abbildung 26B zeigt die dazugehörige Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers 1C2 mit vergleichbaren Expressionslevels der Proteine.

Mit der Bestimmung der Vitalität von neuronalen Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der ersten 171 Aminosäuren im Vergleich zu den ersten 120 Aminosäuren von Huntingtin mit identischem Polyglutamin-Abschnitt toxisch ist und eine erhöhte Zelltodrate verursacht.

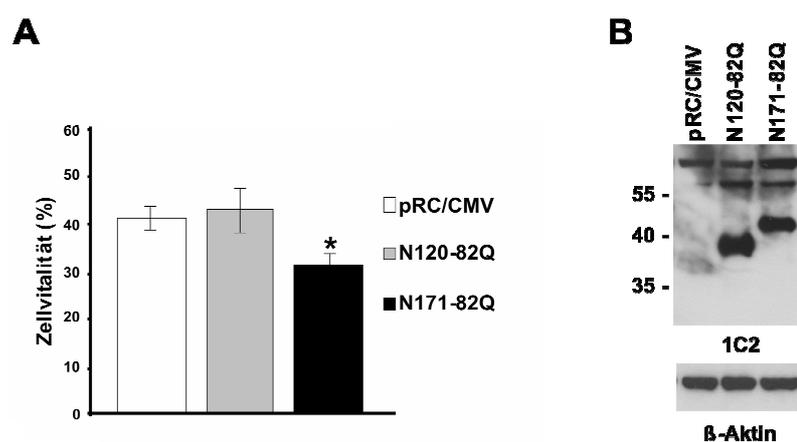


Abbildung 26: Zellvitalität nach der Expression mutierter Huntingtin-Proteine. **A)** Zellvitalität von transfizierten N2a-Zellen, die Htt N120-82Q und Htt N171-82Q exprimieren. Transfektion von pRC/CMV diente als Kontrolle. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit Trypanblau-Färbung auf Vitalität untersucht ($n = 3$, $*p < 0,05$). **B)** Western Blot Analyse der Zelllysate, welche gleichzeitig für die Bestimmung der Zellvitalität eingesetzt wurden, unter Verwendung des Antikörpers 1C2. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.1.7.4 Subzelluläre Lokalisation von verschiedenen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten

Wie bereits in Kapitel 3.1.4.1 und Kapitel 3.1.7.1 beschrieben, sind N-terminale Huntingtin-Fragmente mit einem expandierten Polyglutamin-Abschnitt in der Lage zytoplasmatisch und nukleär zu aggregieren. Es war zu untersuchen, ob die Mutation $\Delta 121-122$ in Htt N233-82Q einen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins hat und die erhöhten Caspase 3 und 7-Aktivitäten möglicherweise mit der Lokalisation von Huntingtin in der Zelle erklärt werden kann. Unter Verwendung des NE-PER[™] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit wurden eine zytosolische (Z) und eine nukleäre (N) Protein-Fraktion 48 Stunden nach der Transfektion von HEK 293-Zellen mit *htt* N233-82Q, *htt* N233-82Q $\Delta 121-122$ und *htt* N120-82Q hergestellt (Abb. 27). Der immunologische Nachweis im Western Blot mit dem Antikörper 1C2 zeigte, dass SDS-lösliche Htt N233-82Q-Proteine mit dem entsprechenden N-terminalen Spaltprodukt im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert sind, wobei das N-terminale Spaltprodukt größtenteils in der zytoplasmatischen Fraktion zu finden war. Durch die Mutation $\Delta 121-122$ verstärkt sich die Spalteffizienz und somit die Generierung des N-terminalen Fragments, was auch in der subzellulären Fraktionierung erkennbar ist. Auch hier ist das Hauptprodukt sowie das entsprechende Spaltprodukt zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert. Es ist im Western Blot erkennbar, dass mehr Spaltprodukt von der Mutante Htt N233-82Q $\Delta 121-122$ als von Htt N233-82Q im Nukleus lokalisiert ist. Eine verstärkte nukleäre Lokalisation von spezifischen Huntingtin-Fragmenten könnte eine Rolle in der Pathogenese von Chorea Huntington spielen, da in vorherigen Studien gezeigt wurde, dass nukleär lokalisiertes Huntingtin-Protein toxisch im Zellkultur- und Maus-Modell ist (Schilling *et al.* 2004, Peters *et al.* 1999, Saudou *et al.* 1998).

Wie zuvor in Kapitel 3.1.7.1 gezeigt, kann Htt N120-82Q zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert sein und Aggregate bilden. Dies konnte durch die zelluläre Fraktionierung bestätigt werden, wobei SDS-lösliche Htt N120-82Q-Proteine in großen Mengen in beiden Kompartimenten zu finden sind. Obwohl Htt N120-82Q in großen Mengen als lösliches Protein oder als Aggregate nukleär lokalisiert ist, konnten keine Effektorcaspase-Aktivitäten wie bei der Mutante Htt N233-82Q $\Delta 121-122$ detektiert werden (siehe Kapitel 3.1.7.2).

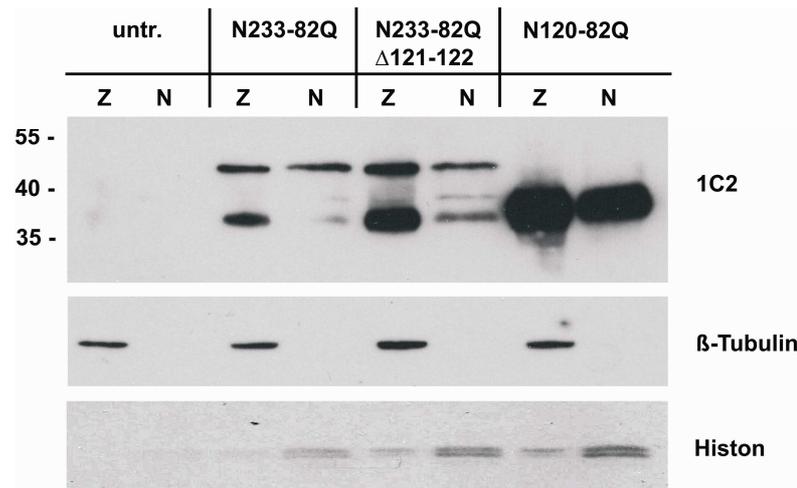


Abbildung 27: Subzelluläre Fraktionierung von transfizierten HEK 293-Zellen. Zytoplasmatische (Z) und nukleäre (N) Fraktionierung von Htt N233-82Q-, Htt N233-82Q Δ121-122- und Htt N120-82Q-exprimierenden HEK 293-Zellen. Immunologischer Nachweis von Huntingtin mit dem Antikörper 1C2. Die Trennung von Zytoplasma und Nucleus wurde durch die Verwendung von β-Tubulin- und Histon-Antikörpern nachgewiesen. Untr. = untransfizierte HEK 293-Zellen.

3.2 Analyse der N-terminalen proteolytischen Prozessierung von Vollängen-Huntingtin im Zellkultur-Modell

3.2.1 Proteolyse von Vollängen-Huntingtin

Es war zu überprüfen, ob das N-terminale Fragment mit einer Länge von circa 120 Aminosäuren auch nach der Expression von Vollängen-Huntingtin generiert wird. Für die Analyse der proteolytischen Prozessierung von Vollängen-Huntingtin wurde das Protein Htt FL-82Q mit einer Gesamtlänge von 3144 Aminosäuren und 82 Glutaminen in HEK 293-Zellen exprimiert. 48 Stunden nach der Transfektion konnte das Vollängen-Huntingtin Protein mit dem Antikörper htt 81-90 im Western Blot immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 28A). Zusätzlich zu der Protein-Hauptbande (roter Pfeil) war ein kleineres Huntingtin-Fragment (schwarzer Pfeil) detektierbar, welches dieselbe Molekularmasse im SDS-Gel wie das N-terminale Fragment von HD-N171-82Q transgenen Mäusen hatte. Nach der Auftrennung des Mausgehirn-Homogenats in der SDS-PAGE waren Aggregate von Huntingtin im Sammelgel zu finden (blauer Pfeil). Ungespaltene Maus HD-N171-82Q-Protein konnte mit dem Antikörper htt 81-90 nicht detektiert werden, da dieses

möglicherweise vollständig prozessiert wurde oder der Antikörper htt 81-90 ist nicht in der Lage das vorhandene Htt N171-82Q-Hauptprodukt in der Maus zu detektieren.

Des Weiteren war nach der Expression von Htt FL-82Q eine zusätzliche schwache Huntingtin-Proteinbande über dem N-terminalen Spaltprodukt bei ungefähr 43 kDa mit dem Antikörper htt 81-90 zu erkennen (grüner Pfeil). Da nach der Expression von Vollängen-Huntingtin zwei kurze N-terminale Huntingtin-Fragmente im Western Blot zu finden waren, wurden diese als Fragment 1 (circa 38 kDa) und Fragment 2 (circa 43 kDa) benannt.

Für eine genauere Untersuchung des Fragments 2 wurden die Proteine im Western Blot parallel mit dem Antikörper htt 115-129 inkubiert. Wie in Abbildung 28B zu erkennen ist, konnte der Antikörper htt 115-129 das Fragment 2, aber nicht das Fragment 1 von Htt FL-82Q und Maus HD-N171-82Q-Protein erkennen, was daraus schließen lässt, dass das Fragment 2 das Huntingtin-Epitop Aminosäure 115-129 besitzt. Zusätzlich konnte der Antikörper htt 115-129 die Huntingtin-Aggregate vom Maus-Homogenat im Sammelgel nicht erkennen, da diese hauptsächlich aus circa 120 Aminosäuren langen, endogen gespaltenen Fragmenten bestehen.

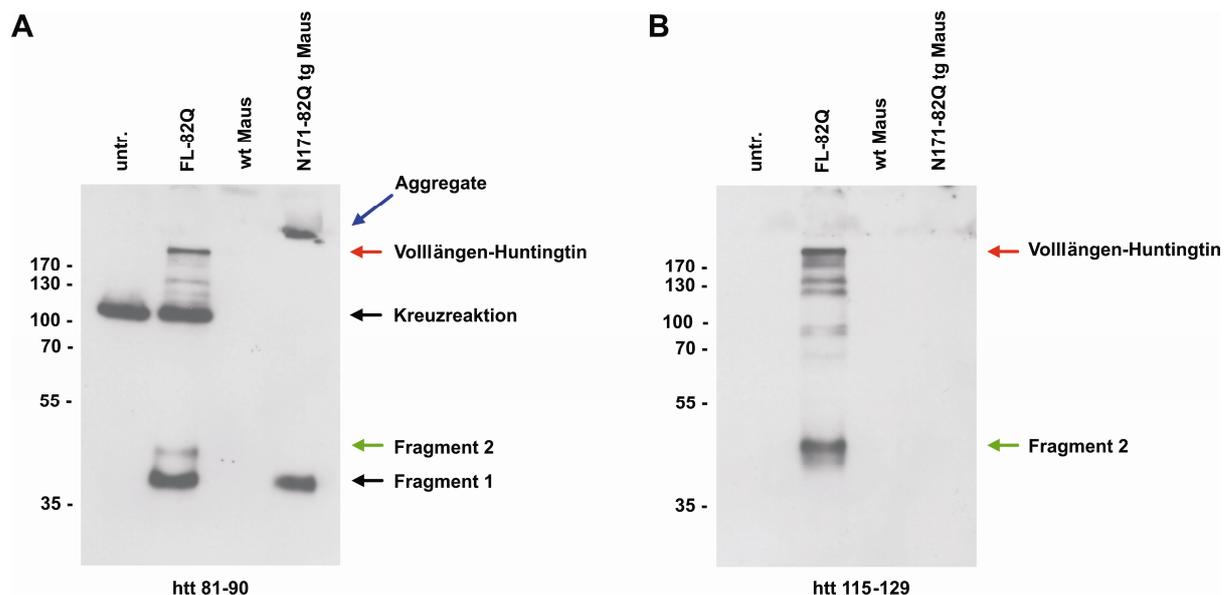


Abbildung 28: Detektion von zwei kurzen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten nach der Expression von Vollängen-Huntingtin. **A)** Mit dem Antikörper htt 81-90 wurden zusätzlich zum Vollängen-Huntingtin (roter Pfeil) zwei N-terminale Huntingtin-Fragmente, Fragment 1 (schwarzer Pfeil) und Fragment 2 (grüner Pfeil), detektiert. Im Maus-Homogenat konnten Huntingtin-Aggregate (blauer Pfeil) nachgewiesen werden. **B)** Der Antikörper htt 115-129 konnte nur das Vollängen-Huntingtin (roter Pfeil) und das Fragment 2 (grüner Pfeil) detektieren. Untr. = untransfizierte HEK 293-Zellen; wt = wildtyp; tg = transgen.

Wesentlich besser konnten beide kurzen N-terminalen Fragmente nach der Transfektion von *htt* FL-82Q im Western Blot mit dem Antikörper *htt* 81-90 detektiert werden, nachdem das SDS-Gel mit 200 μ g anstatt üblichen 70 μ g Htt FL-82Q-Gesamt-Protein beladen wurde (Abb. 29). Das Fragment 1 mit circa 38 kDa (schwarzer Pfeil) hatte dieselbe Mobilität in der SDS-PAGE wie Htt N120-82Q und das Spaltprodukt von Htt N233-82Q. Das Fragment 2 mit circa 43 kDa (grüner Pfeil) lief in der SDS-PAGE tiefer als das Hauptprodukt von Htt N233-82Q und höher als Htt N120-82Q. Somit wird das Fragment 2 durch Proteolyse zwischen Aminosäure 120 und 233 generiert.

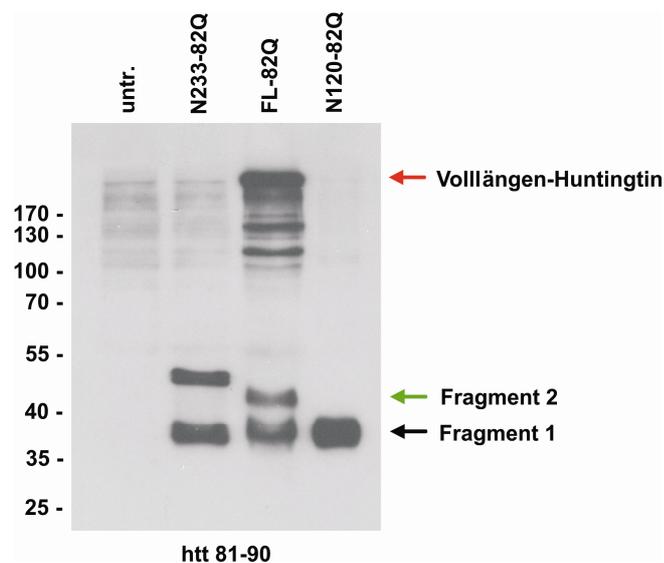


Abbildung 29: Nachweis von zwei kurzen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten in transfizierten HEK 293-Zellen. Immunologische Detektion von zwei kurzen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten (grüner und schwarzer Pfeil) nach der Expression von Htt FL-82Q (roter Pfeil) mit dem Antikörper *htt* 81-90. Das Fragment 1 hat dieselbe Mobilität im SDS-Gel wie Htt N120-82Q und das N-terminale Fragment von Htt N233-82Q. Untr. = untransfizierte HEK 293-Zellen.

