Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Molekulare Analyse der Huntingtin-Aggregation und deren Modulation durch das eukaryontische Chaperonin TRiC

Carola Alexandra Langer
aus
Fürth

2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 14.02.2007

Carola Langer

Dissertation eingereicht am	22.02.2007
1. Gutachter	Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl
2. Gutachter	PD Dr. Zoya Ignatova
Mündliche Prüfung am	09.05.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

1.1. Proteinfaltung 1
1.1.1. Proteinfaltung allgemein 1
1.1.2. Proteinfaltung in der Zelle: Chaperone 2
1.1.2.1. Faltung in der Zelle 2
1.1.2.2. Chaperone 3
1.1.2.3. Ribosomen-bindende Chaperone 4
1.1.2.4. Das Hsp70-System 5
1.1.2.5. Prefoldin 6
1.1.2.6. Chaperonine 6
1.1.2.7. Weitere Chaperon-Systeme 7
1.1.3. TRiC 8
1.1.3.1. TRiC-Struktur 8
1.1.3.2. ATPase-Zyklus von TRiC 9
1.1.3.3. TRiC-Substrate 9
1.1.3.4. Substraterkennung durch TRiC 10

1.2. Proteinfehlfaltung und Krankheit 11
1.2.1. Neurodegenerative Erkrankungen 11
1.2.2. Chorea Huntington und andere Polyglutaminerkrankungen 13
1.2.2.1. Chorea Huntington 14
1.2.2.2. Genetische Aspekte 14
1.2.2.3 Neuropathologische Aspekte 15
1.2.2.4. Neuronale Einschlüsse 16
1.2.2.5. Zelluläre Funktionen von Huntingtin 17
1.2.3. Pathogenitätsmechanismen 20
1.2.3.1. Aggregation und Toxizität 20
1.2.3.2. Spaltung von Huntingtin 22
1.2.3.3. Sequestrierung von zellulären Komponenten 23

1.3. Amyloide Aggregate 25
1.3.1. Struktur amyloider und amyloid-ähnlicher Aggregate 25
1.3.1.1 Amyloide Aggregate in neurodegenerativen Erkrankungen 25
1.3.1.2. Struktur von Polyglutamin-Aggregaten 27
1.3.2. Amyloidegenese 30
1.3.2.1. Kinetik der Aggregation 30
1.3.2.2. Intermediate 32

1.4. Proteinfehlfaltung und Chaperone 33
1.4.1. Neuroprotektive Wirkung von Chaperonen 34
1.4.2. Prävention der Aggregation 36
1.4.3. Hsp104 36

1.5. Zielsetzung 37

2. MATERIAL UND METHODEN 38

2.1. Material 38
2.1.1. Chemikalien 38
2.1.2. Restriktionsenzyme 39
2.1.3. Bakterienstämme 39
2.1.4. Vektoren und Oligonukleotide 40
2.1.5. Proteine 43
2.1.6. Antikörper 44
2.1.7. Fluorophore 44
2.1.8. Puffer und Lösungen 45
2.1.9. Medien 45

2.2. Methoden 47
2.2.1. Molekularbiologische Methoden 47
2.2.1.1. Agarose-Gelelektrophorese 47
2.2.1.2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 47
2.2.1.3. Hybridisierung von Oligonukleotiden (*annealing*) 48
2.2.1.4. Restriktionsverdau von DNS 48
2.2.1.5. Dephosphorylierung des Vektors 49
2.2.1.6. Ligation von DNS-Fragmenten 49
2.2.1.7. Herstellung kompetenter E.coli-Zellen 49
2.2.1.8. Transformation kompetenter E.coli-Zellen 50
2.2.1.9. DNS-Plasmid-Präparation 51
2.2.1.10. Bestimmung der DNS-Konzentration 51
2.2.1.11. Sequenzierung der DNS 51
2.2.2. Proteinbiochemische Methoden 51
2.2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 51
2.2.2.2. Färbung von SDS-Gelen 53
2.2.2.3. Western Blot-Analyse 53
2.2.2.4. Dot Blot-Analyse 55
2.2.2.5. Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen 55
2.2.2.6. Expression und Reinigung von MBP-Fusionsproteinen 58
2.2.2.7. Reinigung von TRiC aus Rinder-Hoden 60
2.2.2.8. Bestimmung der Proteinkonzentration 61
2.2.2.9. TCA-Fällung von Proteinen 62
2.2.3. Biochemische und biophysikalische Methoden 62
2.2.3.1. *In vitro*-Aggregation von Huntingtin 62
2.2.3.2. Aggregations-Filter-Retardations-Assay 63
2.2.3.3. Gelfiltrationschromatographie 63
2.2.3.4. Elektronenmikroskopie 64
2.2.3.5. Fluoreszenz-Markierung von Proteinen mit thiolreaktiven Farbstoffen 64
2.2.3.6. Fluoreszenz-Markierung von Proteinen mit lysinreaktiven Farbstoffen 64
2.2.3.7. Doppelmarkierungen 64
2.2.3.8. Fluoreszenz-Spektroskopie 65
2.2.3.9. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) 66
2.2.3.10. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie 68