Des Weiteren konnten ebenfalls zwei N-terminale Huntingtin-Fragmente in striatalen Zellen der Maus, welche mutiertes Volllängen-Huntingtin mit 111 Glutaminen exprimieren und aus homozygoten *Hdh*^{Q111/Q111} Knock-in Mausembryonen isoliert wurden (Trettel *et al.* 2000), mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden (Abb. 30). Nach kurzer Belichtungszeit konnten zwei N-terminale Huntingtin-Fragmente (schwarzer und grüner Pfeil) mit einer Molekularmasse von circa 45 kDa und 50 kDa mit dem N-terminalen Huntingtin-Antikörper *htt* 81-90 nachgewiesen werden. Eine längere Belichtungszeit führte zur Detektion des Htt FL-82Q Hauptprodukts und den Spaltprodukten (Sterne). Die höheren Molekularmassen der Fragmente in *STHdh*^{Q111}/*Hdh*^{Q111}-Zellen sind auf einen längeren Polyglutamin-Abschnitt (111Q statt 82Q) zurückzuführen. Das Volllängen-Protein konnte in *STHdh*^{Q111}/*Hdh*^{Q111}-

Zellen nicht nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass entweder Vollängen-Huntingtin vollständig proteolytisch prozessiert wurde und nur noch N-terminale Huntingtin-Fragmente in den striatalen Zellen zu finden waren oder dass der Antikörper htt 81-90 nicht in der Lage ist das vorhandene Hauptprodukt in diesen Zellen zu detektieren.

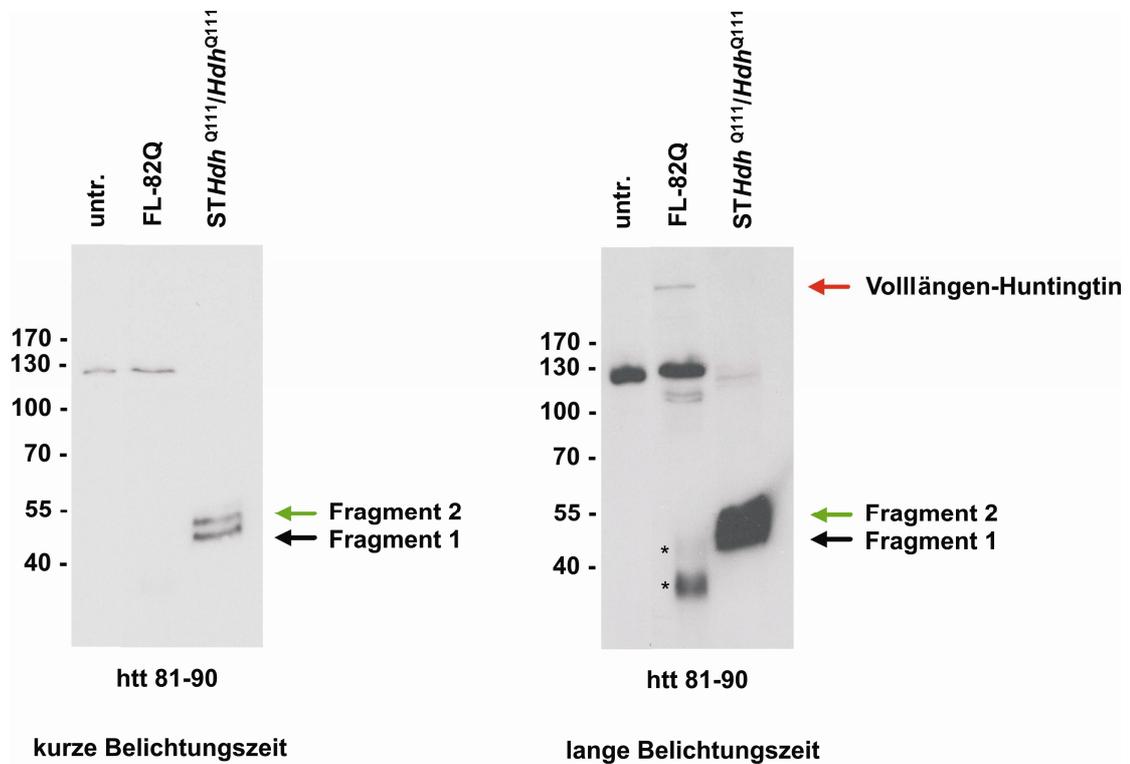


Abbildung 30: N-terminale Spaltung von Vollängen-Huntingtin in striatalen Mauszellen. *STHdh*^{Q111}/*Hdh*^{Q111}-Zellen, die Vollängen-Huntingtin mit 111 Glutaminen exprimieren, zeigen im Western Blot unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90 zwei kurze N-terminale Huntingtin-Fragmente (grüner und schwarzer Pfeil). Nach längerer Belichtungszeit sind die N-terminalen Fragmente (Sterne) von Htt FL-82Q (roter Pfeil) in HEK 293-Zellen nachweisbar. Untr. = untransfizierte HEK 293-Zellen.

Die Daten zeigen, dass nach der Expression von Vollängen-Huntingtin und kurzen Huntingtin-Proteinen mit äquivalentem Polyglutamin-Abschnitt ein identisches N-terminales Spaltprodukt (Fragment 1) generiert wird mit einer Länge von circa 120 Aminosäuren. Ein zweites N-terminales Spaltprodukt (Fragment 2) mit einer errechneten Länge von circa 170 Aminosäuren konnte in Vollängen-Huntingtin-transfizierten HEK 293-Zellen und in striatalen Mauszellen detektiert werden.

3.2.1.1 Analyse der Effektorcaspase-Aktivitäten und Aggregation nach der Expression von mutiertem Vollängen-Huntingtin

Zur Bestimmung der Aktivitäten der Effektorcaspasen 3 und 7 wurde der Caspase-Glo[®] 3/7 Assay verwendet. HEK 293-Zellen wurden mit *htt* FL-82Q-Konstrukten und pRC/CMV als Kontrolle transfiziert. Abbildung 31A zeigt keinen signifikanten Unterschied in den Effektorcaspase-Aktivitäten nach der Expression von Htt FL-82Q im Vergleich zur Kontrolle (n = 3). Somit hat Vollängen-Huntingtin wie beispielsweise Htt N233-82Q keine Apoptose-induzierende Wirkung.

Um Aggregation nach der Expression von Vollängen-Huntingtin mit einem pathogenen Polyglutamin-Abschnitt nachzuweisen, wurde ein Filter-Retardations-Assay durchgeführt. HEK 293-Zelllysate von *htt* FL-82Q-transfizierten Zellen wurde durch eine Celluloseacetatmembran (0,2 µm Porengröße) mittels Vakuum gesaugt und die zurückgehaltenen SDS-unlöslichen Aggregate mit dem Antikörper htt 81-90 detektiert. Es wurden 200 µg, 400 µg und 600 µg Gesamt-Protein des HEK 293-Zellextrakts eingesetzt. Die Verwendung von 600 µg Gesamt-Protein zeigte deutlich das Vorhandensein von Aggregaten nach der Expression von Htt FL-82Q im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 31B).

Um zu untersuchen, ob N-terminale Huntingtin-Fragmente und nicht Vollängen-Huntingtin-Proteine aggregieren, wurde die Mutation AA124-125, welche die Generierung des N-terminalen Fragments 1 stark reduziert, in Htt FL-82Q eingeführt. Nach Normalisierung der Protein-Hauptbanden von Htt FL-82Q und Htt FL-82Q AA124-125 mittels Odyssey Infrared Imaging System wurde die Aggregation mit dem Filter-Retardations-Assay und anschließendem Western Blot analysiert. Abbildung 31C zeigt eine deutliche Reduktion der Aggregation durch die Mutation AA124-125. Ein zellulärer Effekt der Mutation Δ 121-122 in Htt FL-82Q konnte nicht untersucht werden, da das Genprodukt der Mutante Htt FL-82Q Δ 121-122 nicht wie erwartet exprimiert wurde.

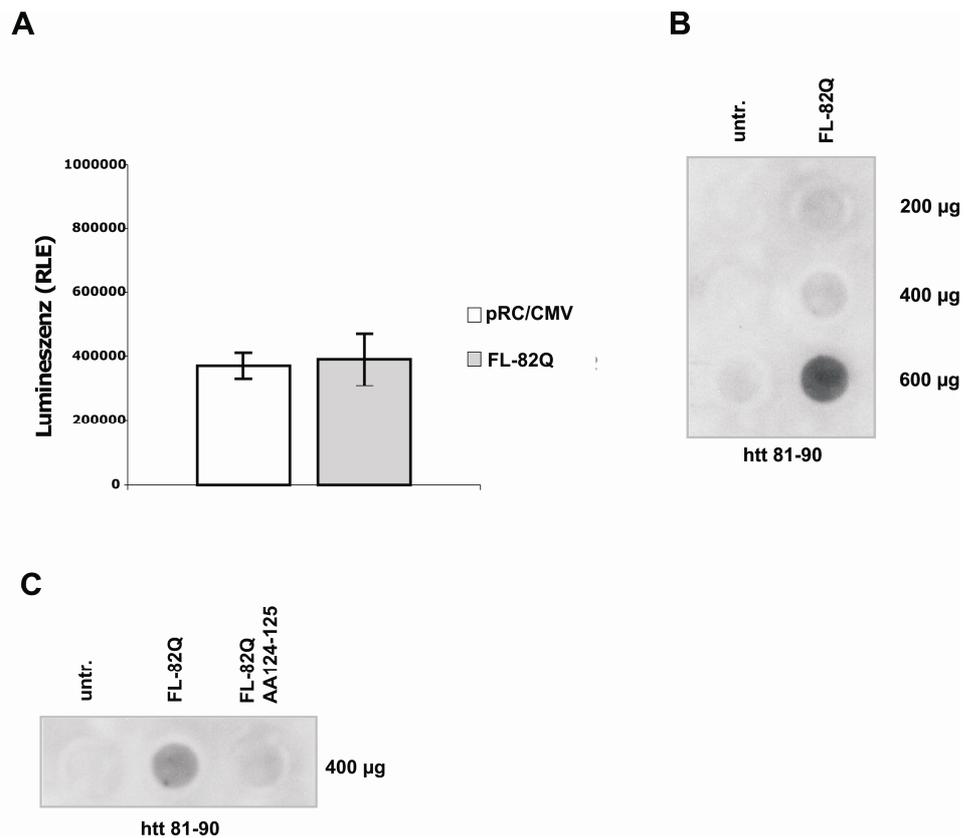


Abbildung 31: Effektorcaspase-Aktivitäten und Aggregation nach der Expression von Vollängen-Huntingtin. **A)** Caspase 3 und 7-Aktivitäten in Htt FL-82Q-exprimierenden HEK 293-Zellen. Transfektion von pRC/CMV diente als Kontrolle. Caspase 3 und 7-Aktivitäten sind als Relative Licht-Einheiten (RLE) dargestellt. Die Lumineszenz-Daten wurden 48 Stunden nach der Transfektion erstellt. **B)** Huntingtin-Aggregation nach der Expression von Htt FL-82Q in transfizierten HEK 293-Zellen wurde mittels Filter-Retardations-Assay und Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90 detektiert. 200 µg, 400 µg und 600 µg Gesamt-Protein wurden aufgetragen. **C)** Huntingtin-Aggregation nach der Expression von Htt FL-82Q und Htt FL-82Q AA124-125 in transfizierten HEK 293-Zellen wurde mittels Filter-Retardations-Assay und Western Blot Analyse unter Verwendung des Antikörpers htt 81-90 detektiert. 400 µg Gesamt-Protein wurden aufgetragen. Untr. = untransfizierte HEK 293-Zellen.

Die Daten lassen darauf schließen, dass die Generierung und Akkumulation von kurzen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten nach der Expression von Vollängen-Huntingtin ein initialer Schritt für die Aggregation von Huntingtin ist. Eine Minderung der N-terminalen Spaltung durch die Mutation AA124-125 verringert die Huntingtin-Aggregation in der Zelle.

3.2.1.2 Subzelluläre Lokalisation von Vollängen-Huntingtin

Wie bereits in Kapitel 3.1.4.1 und Kapitel 3.1.7.4 beschrieben, kann Htt N233-82Q und das entsprechende N-terminale Spaltprodukt im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert sein, in beiden Kompartimenten aggregieren und in Einschlusskörpern immunologisch nachgewiesen

werden. Um die subzelluläre Lokalisation von Vollängen-Huntingtin und dessen N-terminaler Fragmente zu bestimmen, wurden HEK 293-Zellen mit *htt* FL-82Q transfiziert und unter Verwendung des NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit eine zytosolische (Z) und eine nukleäre (N) Protein-Fraktion hergestellt (Abb. 32).

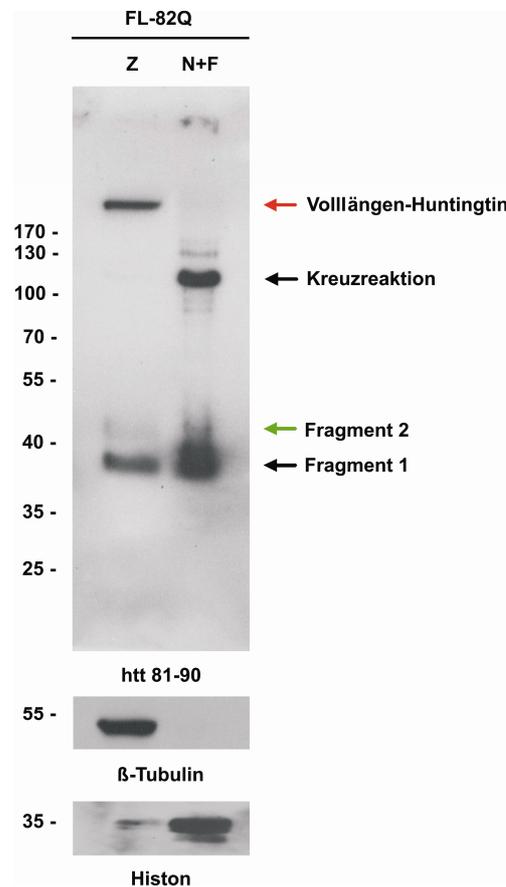


Abbildung 32: Subzelluläre Fraktionierung von Vollängen-Huntingtin-exprimierenden HEK 293-Zellen. Zytoplasmatische (Z) und nukleäre Fraktionierung mit Ameisensäure-Behandlung (N+F) von Htt FL-82Q-exprimierenden Zellen. Immunologischer Nachweis von Vollängen-Huntingtin (roter Pfeil) und kurzen N-terminalen Spaltprodukten (grüner und schwarzer Pfeil) mit dem Antikörper htt 81-90. Die Trennung von Zytoplasma und Nukleus wurde durch die Verwendung von β -Tubulin- und Histon-Antikörpern nachgewiesen.

Das Pellet der nukleären Fraktion wurde direkt mit Ameisensäure behandelt (N+F), um alle Huntingtin-Aggregate zu solubilisieren, da SDS-lösliche N-terminale Fragmente in dieser Fraktion nach der Expression von Htt FL-82Q in sehr geringer Menge vorkamen und per Western Blot Analyse schwer nachweisbar waren. Der immunologische Nachweis im Western Blot mit dem Antikörper htt 81-90 zeigte, dass das Vollängen-Huntingtin-Protein (roter Pfeil) nur im Zytoplasma lokalisiert war. N-terminale Fragmente (grüner und schwarzer Pfeil) konnten in der zytosolischen und nukleären Fraktion detektiert werden.

Die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung konnten mittels Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestätigt werden. COS-7-Zellen wurden mit *htt* FL-82Q-Konstrukten transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Volllängen-Huntingtin konnte mit den Epitop-spezifischen Antikörpern htt 81-90 und htt 1247-1646 (erkennen die Huntingtin-Sequenzen Aminosäure 81-90 und 1247-1646) nachgewiesen werden, wobei Volllängen-Huntingtin diffus als lösliches Protein im Zytoplasma lokalisiert war (Abb. 33 Reihe 1 und 2). Weiterhin konnten nukleäre Einschlüsse, welche aus aggregierten N-terminalen Huntingtin-Fragmenten bestanden und nur mit dem Antikörper htt 81-90 und nicht mit dem Antikörper htt 1247-1646 nachweisbar waren, detektiert werden (Abb. 33 Reihe 2, Pfeil).

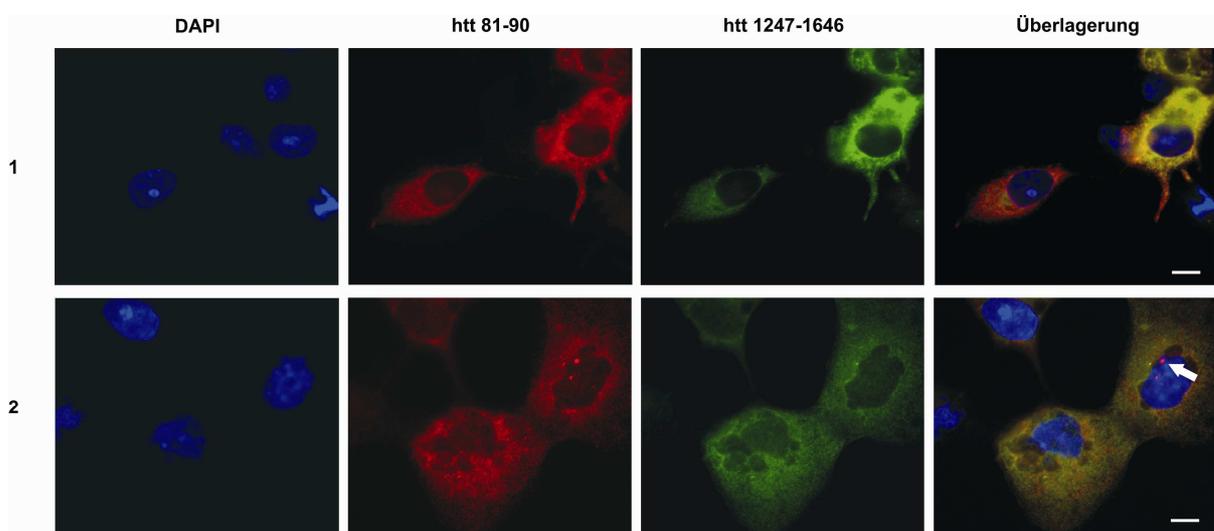


Abbildung 33: Immunfluoreszenz-Analyse von Htt FL-82Q-exprimierenden COS-7-Zellen. Das Epitop Aminosäure 81-90 ist rot, das Epitop Aminosäure 1247-1646 ist grün und der Nukleus ist durch DAPI blau gekennzeichnet. Diffuses und zytoplasmatisch lokalisiertes Volllängen-Huntingtin (Reihe 1 und 2) wurde mit den Antikörpern htt 81-90 und htt 1247-1646 detektiert. Nukleäre Einschlusskörper bestehend aus aggregierten N-terminalen Huntingtin-Fragmenten (Reihe 2, Pfeil) wurden mit dem Antikörper htt 81-90, aber nicht mit dem Antikörper htt 1247-1646 detektiert. Der Maßstab ist 5 µm.

4 Diskussion

4.1 N-terminale Spaltung von Huntingtin

Chorea Huntington ist eine neurodegenerative Erbkrankheit, die durch einen expandierten Polyglutamin-Abschnitt im krankheitsassoziierten Protein Huntingtin verursacht wird. In post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen konnten aggregierte N-terminale Huntingtin-Fragmente im Zytoplasma und Nukleus nachgewiesen werden (DiFiglia *et al.* 1997, Schilling *et al.* 2007, Hoffner *et al.* 2005, Becher *et al.* 1998). Mehrere Studien zeigten, dass N-terminale Huntingtin-Fragmente mit einem expandierten Polyglutamin-Abschnitt ein höheres Aggregationspotential als Vollängen-Huntingtin mit einem expandierten Polyglutamin-Abschnitt haben (Cooper *et al.* 1998, Lunkes & Mandel 1998, Martindale *et al.* 1998, Hackam *et al.* 1998).

N-terminale Huntingtin-Fragmente werden durch proteolytische Prozessierung von Vollängen-Huntingtin generiert, wobei die Spaltung durch verschiedene Caspasen und Calpaine weitestgehend charakterisiert wurde (Wellington *et al.* 2002, Wellington *et al.* 2000, Kim *et al.* 2001, Gafni & Ellerby 2002, Gafni *et al.* 2004, Graham *et al.* 2006). Neben Caspase- und Calpain-generierten Fragmenten mit einer Länge von etwa 500 Aminosäuren wurden kürzere N-terminale Huntingtin-Fragmente mit einer Länge von circa 100-200 Aminosäuren in post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen sowie in verschiedenen Maus- und Zellkultur-Modellen detektiert, welche im Zytoplasma und im Zellkern aggregieren und Einschlusskörper bilden (Li *et al.* 2000, Lunkes *et al.* 2002, DiFiglia *et al.* 1997, Schilling *et al.* 2007, Tanaka *et al.* 2006). Diese kurzen N-terminalen Fragmente sind kaum charakterisiert und werden durch unbekannte Proteasen generiert.

Ziel dieser Arbeit war es, kurze N-terminale Huntingtin-Fragmente mit einer Länge von 120-233 Aminosäuren zu analysieren. Dazu wurden Zellen mit N-terminalen und Vollängen-*huntingtin*-Konstrukten transfiziert und die N-terminale Spaltung untersucht.

In HEK 293-Zellen, die N-terminale Huntingtin-Proteine mit einer Länge von 171 beziehungsweise 233 Aminosäuren exprimierten, konnte ein circa 10 kDa kürzeres Fragment nachgewiesen werden. Dieses N-terminale Fragment wurde unabhängig von der Länge des Polyglutamin-Abschnitts und von der Größe des Huntingtin-Proteins generiert. Diese Ergebnisse sind konform mit der Detektion von N-terminalen Huntingtin-Fragmenten in post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen und Kontrollgehirnen sowie in Gehirnen von

transgenen Mäusen mit normalem und expandiertem Polyglutamin-Abschnitt (Mendel-Mueller *et al.* 2001, Kim *et al.* 2001, Toneff *et al.* 2002, Schilling *et al.* 2007). Aus diesem Grund ist das in dieser Arbeit etablierte Zellkultur-Modell mit der Überexpression von kurzen Huntingtin-Proteinen mit 18 oder 82 Glutaminen für die Analyse der N-terminalen proteolytischen Prozessierung von Huntingtin geeignet.

Nach der Transfektion mit *huntingtin*-Konstrukten zeigten nicht-neuronale und neuronale Zellen dasselbe N-terminale Fragment. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieses Fragment nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* generiert wird. Es ist wahrscheinlich, dass dieselbe Protease in den verschiedenen Zelltypen und in der transgenen Maus für die Spaltung verantwortlich ist, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Spaltung in den unterschiedlichen Zellen und *in vivo* um eine oder wenige Aminosäuren differiert und dies nicht mit Hilfe der Western Blot Analyse nachgewiesen werden kann.

Das N-terminale Fragment konnte mit dem Antikörper htt 81-90 aber nicht mit dem Antikörper htt 115-129 detektiert werden, was auf eine Spaltung nach Aminosäure 90 hinweist. Zusätzlich läuft das Huntingtin-Protein Htt N120-82Q mit derselben Mobilität im SDS-Gel, wie das N-terminale Spaltprodukt von Htt N233-82Q und von dem transgenen Produkt der Mauslinie HD-N171-82Q. Die Daten zeigen, dass endoproteolytische Spaltung von Huntingtin *in vitro* und *in vivo* bei circa Aminosäure 120 stattfindet.

Huntingtin kann eine Struktur aus HEAT-Domänen und PEST-Regionen mittels bioinformatischer Analysen vorausgesagt werden (siehe Kapitel 1.5). Die Spaltregion für die Generierung des N-terminalen Fragments mit circa 120 Aminosäuren kann demzufolge der unstrukturierten und proteolytisch zugänglichen PEST-Region 1, welche sich nach dem Ende des Polyglutamin-Abschnitts bis etwa zur Aminosäure 124 erstreckt, zugeordnet werden.

Das C-terminale Fragment konnte nach der Spaltung nicht mehr im Western Blot detektiert werden, was eine schnelle Degradierung dieses Fragments vermuten lässt. Durch den Besitz des Polyglutamin-Abschnitts könnte das Hauptprodukt und das N-terminale Fragment im Gegensatz zum C-terminalen Fragment schwerer durch den proteasomalen Abbauweg und durch zytoplasmatische Proteasen degradiert werden und somit eine längere Halbwertszeit haben (Holmberg *et al.* 2004, Venkatraman *et al.* 2004, Sarkar & Rubinsztein 2008).

Das in dieser Arbeit beschriebene Fragment, welches nach der Expression von kurzen Huntingtin-Proteinen detektierbar war, ist kürzer als die circa 500 Aminosäuren langen Caspase- und Calpain-generierten Spaltprodukte. Lunkes *et al.* konnten ein kurzes N-terminales Spaltprodukt in post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen und in Zellkultur identifizieren, welches cp-A genannt wurde (Lunkes *et al.* 2002). Cp-A wird zwischen den

Epitopen Aminosäure 1-82 und 115-129 generiert. Das Spaltprodukt cp-A hat eine vergleichbare Größe zu dem in dieser Arbeit detektierten Fragment mit einer Länge von circa 120 Aminosäuren. Ein vergleichbares Fragment konnte ebenfalls in den transgenen Mauslinien HD-N171-82Q/44Q/18Q, in dem induzierbaren Maus-Modell mit der Expression von Vollängen-Huntingtin und 148 Glutaminen sowie in dem knock-in Maus-Modell mit der Expression von Vollängen-Huntingtin und circa 80 Glutaminen detektiert werden (Schilling *et al.* 1999, Li *et al.* 2000, Tanaka *et al.* 2006).

Die Daten aus der hier vorliegenden Arbeit und aus anderen Studien zeigen, dass die Generierung von ähnlichen oder sogar identischen kurzen N-terminalen Fragmenten in verschiedenen Zellsystemen stattfindet.

4.2 Modulation der N-terminalen Spaltung von Huntingtin

Um die Spaltregion näher zu untersuchen, welche für die Generierung des N-terminalen Fragments wichtig ist, wurde eine Mutationsanalyse mit verschiedenen Deletionen und Substitutionen in der putativen Spaltregion durchgeführt. Es konnte keine Mutation identifiziert werden, welche eine Spaltung vollständig verhindert. Es besteht die Möglichkeit, dass Mutationen innerhalb der putativen Spaltregion alternative Spaltstellen generieren und somit immer ein Fragment detektierbar ist. Der Bereich um die Aminosäure 120 scheint wichtig für die Spalteffizienz zu sein, denn die Deletion von Aminosäure 116-125 bewirkte eine starke Reduktion des N-terminalen Spaltprodukts. Es konnten Mutationen innerhalb der putativen Spaltregion identifiziert werden, welche die N-terminale Spaltung reduzieren (AA124-125) oder verstärken (Δ 121-122). Eine spezifische Spaltstelle konnte mit dieser Methode nicht identifiziert werden und es ist nicht geklärt, ob eine oder mehrere Proteasen das Substrat Huntingtin in dem Bereich von Aminosäure 116-125 spalten. Es ist nicht auszuschließen, dass eine spezifische Protease innerhalb dieser Region an mehr als einer Stelle spaltet, wie beispielsweise die γ -Sekretase, die in der Prozessierung des Amyloid-Precursor Proteins (APP) eine Rolle spielt und für die Generierung der Peptide Amyloid-beta 40 (A β 40) und Amyloid-beta 42 (A β 42) bei der Alzheimer Krankheit verantwortlich ist (Mattson 2004). Es könnte auch möglich sein, dass diese Region zugänglich für verschiedene Proteasen ist, die jeweils nach derselben oder nach verschiedenen Aminosäuren spalten. Wird mehr als ein spezifisches Fragment generiert und die einzelnen Fragmente unterscheiden sich nur durch eine oder wenige Aminosäuren in der Fragmentlänge, so können diese nicht im

SDS-Gel separiert und durch Western Blot Analyse als einzelne Banden detektiert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass in verschiedenen Zelltypen ähnliche N-terminale Huntingtin-Fragmente durch unterschiedliche Proteasen generiert werden oder dass diese Fragmente sich in ihrer Länge durch eine oder wenige Aminosäuren im C-terminalen Bereich unterscheiden.

Lunkes *et al.* konnten nach der Deletion von Aminosäure 105-114 die Generierung von cp-A verhindert (Lunkes *et al.* 2002). Um zu überprüfen, ob diese Region eine Rolle in der N-terminalen Spaltung von Huntingtin in HEK 293-Zellen spielt, wurde die Mutation $\Delta 105-114$ in Htt N233-82Q eingeführt. Die Deletion hatte keinen Effekt auf die N-terminale Spaltung und auf die Generation des Huntingtin-Fragments mit circa 120 Aminosäuren. In einer anderen Studie konnte nach der induzierbaren Expression von Vollängen-Huntingtin mit 126 Glutaminen ebenfalls die Generierung des N-terminalen Fragments durch die Deletion von Aminosäure 105-114 nicht beeinflusst werden (Ratovitski *et al.* 2007). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass Lunkes *et al.* Flag-markierte Huntingtin-Proteine exprimierten, was die N-terminale Huntingtin-Spaltung beeinflusst haben könnte (siehe Kapitel 4.3).

Mit Hilfe von Mutationen in der putativen Spaltregion konnte in dieser hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Region Aminosäure 116-125 wichtig für die N-terminale Spaltung von Huntingtin ist. Innerhalb dieser Region konnten Mutationen identifiziert werden, welche die N-terminale Spaltung entweder reduzieren (AA124-125) oder verstärken ($\Delta 121-122$).

4.3 Identifikation der N-terminalen Spaltstelle

Mittels Massenspektrometrie (MS) können Peptid-Fragmente eines zu untersuchenden Proteins analysiert und sequenziert werden. Um das N-terminale Spaltprodukt und dessen C-Terminus zu untersuchen, sollte durch Immunpräzipitation das ungespaltene Huntingtin-Protein und dessen N-terminales Spaltprodukt aufgereinigt, angereichert und für die MS vorbereitet werden. Unter Verwendung verschiedener Immunpräzipitationsprotokolle mit Antikörpern gegen N-terminale Tags und interne Huntingtin-Sequenzen konnten Huntingtin-Proteine aufgereinigt werden. Mittels MS wurden nur Huntingtin-Peptide mit einem N-terminalen Flag-Tag detektiert, da nur durch die Methode der Flag-Immunpräzipitation genügend Huntingtin-Proteine angereichert werden konnten. Da sich aber herausstellte, dass ein N-terminaler Flag-Tag die Proteolyse von Huntingtin negativ beeinflusst, indem er die

N-terminale Spaltung verhindert, was mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden konnte, war es nicht möglich Huntingtin-Peptide des N-terminalen Fragments per MS zu identifizieren (Daten nicht gezeigt). Eine Studie, die Polyglutamin-flankierende Sequenzen untersuchte, konnte eine Modulation der Aggregation und Toxizität durch einen Flag-Tag am Huntingtin-Protein in einem Hefe-Modell nachweisen (Duennwald *et al.* 2006). Polyglutamin-flankierende Sequenzen, wie zum Beispiel N-terminale Tags, können die Konformation des Huntingtin-Proteins ändern und zelluläre Prozesse, wie die Proteolyse und Aggregation des entsprechenden Proteins, beeinflussen. Die Identifikation einer spezifischen Spaltstelle zur Generierung eines cp-A-ähnlichen Fragments durch MS war in der Studie von Ratovitski *et al.* ebenfalls nicht gelungen (Ratovitski *et al.* 2009).

Da das kurze C-terminale Fragment nach der Spaltung nicht detektiert werden konnte, war eine Analyse des N-terminus dieses Fragments durch den Edman-Abbau nicht möglich, um eine Spaltstelle zu identifizieren.

4.4 Zwei N-terminale Huntingtin-Fragmente

Lunkes *et al.* detektierten neben cp-A ein zweites Spaltprodukt, cp-B, was nur zytoplasmatisch lokalisiert war und durch Spaltung zwischen den Epitopen Aminosäure 115-129 und 214-229 generiert wurde (Lunkes *et al.* 2002). Ein vergleichbares Spaltprodukt zu cp-B konnte hier in dem Zellkultur-Modell mit der Expression von kurzen Huntingtin-Proteinen mittels Western Blot Analyse nicht detektiert werden. Aus diesem Grund ist das Zellkultur-Modell mit der Expression von kurzen N-terminalen Huntingtin-Proteinen sehr gut geeignet, um nur ein N-terminales Fragment von Huntingtin genauer zu analysieren ohne den zusätzlichen Effekt eines anderen Fragments.

Um zu untersuchen, ob es ein zweites N-terminales Fragment mit einer vergleichbaren Größe zu cp-B gibt, wurde Vollängen-Huntingtin exprimiert. Mittels Western Blot Analyse konnte hier neben einem cp-A-ähnlichen Fragment auch ein cp-B-ähnliches Fragment detektiert werden. Die Spaltprodukte wurden Fragment 1 und 2 genannt, wobei das Fragment 1 mit einer Länge von circa 120 Aminosäuren identisch zu dem näher analysierten Fragment nach der Expression von kurzen Huntingtin-Proteinen war. Neben der Expression in HEK 293-Zellen konnten diese beiden kurzen N-terminalen Fragmente ebenfalls in striatalen Maus-Neuronen detektiert werden, die Vollängen-Huntingtin mit 111 Glutaminen exprimierten (Abb. 28). Ratovitski *et al.* konnten in HEK 293-Zellen, die N-terminale Huntingtin-Proteine

mit den ersten 511 Aminosäuren exprimierten, ebenfalls ein cp-A- und cp-B-ähnliches Fragment nachweisen (Ratovitski *et al.* 2009). Nur das cp-B-ähnliche Fragment konnte mittels MS analysiert und die Aminosäure 167 als C-terminus dieses spezifischen Fragments identifiziert werden. Die Größe des N-terminalen Fragments von Ratovitski *et al.* ist ähnlich zu dem 43 kDa großen Fragment 2, welches in dieser Arbeit nach der Expression von Vollängen-Huntingtin in HEK 293-Zellen detektiert wurde.

Nach der Expression von Vollängen-Huntingtin mit 82 Glutaminen in HEK 293-Zellen konnten im Western Blot neben den kurzen N-terminalen Fragmenten 1 und 2 weitere Proteinbanden im höhermolekularen Bereich mit den Antikörpern htt 81-90 und htt 115-129 detektiert werden. Caspase- und Calpain-Fragmente mit 82 Glutaminen sollten mit einer Molekularmasse von circa 70-100 kDa im Western Blot nachweisbar sein. Mit dem Antikörper htt 115-129 waren zusätzliche Proteinbanden mit einer möglichen Größe von Caspase- oder Calpain-Fragmenten, welche in der untransfizierten Kontrolle nicht vorkamen, detektierbar. Um diese Fragmente näher zu analysieren und zu bestimmen, ob es sich um spezifische Caspase- oder Calpain-Fragmente handelt, müssten Epitop-spezifische Antikörper eingesetzt werden. Diese Huntingtin-Antikörper sind nur gegen die C-terminale Spaltsequenz eines spezifischen Caspase- oder Calpain-Fragments gerichtet, wie zum Beispiel der Peptid-spezifische Antikörper Neo-htt586 gegen das Caspase-6-Fragment (Ratovitski *et al.* 2007, Wellington *et al.* 2002, Warby *et al.* 2008).

In dieser Arbeit konnten zwei kurze N-terminale Spaltprodukte, welche kürzer sind als die Caspase- und Calpain-Fragmente, nach der Expression von Vollängen-Huntingtin im Western Blot nachgewiesen werden. Diese beiden Huntingtin-Fragmente haben eine Länge von circa 120 und 170 Aminosäuren.

4.5 Zelluläre Einschlusskörper

Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und subzellulärer Fraktionierung konnte nach der Transfektion von *htt* N233-82Q-Konstrukten das kurze N-terminale Fragment mit circa 120 Aminosäuren und das Hauptprodukt mit 233 Aminosäuren nukleär und zytoplasmatisch detektiert werden. Nukleäre Einschlusskörper, bestehend aus aggregierten N-terminalen Huntingtin-Proteinen mit und ohne das Epitop Aminosäure 115-129, waren nachweisbar. Das hier charakterisierte N-terminale Fragment kann dementsprechend im Zellkern aggregieren. Diese Daten bestätigen eine vorherige Studie, die N-terminale Huntingtin-Fragmente ohne das Epitop Aminosäure 115-129 in neuronalen Zellkernen der Großhirnrinde von

Chorea Huntington-Gehirnen und in HD-N171-82Q transgenen Mäusen nachgewiesen hat (Schilling *et al.* 2007). Die nukleäre Lokalisation von spezifischen Fragmenten könnte eine Rolle in der Pathogenese von Chorea Huntington spielen. Unterschiedliche Studien konnten einen Zusammenhang zwischen nukleärer Lokalisation von Huntingtin und der Entstehung von Chorea Huntington nachweisen (Van Raamsdonk *et al.* 2005, Saudou *et al.* 1998, Peters *et al.* 1999, Benn *et al.* 2005, Schilling *et al.* 2004). Mutierte Huntingtin-Fragmente können entweder in löslicher oder aggregierter Form mit wichtigen Regulatoren der Transkription Interaktionen eingehen und diese Proteine auch in Aggregaten sequestrieren (Zhai *et al.* 2005, Li *et al.* 2002, Nucifora *et al.* 2001, Steffan *et al.* 2000, Bae *et al.* 2005). Nicht nur kurze N-terminale Fragmente, wie das in dieser Arbeit analysierte Fragment, können nukleär lokalisiert sein, sondern auch endogen gespaltenes Caspase-6-Fragment, welches nicht nur zytoplasmatisch, sondern auch nukleär generiert werden kann (Warby *et al.* 2008). Endogen gesplattene Caspase-2/3-Fragmente sind im Gegensatz zu endogen gespaltenem Caspase-6-Fragment nur zytoplasmatisch lokalisiert. Endogen gesplattenes Caspase-6-Fragment ist in einem Maus-Modell toxisch und verursacht Neurodegeneration. Das endogen gesplattene Caspase-6-Fragment kann im Vergleich zu exprimierten Caspase-6-Fragment mit 586 Aminosäuren nukleär akkumulieren (Warby *et al.* 2008, Graham *et al.* 2006). Die Lokalisierung von spezifischen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten mit einem expandierten Polyglutamin-Abschnitt scheint sehr wichtig für deren Toxizität zu sein.

4.6 Erhöhte Apoptoserate

Die Mutation $\Delta 121-122$, die eine 2,5-fach verstärkte Spalteffizienz von mutiertem Huntingtin bewirkte, führte zu einer Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol, zu einer erhöhten Aktivität der Caspasen 3 und 7 und zu einer verringerten Zellvitalität nach der Expression der entsprechenden Mutante. Die Expression der ersten 120 Aminosäuren mit einer vergleichbaren Länge zu dem N-terminalen Spaltprodukt hat wiederum keine apoptotische Wirkung, obwohl die Proteinmenge wesentlich höher ist. Es ist daher nicht eindeutig, ob die Aktivierung von apoptotischen Prozessen nach der Expression von Htt N233-82Q $\Delta 121-122$ eine Folge durch die verstärkte Produktion des N-terminalen Fragments oder durch die Mutation $\Delta 121-122$ im Hauptprodukt ist. Da die Expression von Htt N233-82Q und die N-terminale Spaltung ebenfalls nicht Apoptose-induzierend sind, besteht die Möglichkeit,

dass die N-terminale Spaltung von Huntingtin nicht für die Aktivierung von apoptotischen Prozessen verantwortlich ist.

Es wäre möglich, dass Phosphorylierung im N-terminalen Bereich von Huntingtin die Aktivierung von apoptotischen Prozessen und die Spaltung bei circa Aminosäure 120 beeinflusst. Die Mutation $\Delta 121-122$ könnte eventuell die Phosphorylierung in der Region verhindern und somit zu einem apoptotischen Effekt führen bei gleichzeitiger Verstärkung der Huntingtin-Spaltung. Interessanterweise haben in der putativen Spaltregion zwischen Aminosäure 116-125 zwei Serine (Ser116 und Ser120) eine hohe Wahrscheinlichkeit für Phosphorylierung (NetPhos 2.0; > 0.9 score), die aber noch nicht *in vitro* oder *in vivo* bestätigt werden konnte. In vielen neurodegenerativen Erkrankungen spielt die Phosphorylierung des krankheitsverursachenden Proteins eine wichtige Rolle in der Pathogenese (Anne *et al.* 2007, Emamian *et al.* 2003, Chen *et al.* 2003). Huntingtin-Phosphorylierungsstellen konnten mittels MS identifiziert werden und kommen hauptsächlich in den PEST-Sequenzen 2,3 und 4 vor (Schilling *et al.* 2006). Serin 421 von Huntingtin kann durch die Proteinkinase Akt und durch die Serum- und Glucocorticoid-induzierte Kinase (SGK) phosphoryliert werden, was einen toxischen Effekt von mutiertem Huntingtin verhindert (Humbert *et al.* 2002, Pardo *et al.* 2006, Rangone *et al.* 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung an Serin 421 die Akkumulierung des Caspase-6-Fragments in der Zelle reduziert (Warby *et al.* 2009). Eine Phosphorylierung von Serin 434 durch die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) reduziert die Huntingtin-Spaltung durch Caspasen und eine Phosphorylierung von Serin 536 reduziert die Huntingtin-Spaltung durch Calpaine (Luo *et al.* 2005, Schilling *et al.* 2006). Phosphorylierungen von N-terminaleren Huntingtin-Resten wurden bis dato nicht identifiziert. Vorläufige Daten von Mutationen von Serin 116 und Serin 120 in jeweils ein Alanin (phospho-dead) zeigten statistisch signifikant erhöhte Caspase 3 und 7-Aktivitäten in HEK 293-Zellen, welche mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert wurden (Daten nicht gezeigt).

Es ist nicht auszuschließen, dass die Mutation $\Delta 121-122$ die Erkennungssequenz für die Kinase verändert, dadurch eine mögliche Phosphorylierung verhindert wird und folglich die Protease das Substrat Huntingtin besser erkennen und spalten kann. Alternativ könnte das Fragment durch die Mutation $\Delta 121-122$ stabiler sein, so dass mehr von dem N-terminalen Fragment akkumuliert. Ein anderer Grund für die Aktivierung von apoptotischen Prozessen könnte einerseits die spezifische Mutation sein, welche die Konformation des Proteins so ändert, dass es eventuell neue Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen kann oder andererseits könnte durch die Mutation eine neue Spaltstelle entstanden sein, wobei dieses neue

Fragment mit seinem veränderten C-terminus einen apoptotischen Effekt in der Zelle verursacht.

Caspase 3 und 7-Aktivitäten von transfizierten HEK 293-Zellen, welche Htt N120-82Q, Htt N171-82Q, Htt N233-82Q und Htt FL-82Q mit unterschiedlicher Proteinelänge exprimierten, waren nur in Htt N171-82Q-exprimierenden Zellen erhöht. Zusätzlich konnte ein toxischer Effekt von Htt N171-82Q in neuronalen Zellen nachgewiesen werden, da die Zellvitalität nach der Expression vermindert war. HD-N171-82Q transgene Mäuse, welche ebenfalls Htt N171-82Q exprimieren, zeigen intrazelluläre Einschlüsse, apoptotische Neurone und einen krankheitsassoziierten Phänotyp (Yu *et al.* 2003, Schilling *et al.* 1999). Das Protein Htt 171-82Q ist demzufolge *in vivo* und *in vitro* toxisch und kann in Zusammenhang mit der Erkrankung von transgenen Mäusen gebracht werden. Slow *et al.* zeigten, dass die „shortstop“-Maus mit der Expression von 117 Aminosäuren und 120 Glutaminen zelluläre Einschlüsse besitzt, aber keinen Phänotyp mit motorischen Dysfunktionen und Neurodegeneration aufweist (Slow *et al.* 2005). Erhöhte Effektorcaspase-Aktivitäten in HEK 293-Zellen, die Htt N117-82Q exprimierten, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten Yu *et al.* nachweisen, dass in Zellen, die mit unterschiedlich langen *huntingtin*-Konstrukten transfiziert wurden, die erhöhte Aktivität von Caspasen nicht mit der Länge der Huntingtin-Proteine korreliert (Yu *et al.* 2003). Die hier vorliegende Arbeit in Übereinstimmung mit anderen Studien konnte zeigen, dass verschieden lange Huntingtin-Fragmente unterschiedlich apoptotische Prozesse und Toxizität auslösen können und die generelle Hypothese, die besagt je kürzer ein mutiertes Huntingtin-Fragment, desto toxischer ist es revidiert werden muss (Hackam *et al.* 1998).

Weitere Untersuchungen müssen klären, ob verschiedene Zelltypen unterschiedlich auf die Generierung spezifischer N-terminale Fragmente reagieren oder spezifische Fragmente nur in bestimmten Subpopulationen von Neuronen, wie die mittelgroßen bedornten striatalen Neurone („medium spiny neurons“) toxisch sind und eine Rolle in der Degeneration dieser spielen.

Diese hier vorliegenden *in vitro*-Ergebnisse zeigen, dass verschiedene N-terminale Fragmente von Huntingtin mit identischem Polyglutamin-Abschnitt ein unterschiedliches Potential für die Aktivierung von apoptotischen Prozessen und für Toxizität haben und die Länge oder Modifikation des Proteins sowie die darauffolgende 3-dimensionale Struktur eine Rolle spielen könnte. Graham *et al.* konnten ebenfalls nachweisen, dass ein Caspase-6-Fragment von Huntingtin (586 Aminosäuren) gegenüber eines Caspase-3-Fragments (513 oder 552 Aminosäuren) *in vivo* toxisch ist (Graham *et al.* 2006). Die Hypothese, dass spezifische Fragmente ein unterschiedliches Potential für Toxizität haben, konnte schon in der Alzheimer

Krankheit (AD) nachgewiesen werden. Die Spaltung des Amyloid- β -Precursor Proteins durch Proteasen führt unter anderem zur Generierung von A β 42-Fragmenten, welche eine wichtige Rolle in der Neurodegeneration von AD spielen (Iijima *et al.* 2004). Selektive Runterregulierung des A β 42-Fragments und nicht des A β 40-Fragments durch das Nichtsteroid-Analgetika NSAID verbesserte den Phänotyp in AD-Maus-Modellen (Eriksen *et al.* 2003).

Die zelluläre Toxizität von Huntingtin wird hauptsächlich durch die Länge des Polyglutamin-Abschnitts bestimmt, da die Einführung einer mutierten (CAG)_n-Wiederholung in ein nicht-krankheitsassoziiertes Gen einen Chorea-Huntington-ähnlichen Phänotyp in transgenen Mäusen und Apoptose in Zellkultur auslöst (Ordway JM 1997, Sanchez *et al.* 1999). Es ist aber möglich dass Polyglutamin-flankierenden Sequenzen oder deren Modifikation die Neurodegeneration modulieren und zusätzlich andere zelluläre Mechanismen beeinflussen als expandiertes Polyglutamin allein. Durch die Mutation Δ 121-122 könnte Huntingtin zelluläre Wege beeinflussen durch beispielsweise abnormale Proteinbindung. Unterschiedliche Huntingtin-Fragmente könnten verschiedene Formen der Neurodegeneration auslösen, die vom Protein-Kontext abhängig sind. Proteolyse könnte verschiedenste Huntingtin-Fragmente generieren, wobei ein jeweiliges Fragment eine spezifische Form der Neuropathologie von Chorea Huntington herbeiführt. Dies könnte auch die verschiedensten Typen der Neurodegeneration in Chorea Huntington-Gehirnen und Maus-Modellen erklären (Dragunow *et al.* 1995, Thomas *et al.* 1995, Turmaine *et al.* 2000, Yu *et al.* 2003, Portera-Cailliau *et al.* 1995).

N-terminales Huntingtin mit einem expandierten Polyglutamin-Abschnitt kann zytoplasmatisch und nukleär aggregieren und zelluläre Einschlusskörper bilden. Die Expression von Htt N233-82Q Δ 121-122 verstärkt nicht nur die Freisetzung von Cytochrome c ins Zytosol, Effektorcaspase-Aktivitäten und Zelltod, sondern auch die Aggregation von Huntingtin-Fragmenten im Vergleich zu Htt N233-82Q. Umgekehrt konnte eine reduzierte Aggregation detektiert werden, wenn eine Mutante mit reduziertem Spaltprodukt (AA124-125) exprimiert wurde. Da Htt N233-82Q allein schon keine Effektorcaspasen in HEK 293-Zellen aktivierte, konnte bei der Mutante Htt N233-82Q AA124-125 eine Reduktion dieser nicht detektiert werden, trotz Reduktion des Spaltprodukts. Die Expression von Htt N120-82Q ist nicht toxisch im Vergleich zur Expression von Htt N233-82Q Δ 121-122, obwohl das Htt N120-82Q-Protein stark im Nukleus aggregiert und nukleäre Einschlusskörper bildet. Interessanterweise führte die Expression von Htt N233-82Q Δ 121-122 zur Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma bevor zelluläre Einschlusskörper

mikroskopisch detektierbar waren. Diese Daten unterstützen vorherige Studien, die keine Korrelation zwischen Einschlusskörpern mit aggregierten Huntingtin-Fragmenten und zellulärer Toxizität nachweisen konnten (Saudou *et al.* 1998, Arrasate *et al.* 2004, Gutekunst *et al.* 1999, Slow *et al.* 2005). Untersuchungen gaben Hinweise, dass lösliches mutiertes Huntingtin wahrscheinlich toxisch ist. Nagai *et al.* konnten nachweisen, dass fehlgefaltete β -Faltblatt-reiche Polyglutamin-Monomere zytotoxisch für Zellen sind (Nagai *et al.* 2007).

4.7 Mögliche involvierte Proteasen

Die verantwortlichen Proteasen für die Generierung der kurzen N-terminalen Fragmente sind nicht identifiziert. Untersuchungen der N-terminalen Spaltung von Huntingtin in HEK 293-Zellen mittels Protease-Inhibitoren ergaben Hinweise, dass Cysteinproteasen und/oder Aspartylproteasen in der Generierung des Fragments mit circa 120 Aminosäuren involviert sind (Arbeitsgruppe Neurobiologie von Chorea Huntington, Frau Dr. Christina Weisse). Die Protease-Inhibitoren E64-d, MG132, EDTA, EGTA und Pepstatin zeigten eine Reduktion des Spaltprodukts, was mittels Western Blot Analyse detektiert werden konnte. Die Region von Huntingtin zwischen Aminosäure 116-125, welche wichtig für die Generierung des Fragments 1 ist, wurde näher analysiert. Die Datenbank MEROPS fasst alle bisher bekannten Proteasen zur Klassifikation zusammen und kann zur theoretischen Identifikation von putativen Spaltstellen nach Position P1 und vor Position P1' genutzt werden (www.merops.co.uk). Nach sequentieller Eingabe der einzelnen Aminosäuren an die Positionen P1 und P1' konnten mögliche Proteasen identifiziert werden. Zwischen Aminosäure 116-125 könnten möglicherweise Cathepsin D, E und L sowie Calpain 1 und 2 schneiden. Interessanterweise sind diese Proteine Cystein- und Aspartylproteasen und Calpain 1 und 2 zusätzlich Ca^{2+} -abhängig. Diese Daten sind übereinstimmend mit der Reduktion des Fragments durch die eingesetzten Protease-Inhibitoren. Zukünftige Untersuchungen unter Verwendung embryonaler Mausfibroblasten (MEF), defizient für Cathepsin D, L und die kleine Untereinheit von Calpain 1 und 2, sollen zeigen, ob diese Proteasen an der Proteolyse von Huntingtin beteiligt sind.

Lunkes *et al.* testeten den Effekt von Protease-Inhibitoren auf die Generierung der Fragmente cp-A und cp-B in neuronalen NG108-15-Zellen (Lunkes *et al.* 2002). Pepstatin, ein Aspartylprotease-Inhibitor, verhinderte die Generierung von cp-A und cp-B. Kim *et al.* inkubierten Huntingtin-exprimierende, neuronale X57-Zellen mit Cathepsin D, B und L-

Inhibitoren und beobachteten eine Reduktion der Akkumulation von kurzen N-terminalen Huntingtin Fragmenten. Zusätzliche *in vitro*-Assays, in denen Zellaufschlüsse mit der Aspartylprotease Cathepsin D inkubiert wurden, zeigten die Generierung von N-terminalen Fragmenten mit einer ähnlichen Größe wie cp-A und cp-B (Kim *et al.* 2006).

Huntingtin mit einem normalen Polyglutamin-Abschnitt wird, wie andere Proteine, durch das Ubiquitin-Proteasom-System und durch den lysosomalen Abbauweg degradiert. Durch seine Resistenz gegenüber dem Abbau durch das Proteasom akkumuliert mutiertes Huntingtin über die Zeit in der Zelle (Waelter *et al.* 2001). Die Expression von mutiertem Huntingtin induziert Autophagie (Kegel *et al.* 2000, Petersen *et al.* 2001, Ravikumar *et al.* 2002). Huntingtin kann durch lysosomale Proteasen wie Cathepsin D, B und L, die bei einem sauren pH-Wert ihre höchste Aktivität zeigen, *in vitro* abgebaut werden (Kegel *et al.* 2000, Qin *et al.* 2003, Kim *et al.* 2006). Akkumulierung von Huntingtin-immunreaktiven, multivesikulären Organellen in Neuronen von post-mortalen Chorea Huntington-Gehirnen im Vergleich zu Kontrollgehirnen könnte eine Dysfunktion des Endosomalen/lysosomalen Abbauwegs aufzeigen (Sapp *et al.* 1997). Unterschiedliche Stimuli können eine Schädigung von Lysosomen auslösen, wobei die Membran permeabilisiert werden kann und folglich katalytisch aktives Cathepsin D, B und L in das Zytoplasma freigesetzt wird (Guicciardi *et al.* 2004, Kagedal *et al.* 2001, Bidere *et al.* 2003). Cathepsin D-Aktivität im Zytosol kann Apoptose auslösen und bei neutralen pH-Wert Huntingtin spalten (Guicciardi *et al.* 2004, Kim *et al.* 2006). In Endosomen und Lysosomen degradiert Cathepsin L Proteine bei saurem pH-Wert. Gleichzeitig ist Cathepsin L im Zytoplasma sowie im Zellkern aktiv und ist für die Proteolyse von verschiedenen Substraten verantwortlich (Goulet *et al.* 2004, Nagaya *et al.* 1998, Hanisch *et al.* 2003).

Huntingtin wird vermutlich durch Aspartyl- oder Cysteinproteasen im N-terminalen Bereich gespalten, was zur Generierung von kurzen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten führt. Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um die verantwortliche(n) Protease(n) zu identifizieren.

5 Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die N-terminale Proteolyse von Huntingtin in Zellkultur untersucht. Die N-terminale Spaltung von Huntingtin mit einem expandierten Polyglutamin-Abschnitt, die als Voraussetzung für die Aggregation und die Pathogenese in Chorea Huntington angesehen wird, war das Thema dieser Arbeit. Die N-terminalen Spaltung von Huntingtin konnte durch Mutationen in der putativen Spaltregion Aminosäure 116-125 beeinflusst werden und ging mit einer Modulation der Aggregation und Toxizität einher. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass verschieden lange N-terminale Fragmente mit identischem Polyglutamin-Abschnitt ein unterschiedliches Potential für Toxizität haben.

Die experimentellen Resultate dieser Arbeit sollten *in vivo* in einem geeigneten Tier-Modell reproduziert werden. Da vorläufige Daten Hinweise auf eine posttranslationale Modifikation durch mögliche Phosphorylierung in der putativen Spaltregion liefern, was ein Zusammenhang mit der N-terminalen Spaltung bedeuten kann, sollte dies näher untersucht werden. Weitere Erkenntnisse zu spezifischen endogen gespaltenen Fragmenten und deren zellulärer Toxizität *in vivo* sind wichtig in Bezug auf die Pathogenese.

Eine Strukturanalyse von Huntingtin mit normalem oder expandiertem Polyglutamin-Abschnitt durch Proteinkristallisation könnte zum besseren Verständnis der Strukturen führen. Die Identifikation der beteiligten Protease(n) an der Generierung kurzer N-terminaler Fragmente wäre ein großer Vorteil, um die Proteolyse von Huntingtin besser zu verstehen. Spezifische Protease-Inhibitoren zur Unterdrückung der N-terminalen Spaltung könnten dann getestet werden.

Eine Modulation der Spaltung durch bestimmte Moleküle, die das Substrat binden, damit die Protease nicht schneiden kann, konnte schon bei der Alzheimer Krankheit nachgewiesen werden. Moleküle, wie das Tarenflurbil, binden das Amyloid Precursor Protein und modulieren die Spaltung, so dass weniger von den toxischen A β 42-Fragmenten entstehen (Kukar *et al.* 2008). Eine Identifikation von Modulatoren, die N-terminale Proteolyse von Huntingtin unterdrücken, wäre sehr aufschlußreich.

Mutierte Huntingtin-Fragmente können mit Hilfe der Autophagie degradiert werden. Versuche bei denen dieser Abbaumechanismus *in vitro* und *in vivo* gesteigert wurde, zeigten eine eindeutig bessere Klärung von löslichen und aggregierten Huntingtin-Fragmenten im Zytoplasma (Ravikumar *et al.* 2004, Ravikumar *et al.* 2002). Es wäre interessant geeignete Moleküle, welche die Autophagie verstärken und somit die Degradierung von toxischen Huntingtin-Fragmenten fördern, in Patienten testen zu können. Es konnte erst kürzlich in

primären Neuronen und in einem transgenen *C.elegans*-Modell gezeigt werden, dass die Acetylierung von mutiertem Huntingtin an einem Lysin-Rest (K444) die Degradierung durch Makroautophagie fördert (Jeong *et al.* 2009). Eine mögliche posttranslationale Modifikation, wie Acetylierung, von kurzen N-terminalen Huntingtin-Fragmenten bezüglich regulatorischer Mechanismen zur selektiven lysosomalen Degradierung dieser Proteine sollte näher untersucht werden.

6 Literatur

- Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Barnes, G. et al. (1994) Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet*, **20**, 27-38.
- Andrade, M. A. and Bork, P. (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet*, **11**, 115-116.
- Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B. et al. (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet*, **4**, 398-403.
- Anne, S. L., Saudou, F. and Humbert, S. (2007) Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons. *J Neurosci*, **27**, 7318-7328.
- Antonini, A., Leenders, K. L., Spiegel, R. et al. (1996) Striatal glucose metabolism and dopamine D2 receptor binding in asymptomatic gene carriers and patients with Huntington's disease. *Brain*, **119** (Pt 6), 2085-2095.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R. and Finkbeiner, S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, **431**, 805-810.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
- Bae, B. I., Xu, H., Igarashi, S. et al. (2005) p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron*, **47**, 29-41.
- Becher, M. W., Kotzok, J. A., Sharp, A. H., Davies, S. W., Bates, G. P., Price, D. L. and Ross, C. A. (1998) Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. *Neurobiol Dis*, **4**, 387-397.
- Bence, N. F., Sampat, R. M. and Kopito, R. R. (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, **292**, 1552-1555.
- Benn, C. L., Landles, C., Li, H. et al. (2005) Contribution of nuclear and extranuclear polyQ to neurological phenotypes in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **14**, 3065-3078.
- Bennett, E. J., Shaler, T. A., Woodman, B., Ryu, K. Y., Zaitseva, T. S., Becker, C. H., Bates, G. P., Schulman, H. and Kopito, R. R. (2007) Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature*, **448**, 704-708.
- Bidere, N., Lorenzo, H. K., Carmona, S., Laforge, M., Harper, F., Dumont, C. and Senik, A. (2003) Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 31401-31411.

- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Borrell-Pages, M., Zala, D., Humbert, S. and Saudou, F. (2006) Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2642-2660.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Browne, S. E. and Beal, M. F. (2004) The energetics of Huntington's disease. *Neurochem Res*, **29**, 531-546.
- Browne, S. E. and Beal, M. F. (2006) Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 2061-2073.
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., Bird, E. D. and Beal, M. F. (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol*, **41**, 646-653.
- Busch, A., Engemann, S., Lurz, R., Okazawa, H., Lehrach, H. and Wanker, E. E. (2003) Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *J Biol Chem*, **278**, 41452-41461.
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., Dunnett, S. B. and Morton, A. J. (1999) Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*, **19**, 3248-3257.
- Chan, H. Y., Warrick, J. M., Gray-Board, G. L., Paulson, H. L. and Bonini, N. M. (2000) Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in *Drosophila*. *Hum Mol Genet*, **9**, 2811-2820.
- Chen, H. K., Fernandez-Funez, P., Acevedo, S. F. et al. (2003) Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell*, **113**, 457-468.
- Chook, Y. M. and Blobel, G. (1999) Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature*, **399**, 230-237.
- Ciechanover, A. and Brundin, P. (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*, **40**, 427-446.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. and Muller, C. W. (1999) Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature*, **399**, 221-229.
- Cooper, J. K., Schilling, G., Peters, M. F. et al. (1998) Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum Mol Genet*, **7**, 783-790.

- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C. N., Tanese, N. and Krainc, D. (2006) Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, **127**, 59-69.
- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A. et al. (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, **90**, 537-548.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. et al. (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron*, **14**, 1075-1081.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P. and Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, **277**, 1990-1993.
- Dragunow, M., Faull, R. L., Lawlor, P., Beilharz, E. J., Singleton, K., Walker, E. B. and Mee, E. (1995) In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport*, **6**, 1053-1057.
- Duennwald, M. L., Jagadish, S., Muchowski, P. J. and Lindquist, S. (2006) Flanking sequences profoundly alter polyglutamine toxicity in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11045-11050.
- Dunah, A. W., Jeong, H., Griffin, A. et al. (2002) Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science*, **296**, 2238-2243.
- Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R. et al. (1993) Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet*, **4**, 387-392.
- Duyao, M. P., Auerbach, A. B., Ryan, A. et al. (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*, **269**, 407-410.
- Ellerby, L. M., Andrusiak, R. L., Wellington, C. L. et al. (1999a) Cleavage of atrophin-1 at caspase site aspartic acid 109 modulates cytotoxicity. *J Biol Chem*, **274**, 8730-8736.
- Ellerby, L. M., Hackam, A. S., Propp, S. S. et al. (1999b) Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. *J Neurochem*, **72**, 185-195.
- Emamian, E. S., Kaytor, M. D., Duvick, L. A., Zu, T., Tousey, S. K., Zoghbi, H. Y., Clark, H. B. and Orr, H. T. (2003) Serine 776 of ataxin-1 is critical for polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Neuron*, **38**, 375-387.
- Engelender, S., Sharp, A. H., Colomer, V., Tokito, M. K., Lanahan, A., Worley, P., Holzbaur, E. L. and Ross, C. A. (1997) Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet*, **6**, 2205-2212.
- Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Smith, T. E. et al. (2003) NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo. *J Clin Invest*, **112**, 440-449.

- Faber, P. W., Alter, J. R., MacDonald, M. E. and Hart, A. C. (1999) Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 179-184.
- Faber, P. W., Barnes, G. T., Srinidhi, J., Chen, J., Gusella, J. F. and MacDonald, M. E. (1998) Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum Mol Genet*, **7**, 1463-1474.
- Falush, D., Almqvist, E. W., Brinkmann, R. R., Iwasa, Y. and Hayden, M. R. (2001) Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington disease and substantial underascertainment of late-onset cases. *Am J Hum Genet*, **68**, 373-385.
- Ferrante, R. J., Gutekunst, C. A., Persichetti, F., McNeil, S. M., Kowall, N. W., Gusella, J. F., MacDonald, M. E., Beal, M. F. and Hersch, S. M. (1997) Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. *J Neurosci*, **17**, 3052-3063.
- Figueiredo-Pereira, M. E., Berg, K. A. and Wilk, S. (1994) A new inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. *J Neurochem*, **63**, 1578-1581.
- Fink, A. L. (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*, **79**, 425-449.
- Fusco, F. R., Chen, Q., Lamoreaux, W. J. et al. (1999) Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *J Neurosci*, **19**, 1189-1202.
- Gafni, J. and Ellerby, L. M. (2002) Calpain activation in Huntington's disease. *J Neurosci*, **22**, 4842-4849.
- Gafni, J., Hermel, E., Young, J. E., Wellington, C. L., Hayden, M. R. and Ellerby, L. M. (2004) Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem*, **279**, 20211-20220.
- Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pages, M. et al. (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, **118**, 127-138.
- Gervais, F. G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S. et al. (2002) Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1. *Nat Cell Biol*, **4**, 95-105.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-182.
- Goehler, H., Lalowski, M., Stelzl, U. et al. (2004) A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell*, **15**, 853-865.

- Goffredo, D., Rigamonti, D., Tartari, M., De Micheli, A., Verderio, C., Matteoli, M., Zuccato, C. and Cattaneo, E. (2002) Calcium-dependent cleavage of endogenous wild-type huntingtin in primary cortical neurons. *J Biol Chem*, **277**, 39594-39598.
- Goldberg, Y. P., Nicholson, D. W., Rasper, D. M. et al. (1996) Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet*, **13**, 442-449.
- Goldberg, Y. P., Telenius, H. and Hayden, M. R. (1994) The molecular genetics of Huntington's disease. *Curr Opin Neurol*, **7**, 325-332.
- Goulet, B., Baruch, A., Moon, N. S., Poirier, M., Sansregret, L. L., Erickson, A., Bogyo, M. and Nepveu, A. (2004) A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol Cell*, **14**, 207-219.
- Grafton, S. T., Mazziotta, J. C., Pahl, J. J., St George-Hyslop, P., Haines, J. L., Gusella, J., Hoffman, J. M., Baxter, L. R. and Phelps, M. E. (1992) Serial changes of cerebral glucose metabolism and caudate size in persons at risk for Huntington's disease. *Arch Neurol*, **49**, 1161-1167.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Graham, R. K., Deng, Y., Slow, E. J. et al. (2006) Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell*, **125**, 1179-1191.
- Graveland, G. A., Williams, R. S. and DiFiglia, M. (1985) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science*, **227**, 770-773.
- Groves, M. R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A. and Barford, D. (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell*, **96**, 99-110.
- Guicciardi, M. E., Leist, M. and Gores, G. J. (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene*, **23**, 2881-2890.
- Gunawardena, S., Her, L. S., Bruschi, R. G., Laymon, R. A., Niesman, I. R., Gordesky-Gold, B., Sintasath, L., Bonini, N. M. and Goldstein, L. S. (2003) Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron*, **40**, 25-40.
- Gusella, J. F., Persichetti, F. and MacDonald, M. E. (1997) The genetic defect causing Huntington's disease: repeated in other contexts? *Mol Med*, **3**, 238-246.
- Gutekunst, C. A., Levey, A. I., Heilman, C. J., Whaley, W. L., Yi, H., Nash, N. R., Rees, H. D., Madden, J. J. and Hersch, S. M. (1995) Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8710-8714.

- Gutekunst, C. A., Li, S. H., Yi, H. et al. (1999) Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci*, **19**, 2522-2534.
- Hackam, A. S., Singaraja, R., Wellington, C. L., Metzler, M., McCutcheon, K., Zhang, T., Kalchman, M. and Hayden, M. R. (1998) The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *J Cell Biol*, **141**, 1097-1105.
- Hackam, A. S., Yassa, A. S., Singaraja, R. et al. (2000) Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *J Biol Chem*, **275**, 41299-41308.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanisch, F. G., Schwientek, T., Von Bergwelt-Baildon, M. S., Schultze, J. L. and Finn, O. (2003) O-Linked glycans control glycoprotein processing by antigen-presenting cells: a biochemical approach to the molecular aspects of MUC1 processing by dendritic cells. *Eur J Immunol*, **33**, 3242-3254.
- Harjes, P. and Wanker, E. E. (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci*, **28**, 425-433.
- Harper, P. S. (1992) The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet*, **89**, 365-376.
- Hay, D. G., Sathasivam, K., Tobaben, S. et al. (2004) Progressive decrease in chaperone protein levels in a mouse model of Huntington's disease and induction of stress proteins as a therapeutic approach. *Hum Mol Genet*, **13**, 1389-1405.
- Hilt, W. and Wolf, D. H. (2004) The ubiquitin-proteasome system: past, present and future. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1545.
- Hodgson, J. G., Agopyan, N., Gutekunst, C. A. et al. (1999) A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*, **23**, 181-192.
- Hoffner, G., Island, M. L. and Djian, P. (2005) Purification of neuronal inclusions of patients with Huntington's disease reveals a broad range of N-terminal fragments of expanded huntingtin and insoluble polymers. *J Neurochem*, **95**, 125-136.
- Holmberg, C. I., Staniszewski, K. E., Mensah, K. N., Matouschek, A. and Morimoto, R. I. (2004) Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *EMBO J*, **23**, 4307-4318.
- Humbert, S., Bryson, E. A., Cordelieres, F. P., Connors, N. C., Datta, S. R., Finkbeiner, S., Greenberg, M. E. and Saudou, F. (2002) The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell*, **2**, 831-837.
- Huntington, G. (1872) On Chorea. *The Medical and Surgical Reporter: A Weekly Journal*, **26**, 317-321.

- Iijima, K., Liu, H. P., Chiang, A. S., Hearn, S. A., Konsolaki, M. and Zhong, Y. (2004) Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6623-6628.
- Jana, N. R., Tanaka, M., Wang, G. and Nukina, N. (2000) Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum Mol Genet*, **9**, 2009-2018.
- Jenkins, B. G., Koroshetz, W. J., Beal, M. F. and Rosen, B. R. (1993) Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized ¹H NMR spectroscopy. *Neurology*, **43**, 2689-2695.
- Jeong, H., Then, F., Melia, T. J., Jr. et al. (2009) Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell*, **137**, 60-72.
- Kagedal, K., Johansson, U. and Ollinger, K. (2001) The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J*, **15**, 1592-1594.
- Kalchman, M. A., Graham, R. K., Xia, G. et al. (1996) Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem*, **271**, 19385-19394.
- Kalchman, M. A., Koide, H. B., McCutcheon, K. et al. (1997) HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet*, **16**, 44-53.
- Kegel, K. B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J. G., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2000) Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci*, **20**, 7268-7278.
- Kegel, K. B., Sapp, E., Yoder, J. et al. (2005) Huntingtin associates with acidic phospholipids at the plasma membrane. *J Biol Chem*, **280**, 36464-36473.
- Kelly, K. J., Sandoval, R. M., Dunn, K. W., Molitoris, B. A. and Dagher, P. C. (2003) A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, **284**, C1309-1318.
- Kim, Y. J., Sapp, E., Cuiffo, B. G. et al. (2006) Lysosomal proteases are involved in generation of N-terminal huntingtin fragments. *Neurobiol Dis*, **22**, 346-356.
- Kim, Y. J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K. B., Qin, Z. H., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2001) Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12784-12789.
- Klebe, R. J. & Ruddle, F. H. (1969) Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J Cell Biol*, **43**, 69A.

- Kremer, B., Squitieri, F., Telenius, H., Andrew, S. E., Theilmann, J., Spence, N., Goldberg, Y. P. and Hayden, M. R. (1993) Molecular analysis of late onset Huntington's disease. *J Med Genet*, **30**, 991-995.
- Kuemmerle, S., Gutekunst, C. A., Klein, A. M., Li, X. J., Li, S. H., Beal, M. F., Hersch, S. M. and Ferrante, R. J. (1999) Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann Neurol*, **46**, 842-849.
- Kukar, T. L., Ladd, T. B., Bann, M. A. et al. (2008) Substrate-targeting gamma-secretase modulators. *Nature*, **453**, 925-929.
- Lacks, S. A., Springhorn, S. S. and Rosenthal, A. L. (1979) Effect of the composition of sodium dodecyl sulfate preparations on the renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **100**, 357-363.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leavitt, B. R., Guttman, J. A., Hodgson, J. G., Kimel, G. H., Singaraja, R., Vogl, A. W. and Hayden, M. R. (2001) Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am J Hum Genet*, **68**, 313-324.
- Lee, W. C., Yoshihara, M. and Littleton, J. T. (2004) Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3224-3229.
- Leenders, K. L., Frackowiak, R. S., Quinn, N. and Marsden, C. D. (1986) Brain energy metabolism and dopaminergic function in Huntington's disease measured in vivo using positron emission tomography. *Mov Disord*, **1**, 69-77.
- Li, H., Li, S. H., Cheng, A. L., Mangiarini, L., Bates, G. P. and Li, X. J. (1999) Ultrastructural localization and progressive formation of neuropil aggregates in Huntington's disease transgenic mice. *Hum Mol Genet*, **8**, 1227-1236.
- Li, H., Li, S. H., Johnston, H., Shelbourne, P. F. and Li, X. J. (2000) Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat Genet*, **25**, 385-389.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
- Li, S. H., Cheng, A. L., Zhou, H., Lam, S., Rao, M., Li, H. and Li, X. J. (2002) Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol Cell Biol*, **22**, 1277-1287.
- Li, S. H., Hosseini, S. H., Gutekunst, C. A., Hersch, S. M., Ferrante, R. J. and Li, X. J. (1998) A human HAP1 homologue. Cloning, expression, and interaction with huntingtin. *J Biol Chem*, **273**, 19220-19227.
- Li, S. H. and Li, X. J. (1998) Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. *Hum Mol Genet*, **7**, 777-782.

- Li, S. H. and Li, X. J. (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet*, **20**, 146-154.
- Li, W., Serpell, L. C., Carter, W. J., Rubinsztein, D. C. and Huntington, J. A. (2006) Expression and characterization of full-length human huntingtin, an elongated HEAT repeat protein. *J Biol Chem*, **281**, 15916-15922.
- Li, X. J. and Li, S. H. (2005) HAP1 and intracellular trafficking. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 1-3.
- Liu, Y. F., Deth, R. C. and Devys, D. (1997) SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signaling complexes. *J Biol Chem*, **272**, 8121-8124.
- Lunkes, A., Lindenberg, K. S., Ben-Haiem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G. B., Mandel, J. L. and Trottier, Y. (2002) Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell*, **10**, 259-269.
- Lunkes, A. and Mandel, J. L. (1998) A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **7**, 1355-1361.
- Luo, S., Vacher, C., Davies, J. E. and Rubinsztein, D. C. (2005) Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity. *J Cell Biol*, **169**, 647-656.
- Lynch, G., Kramar, E. A., Rex, C. S., Jia, Y., Chappas, D., Gall, C. M. and Simmons, D. A. (2007) Brain-derived neurotrophic factor restores synaptic plasticity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*, **27**, 4424-4434.
- Mangiarini L, S. K., Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, **87**, 493-506.
- Martindale, D., Hackam, A., Wieczorek, A. et al. (1998) Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet*, **18**, 150-154.
- Mattson, M. P. (2000) Apoptotic and anti-apoptotic synaptic signaling mechanisms. *Brain Pathol*, **10**, 300-312.
- Mattson, M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, **430**, 631-639.
- Mattson, M. P. and Duan, W. (1999) "Apoptotic" biochemical cascades in synaptic compartments: roles in adaptive plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res*, **58**, 152-166.

- McGuire, J. R., Rong, J., Li, S. H. and Li, X. J. (2006) Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J Biol Chem*, **281**, 3552-3559.
- McNeil, S. M., Novelletto, A., Srinidhi, J. et al. (1997) Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Hum Mol Genet*, **6**, 775-779.
- Mende-Mueller, L. M., Toneff, T., Hwang, S. R., Chesselet, M. F. and Hook, V. Y. (2001) Tissue-specific proteolysis of Huntingtin (htt) in human brain: evidence of enhanced levels of N- and C-terminal htt fragments in Huntington's disease striatum. *J Neurosci*, **21**, 1830-1837.
- Muchowski, P. J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E. E., Hayer-Hartl, M. K. and Hartl, F. U. (2000) Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7841-7846.
- Myers, R. H., Goldman, D., Bird, E. D., Sax, D. S., Merrill, C. R., Schoenfeld, M. and Wolf, P. A. (1983) Maternal transmission in Huntington's disease. *Lancet*, **1**, 208-210.
- Myers, R. H., Leavitt, J., Farrer, L. A., Jagadeesh, J., McFarlane, H., Mastromauro, C. A., Mark, R. J. and Gusella, J. F. (1989) Homozygote for Huntington disease. *Am J Hum Genet*, **45**, 615-618.
- Nagai, Y., Inui, T., Popiel, H. A., Fujikake, N., Hasegawa, K., Urade, Y., Goto, Y., Naiki, H. and Toda, T. (2007) A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 332-340.
- Nagaya, T., Murata, Y., Yamaguchi, S. et al. (1998) Intracellular proteolytic cleavage of 9-cis-retinoic acid receptor alpha by cathepsin L-type protease is a potential mechanism for modulating thyroid hormone action. *J Biol Chem*, **273**, 33166-33173.
- Nance, M. A. (1997) Genetic testing of children at risk for Huntington's disease. US Huntington Disease Genetic Testing Group. *Neurology*, **49**, 1048-1053.
- Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kusky, J. R. et al. (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*, **81**, 811-823.
- Norremolle, A., Riess, O., Epplen, J. T., Fenger, K., Hasholt, L. and Sorensen, S. A. (1993) Trinucleotide repeat elongation in the Huntingtin gene in Huntington disease patients from 71 Danish families. *Hum Mol Genet*, **2**, 1475-1476.
- Nucifora, F. C., Jr., Sasaki, M., Peters, M. F. et al. (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*, **291**, 2423-2428.
- Ordway JM, T.-G. S., Gutekunst CA, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, Dure LS 4th, Lindsey R, Hersch SM, Jope RS, Albin RL, Detloff PJ. (1997) Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell*, **91**, 753-763.

- Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J. and Greenamyre, J. T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci*, **5**, 731-736.
- Pardo, R., Colin, E., Regulier, E., Aebischer, P., Deglon, N., Humbert, S. and Saudou, F. (2006) Inhibition of calcineurin by FK506 protects against polyglutamine-huntingtin toxicity through an increase of huntingtin phosphorylation at S421. *J Neurosci*, **26**, 1635-1645.
- Passani, L. A., Bedford, M. T., Faber, P. W., McGinnis, K. M., Sharp, A. H., Gusella, J. F., Vonsattel, J. P. and MacDonald, M. E. (2000) Huntingtin's WW domain partners in Huntington's disease post-mortem brain fulfill genetic criteria for direct involvement in Huntington's disease pathogenesis. *Hum Mol Genet*, **9**, 2175-2182.
- Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M. and Finch, J. T. (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5355-5358.
- Peters, M. F., Nucifora, F. C., Jr., Kushi, J., Seaman, H. C., Cooper, J. K., Herring, W. J., Dawson, V. L., Dawson, T. M. and Ross, C. A. (1999) Nuclear targeting of mutant Huntingtin increases toxicity. *Mol Cell Neurosci*, **14**, 121-128.
- Petersen, A., Larsen, K. E., Behr, G. G., Romero, N., Przedborski, S., Brundin, P. and Sulzer, D. (2001) Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet*, **10**, 1243-1254.
- Pillay, C. S., Elliott, E. and Dennison, C. (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J*, **363**, 417-429.
- Portera-Cailliau, C., Hedreen, J. C., Price, D. L. and Koliatsos, V. E. (1995) Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci*, **15**, 3775-3787.
- Qin, Z. H., Wang, Y., Kegel, K. B., Kazantsev, A., Apostol, B. L., Thompson, L. M., Yoder, J., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2003) Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum Mol Genet*, **12**, 3231-3244.
- Rangone, H., Poizat, G., Troncoso, J., Ross, C. A., MacDonald, M. E., Saudou, F. and Humbert, S. (2004) The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin. *Eur J Neurosci*, **19**, 273-279.
- Ratovitski, T., Gucek, M., Jiang, H. et al. (2009) Mutant Huntingtin N-terminal Fragments of Specific Size Mediate Aggregation and Toxicity in Neuronal Cells. *J Biol Chem*, **284**, 10855-10867.
- Ratovitski, T., Nakamura, M., D'Ambola, J. et al. (2007) N-terminal proteolysis of full-length mutant huntingtin in an inducible PC12 cell model of Huntington's disease. *Cell Cycle*, **6**, 2970-2981.

- Ravikumar, B., Duden, R. and Rubinsztein, D. C. (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet*, **11**, 1107-1117.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z. et al. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*, **36**, 585-595.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S. W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, **21**, 267-271.
- Ridley, R. M., Frith, C. D., Crow, T. J. and Conneally, P. M. (1988) Anticipation in Huntington's disease is inherited through the male line but may originate in the female. *J Med Genet*, **25**, 589-595.
- Rigamonti, D., Bauer, J. H., De-Fraja, C. et al. (2000) Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci*, **20**, 3705-3713.
- Rigamonti, D., Bolognini, D., Mutti, C., Zuccato, C., Tartari, M., Sola, F., Valenza, M., Kazantsev, A. G. and Cattaneo, E. (2007) Loss of huntingtin function complemented by small molecules acting as repressor element 1/neuron restrictive silencer element silencer modulators. *J Biol Chem*, **282**, 24554-24562.
- Ross, C. A. (1995) When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. *Neuron*, **15**, 493-496.
- Ross, C. A., Becher, M. W., Colomer, V., Engelender, S., Wood, J. D. and Sharp, A. H. (1997) Huntington's disease and dentatorubral-pallidoluysian atrophy: proteins, pathogenesis and pathology. *Brain Pathol*, **7**, 1003-1016.
- Ross, C. A. and Poirier, M. A. (2005) Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 891-898.
- Rousseau, E., Kojima, R., Hoffner, G., Djian, P. and Bertolotti, A. (2009) Misfolding of proteins with a polyglutamine expansion is facilitated by proteasomal chaperones. *J Biol Chem*, **284**, 1917-1929.
- Roy, S., Bayly, C. I., Gareau, Y. et al. (2001) Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6132-6137.
- Sambrook, J. and Gething, M. J. (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*, **342**, 224-225.
- Sanberg, P. R. and Coyle, J. T. (1984) Scientific approaches to Huntington's disease. *CRC Crit Rev Clin Neurobiol*, **1**, 1-44.
- Sanchez, I., Xu, C. J., Juo, P., Kakizaka, A., Blenis, J. and Yuan, J. (1999) Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron*, **22**, 623-633.

- Sapp, E., Schwarz, C., Chase, K., Bhide, P. G., Young, A. B., Penney, J., Vonsattel, J. P., Aronin, N. and DiFiglia, M. (1997) Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol*, **42**, 604-612.
- Sarkar, S. and Rubinsztein, D. C. (2008) Huntington's disease: degradation of mutant huntingtin by autophagy. *FEBS J*, **275**, 4263-4270.
- Sasaki, T., Kishi, M., Saito, M., Tanaka, T., Higuchi, N., Kominami, E., Katunuma, N. and Murachi, T. (1990) Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins. *J Enzyme Inhib*, **3**, 195-201.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. and Greenberg, M. E. (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, **95**, 55-66.
- Sawa, A., Wiegand, G. W., Cooper, J., Margolis, R. L., Sharp, A. H., Lawler, J. F., Jr., Greenamyre, J. T., Snyder, S. H. and Ross, C. A. (1999) Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat Med*, **5**, 1194-1198.
- Schilling, B., Gafni, J., Torcassi, C. et al. (2006) Huntingtin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. Modulation of cleavage and toxicity. *J Biol Chem*, **281**, 23686-23697.
- Schilling, G., Becher, M. W., Sharp, A. H. et al. (1999) Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet*, **8**, 397-407.
- Schilling, G., Klevytska, A., Tebbenkamp, A. T. et al. (2007) Characterization of huntingtin pathologic fragments in human Huntington disease, transgenic mice, and cell models. *J Neuropathol Exp Neurol*, **66**, 313-320.
- Schilling, G., Savonenko, A. V., Klevytska, A. et al. (2004) Nuclear-targeting of mutant huntingtin fragments produces Huntington's disease-like phenotypes in transgenic mice. *Hum Mol Genet*, **13**, 1599-1610.
- Sharp, A. H., Loev, S. J., Schilling, G. et al. (1995) Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron*, **14**, 1065-1074.
- Sieradzan, K. A., Mehan, A. O., Jones, L., Wanker, E. E., Nukina, N. and Mann, D. M. (1999) Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. *Exp Neurol*, **156**, 92-99.
- Singaraja, R. R., Hadano, S., Metzler, M. et al. (2002) HIP14, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. *Hum Mol Genet*, **11**, 2815-2828.
- Sittler, A., Walter, S., Wedemeyer, N., Hasenbank, R., Scherzinger, E., Eickhoff, H., Bates, G. P., Lehrach, H. and Wanker, E. E. (1998) SH3GL3 associates with the Huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polyglu-containing protein aggregates. *Mol Cell*, **2**, 427-436.

- Slow, E. J., Graham, R. K., Osmand, A. P. et al. (2005) Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11402-11407.
- Snell, R. G., MacMillan, J. C., Cheadle, J. P. et al. (1993) Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet*, **4**, 393-397.
- Steffan, J. S., Agrawal, N., Pallos, J. et al. (2004) SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science*, **304**, 100-104.
- Steffan, J. S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O. et al. (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6763-6768.
- Stine, O. C., Pleasant, N., Franz, M. L., Abbott, M. H., Folstein, S. E. and Ross, C. A. (1993) Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Hum Mol Genet*, **2**, 1547-1549.
- Strand, A. D., Baquet, Z. C., Aragaki, A. K. et al. (2007) Expression profiling of Huntington's disease models suggests that brain-derived neurotrophic factor depletion plays a major role in striatal degeneration. *J Neurosci*, **27**, 11758-11768.
- Sugars, K. L. and Rubinsztein, D. C. (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet*, **19**, 233-238.
- Sun, B., Fan, W., Balciunas, A. et al. (2002) Polyglutamine repeat length-dependent proteolysis of huntingtin. *Neurobiol Dis*, **11**, 111-122.
- Szebenyi, G., Morfini, G. A., Babcock, A. et al. (2003) Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport. *Neuron*, **40**, 41-52.
- Takahashi, T., Kikuchi, S., Katada, S., Nagai, Y., Nishizawa, M. and Onodera, O. (2008) Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet*, **17**, 345-356.
- Takano, H. and Gusella, J. F. (2002) The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF- κ B/Rel/dorsal family transcription factor. *BMC Neurosci*, **3**, 15.
- Tallaksen-Greene, S. J., Crouse, A. B., Hunter, J. M., Detloff, P. J. and Albin, R. L. (2005) Neuronal intranuclear inclusions and neuropil aggregates in HdhCAG(150) knockin mice. *Neuroscience*, **131**, 843-852.
- Tanaka, Y., Igarashi, S., Nakamura, M. et al. (2006) Progressive phenotype and nuclear accumulation of an amino-terminal cleavage fragment in a transgenic mouse model with inducible expression of full-length mutant huntingtin. *Neurobiol Dis*, **21**, 381-391.
- Tarlac, V. and Storey, E. (2003) Role of proteolysis in polyglutamine disorders. *J Neurosci Res*, **74**, 406-416.

- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A. and Katzman, R. (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, **30**, 572-580.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, **72**, 971-983.
- Thomas, L. B., Gates, D. J., Richfield, E. K., O'Brien, T. F., Schweitzer, J. B. and Steindler, D. A. (1995) DNA end labeling (TUNEL) in Huntington's disease and other neuropathological conditions. *Exp Neurol*, **133**, 265-272.
- Tompkins, M. M. and Hill, W. D. (1997) Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. *Brain Res*, **775**, 24-29.
- Toneff, T., Mende-Mueller, L., Wu, Y., Hwang, S. R., Bunday, R., Thompson, L. M., Chesselet, M. F. and Hook, V. (2002) Comparison of huntingtin proteolytic fragments in human lymphoblast cell lines and human brain. *J Neurochem*, **82**, 84-92.
- Trettel, F., Rigamonti, D., Hilditch-Maguire, P., Wheeler, V. C., Sharp, A. H., Persichetti, F., Cattaneo, E. and MacDonald, M. E. (2000) Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Hum Mol Genet*, **9**, 2799-2809.
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G. et al. (1995a) Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet*, **10**, 104-110.
- Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin, G. et al. (1995b) Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, **378**, 403-406.
- Trushina, E., Dyer, R. B., Badger, J. D., 2nd et al. (2004) Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*, **24**, 8195-8209.
- Turmaine, M., Raza, A., Mahal, A., Mangiarini, L., Bates, G. P. and Davies, S. W. (2000) Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8093-8097.
- Van Raamsdonk, J. M., Murphy, Z., Slow, E. J., Leavitt, B. R. and Hayden, M. R. (2005) Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet*, **14**, 3823-3835.
- Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N. and Goldberg, A. L. (2004) Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell*, **14**, 95-104.
- Verhoef, L. G., Lindsten, K., Masucci, M. G. and Dantuma, N. P. (2002) Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet*, **11**, 2689-2700.
- Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Gorlich, D. and Wittinghofer, A. (1999) Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell*, **97**, 635-646.

- Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 1015-1068.
- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D. and Richardson, E. P., Jr. (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, **44**, 559-577.
- Waelter, S., Boeddrich, A., Lurz, R., Scherzinger, E., Lueder, G., Lehrach, H. and Wanker, E. E. (2001) Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell*, **12**, 1393-1407.
- Wanderer, J. and Morton, A. J. (2007) Differential morphology and composition of inclusions in the R6/2 mouse and PC12 cell models of Huntington's disease. *Histochem Cell Biol*, **127**, 473-484.
- Warby, S. C., Doty, C. N., Graham, R. K., Carroll, J. B., Yang, Y. Z., Singaraja, R. R., Overall, C. M. and Hayden, M. R. (2008) Activated caspase-6 and caspase-6-cleaved fragments of huntingtin specifically colocalize in the nucleus. *Hum Mol Genet*.
- Warby, S. C., Doty, C. N., Graham, R. K., Shively, J., Singaraja, R. R. and Hayden, M. R. (2009) Phosphorylation of huntingtin reduces the accumulation of its nuclear fragments. *Mol Cell Neurosci*, **40**, 121-127.
- Wellington, C. L., Ellerby, L. M., Gutekunst, C. A. et al. (2002) Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci*, **22**, 7862-7872.
- Wellington, C. L., Ellerby, L. M., Hackam, A. S. et al. (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem*, **273**, 9158-9167.
- Wellington, C. L., Singaraja, R., Ellerby, L. et al. (2000) Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *J Biol Chem*, **275**, 19831-19838.
- Wexler, N. S., Young, A. B., Tanzi, R. E. et al. (1987) Homozygotes for Huntington's disease. *Nature*, **326**, 194-197.
- Weydt, P., Pineda, V. V., Torrence, A. E. et al. (2006) Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab*, **4**, 349-362.
- Wheeler, V. C., White, J. K., Gutekunst, C. A. et al. (2000) Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet*, **9**, 503-513.
- White, J. K., Auerbach, W., Duyao, M. P., Vonsattel, J. P., Gusella, J. F., Joyner, A. L. and MacDonald, M. E. (1997) Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat Genet*, **17**, 404-410.

- Xia, J., Lee, D. H., Taylor, J., Vandelft, M. and Truant, R. (2003) Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum Mol Genet*, **12**, 1393-1403.
- Yan, X. X., Najbauer, J., Woo, C. C., Dashtipour, K., Ribak, C. E. and Leon, M. (2001) Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. *J Comp Neurol*, **433**, 4-22.
- Yanai, A., Huang, K., Kang, R. et al. (2006) Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nat Neurosci*, **9**, 824-831.
- Young, J. E., Gouw, L., Propp, S. et al. (2007) Proteolytic cleavage of ataxin-7 by caspase-7 modulates cellular toxicity and transcriptional dysregulation. *J Biol Chem*, **282**, 30150-30160.
- Yu, Z. X., Li, S. H., Evans, J., Pillarisetti, A., Li, H. and Li, X. J. (2003) Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *J Neurosci*, **23**, 2193-2202.
- Yu, Z. X., Li, S. H., Nguyen, H. P. and Li, X. J. (2002) Huntingtin inclusions do not deplete polyglutamine-containing transcription factors in HD mice. *Hum Mol Genet*, **11**, 905-914.
- Zeitlin, S., Liu, J. P., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E. and Efstratiadis, A. (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet*, **11**, 155-163.
- Zhai, W., Jeong, H., Cui, L., Krainc, D. and Tjian, R. (2005) In vitro analysis of huntingtin-mediated transcriptional repression reveals multiple transcription factor targets. *Cell*, **123**, 1241-1253.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D. et al. (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*, **293**, 493-498.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A. et al. (2003) Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet*, **35**, 76-83.
- Zuhlke, C., Riess, O., Schroder, K., Siedlaczek, I., Epplen, J. T., Engel, W. and Thies, U. (1993) Expansion of the (CAG)_n repeat causing Huntington's disease in 352 patients of German origin. *Hum Mol Genet*, **2**, 1467-1469.

Anhang

Huntingtin-Sequenzen

Htt N120-18Q

MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPPPQLPQPPPQAQPLLQP
QPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNS

Htt N120-82Q

MATLEKLMKAFESLKSFQQ
QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPPPQLPQPPPQAQPLLQP
QPQPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNS

Htt N171-18Q

MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPPPQLPQPPPQAQPLLQP
QPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGI
AMELFLLCSDDAESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRLQLE

Htt N171-18Q-myc

MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPPPQLPQPPPQAQPLLQP
QPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGI
AMELFLLCSDDAESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRLQLEHASRGSEQKLI**SEEDL**

Htt N171-82Q

MATLEKLMKAFESLKSFQQ
QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPPPQLPQPPPQAQPLLQP
QPQPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLL
GIAMELFLLCSDDAESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRLQLE

Htt N233-18Q

MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPPPQLPQPPPQAQPLLQP
QPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGI
AMELFLLCSDDAESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRLQLELYKEIKKNGAPRSLRAALWR
FAELAHLVRPQKCRPYLVNLLPCLTRTSKRPEESVQETLAA

ETLAEIDFRLVSVFLEAKAENLHRGAHHTYGLLKLQERVLNNVVIHLLGDEDPRVRHVAAASL
IRLVPKLFYKCDQGQADPVVAVARDQSSVYLKLLMHETQPPSHFSVSTITRIYRGYNLLPSI
TDVTMENNLSRVIAAVSHELITSTTRALTFGCCEALCLLSTAFPVCIWSLGWHCVPPLSAS
DESRKSCVTGMATMILTLLSSAWFPLDLSAHQDALILAGNLLAASAPKSLRSSWASEEEANP
AATKQEEVWPALGDRALVPMVEQLFSHLLKVINICAHVLDDVAPGPAIKAALPSLTNPPLSLS
PIRRKGKEKEPEGEQASVPLSPKKGSEASAASRQSDTSGPVTTSSKSSSLGSFYHLPSYLRHD
VLKATHANYKVTLDLQNSTEFKGGFLRSALDVLSQLILELATLQDIGKCVEEILGYLKSCFSR
EPMMATVCVQQLLKTFLGTNLASQFDGLSSNPSKSSQGRAQLGSSSVRPGLYHYCFMAYTH
FTQALADASLRNMVQAEQENDTSGWFDVLQKVSTQLKTNLTSVTKNRADKNAIHNRHRLFEP
LVIKALKQYTTTTTCVQLQKQVLDLLAQLVQLRVNYCLLDSQVFIGFVLKQFEYIEVGQFRE
SEAIIPNIFFFLVLLSYERYHKSQIIGIPKIIQLCDGIMASGRKAVTHAIPALQPIVHDLFV
LRGTNKADAGKELETQKEVVSMMLRLIQYHQVLEMFILVLQQCHKENEDKWKRLSRQIADI
ILPMLAKQQMHIDSHEALGVLNLTLEILAPSSLRPVDMLLRSMFVTPNTMASVSTVQLWISG
ILAILRVLISQSTEDIVLSRIQELSFSPYLISCTVINRLRDGDSTSTLEEHSSEKQIKNLPE
ETFSRFLQLVGLLEDIVTKQLKVMSEQQHTFYCQELGTLMLCLIHIFKSGMFRRITAAA
TRLFRSDGCGGSFYTLDSLNLRARSMITTHPALVLLWCQILLLVNHTDYRWVAEVQQTPKRH
SLSSTKLLSPQMSGEEEDSDLAAKLGMCNREIVRRGALILFCDYVCQNLHDSEHLTWLIVNH
IQDLISLSHEPPVQDFISAVHRNSAASGLFIQAIQSRCENLSTPTMLKKTLCLEGIHLSQS
GAVLTLYVDRLLCTPFRVLARMVDILACRRVEMLLAANLQSSMAQLPMEELNRIQEYLQSSG
LAQRHQRLYSLLDRFRLSTMQDSLSPSPVSSHPLDGDGHVSLETVSPDKDWYVHLVKSQCW
TRSDSALLEGAELVNRIPAEDMNAFMNSEFNLSLLAPCLSLGMSEISGGQKSALFEAAREV
TLARVSGTVQQLPAVHHVFQPELPAEPAAAYWSKLNLDLFGDAALYQSLPTLARALAQYLVVVS
KLPSHLHLPEKEKDIVKFVVATLEALSWHLIHEQIPLSLDLQAGLDCCCLALQLPGLWSVV
SSTEFVTHACSLIYCVHFIEAVAVQPGEQLLSPERRTNTPKAISEEEEEVDPNTQNPKYIT
AACEMVAEMVESLQSVLALGHKRNSGVPAFLTPLLNRNIIISLARLPLVNSYTRVPPLVWKL
WSPKPGDGFATPEIPVEFLQEKEVFKEFIYRINTLGWTSRTQFEETWATLLGVLVTQPLV
MEQEEESPPEEDTERTQINVLAVQAITSLVLSAMTVPVAGNPAVSCLEQQPRNKPLKALDTRF
GRKLSIIRGIVEQEQIQAAMVSKRENIATHHLYQAWDPVPSLSPATTGALISHEKLLLQINPER
ELGSMYSYKLGQVSIHVSVLGNSITPLREEEWDEEEEEADAPAPSSPPTSPVNSRKHRAGVD
IHSCSQFLLELYSRWILPSSSARRTPAIILISEVVRSLLVSDLFTERNQFELMYVTLTELRR
VHPSEDEILAQYLVPATCKAAAVLGMDKAVAEVSRLLLESTLRSSHLP SRV GALH GILYVLE
CDLLDDTAKQLIPVISDYLLSNLKGIAHCVNIHSQQHVLVMCATAFYLIENYPLDVGPEFSA
SIIQMCGVMLSGSEESTPSIIYHCALRGLERLLLSEQLSRLDAESLVKLSVDRVNVHSPHRA
MAALGLMLTTCMYTGKEKVPGRTSDPNPAAPDSESVIVAMERVSFLFDRIRKGFPCEARVVA
RILPQFLDDFFPPQDIMNKVIGEFLSNQQPYPQFMATVVYKVFQTLHSTGQSSMVRDWMLLS
LSNFTQRAPVAMATWSLSCFFVSASTSPWVAAILPHVISRMGKLEQVDVNLFCLVATDFYRH
QIEEELDRRAFQSVLEVVAAPGSPYHRLLTCLRNHVHKVTTTC

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gabriele Schilling für die Überlassung des Themas und ihre Betreuung.

Ich danke den Mitgliedern meines Doktoranden-Komitees am Fritz-Lipmann-Institut Dr. Cornelis Calkhoven und Dr. Christoph Käther für die stete Diskussionsbereitschaft und uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Peter Herrlich danke ich für die wissenschaftlichen Anregungen und die nachhaltige Unterstützung bei der Bearbeitung dieses interessanten Themas.

Ich bedanke mich bei den Mitgliedern des Chorea Huntington-Labors: Denise Reichmann, Christina Weisse, AnneKathrin Klepzig und Stefanie Sendelbach für die wissenschaftlichen und manchmal auch unwissenschaftlichen Gespräche in ungezwungener Arbeitsatmosphäre, die mir viel Freude bereitet haben. Danke Mädels für die intensive Zusammenarbeit und Motivation.

Dr. Bernhard Schlott und Norma Baum möchte ich für die proteinbiochemischen Analysen danken.

Stefanie Schindler danke ich für die Unterstützung bei den Sequenzierungen von Huntingtin-Mutanten.

Außerdem möchte ich mich bei allen nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern des Westflügels 2 für das freundschaftliche Klima und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Ronny Schäfer und meinen Eltern danke ich aufrichtig für ihre liebevolle und ausnahmslose Unterstützung während der Promotionszeit.

Eigene wissenschaftliche Beiträge

Publikationen:

Schilling, G., Klevytska, A., Tebbenkamp, A.T., **Juenemann, K.**, Cooper, J., Gonzales, V., Slunt, H., Poirer, M., Ross, C.A. and Borchelt, D.R. (2007) Characterization of huntingtin pathologic fragments in human Huntington disease, transgenic mice, and cell models. *J Neuropathol Exp Neurol*, **66**, 313-320.

Juenemann, K., Reichmann D., Weisse C., Kaether C., Calkhoven CF. and Schilling G. Modulation of mutant huntingtin N-terminal cleavage and its effect on toxicity and aggregation. Under review.

Poster:

KatrIn Juenemann and Gabriele Schilling. Generation of an HD transgenic mouse model lacking a proteolytic site. HD 2007 Changes, Advances and Good News (CAG)_n, Cambridge, USA.

KatrIn Juenemann, Christina Weisse and Gabriele Schilling. Proteolytic processing of huntingtin may contribute to the pathogenesis of HD. World Congress on Huntington's Disease 2007, Dresden.

Posterpreis für „Basic Science in HD“.

KatrIn Juenemann, Denise Reichmann, Christina Weisse and Gabriele Schilling. N-terminal proteolytic processing of huntingtin may contribute to the pathogenesis of HD. HD 2008 The Milton Wexler Celebration of Life, Cambridge, USA.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die eingereichte Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Die Zitate sind gekennzeichnet, alle Abbildungen enthalten nur die originalen Daten und sind in keinem Fall inhaltsverändernder Bildbearbeitung unterzogen worden.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht habe. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

Jena, den 02.06.2009

Katrin Jünemann