3. ERGEBNISSE 70

3.1. Molekulare Analyse der Huntingtin-Aggregation 70
3.1.1. Frühe Phase der Aggregation 70
3.1.1.1. Analyse der frühen Phase der Aggregation durch Fluoreszenz 71
3.1.1.2. Analyse der frühen Phase der Aggregation durch FRET 78
3.1.2. Elongationsphase der Aggregation 80

3.2. Struktur der Aggregate und Intermediate 85
3.2.1. Distanzmessung durch FRET in reifen Aggregaten 85
3.2.2. Distanzmessung durch FRET in frühen Aggregaten 90
3.2.3. Distanzmessung bei verschiedenen Polyglutaminlängen 91

3.3. Einfluss von TRiC auf die Aggregation von Huntingtin 92
3.3.1. Direkte Rolle von TRiC in der Modulation der Htt-Aggregation 93
3.3.1.1 Effekt von TRiC auf die Bildung SDS-unlöslicher Aggregate 93
3.3.1.2. Charakterisierung der durch TRiC generierten Spezies 96
3.3.1.3. Konfokale Einzelmolekülanalyse 97
3.3.1.4. Interaktion von TRiC mit Aggregaten 99
3.3.2. Kooperativer Effekt von TRiC und Hsp70/40 101
3.3.2.1. Kooperativer Effekt auf die Löslichkeit von Htt53Q 102
3.3.2.2. Charakterisierung der durch TRiC und Hsp70/40 generierten Spezies 103
3.3.2.3. Fluoreszenz-Analyse des kooperativen Effekts 105
3.3.2.4. Förderung der Htt-Aggregation und Toxizität durch defizientes TRiC 108
3.3.2.5. Unterdrückung der Htt-Aggregation durch TRiC-Überexpression 108

4. DISKUSSION 111

4.1. Molekulare Analyse der Huntingtin-Aggregation 111
4.1.1. Frühe Phase der Aggregation 111
4.1.2. Elongationsphase der Aggregation 112

4.2. Struktur der Huntingtin-Aggregate 114
4.2.1. Struktur der reifen Aggregate 114
4.2.2. Struktur der löslichen Spezies 116
4.2.3. Struktur der frühen Aggregate 117

4.3. Die Modulation der Aggregation durch TRiC 117
4.3.1. Direkte Interaktion von TRiC mit Huntingtin 118
4.3.2. Kooperativer Effekt verschiedener Chaperon-Systeme 120
4.3.3. Modell für die Modulation der Aggregation durch Chaperone 121
4.3.4. Vorhandensein mehrerer oligomerer Spezies 123
4.3.5. Ausblick 124

5. ZUSAMMENFASSUNG 126

6. LITERATUR 127

7. ANHANG 151

1. EINLEITUNG

1.1. Proteinfaltung

In der belebten Natur spielen Proteine eine Schlüsselrolle. Sie übernehmen vielfältige Aufgaben im Organismus, z.B. als Strukturproteine oder als Enzyme. Um seine biologische Bestimmung erfüllen zu können, muss jedes Protein seine einzigartige dreidimensionale Struktur einnehmen. Wie dies geschieht, ist eines der zentralen Themen in der Biologie.

1.1.1. Proteinfaltung allgemein

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins ist allein in seiner Aminosäuresequenz kodiert (Anfinsen, 1973). Die native Konformation eines Proteins stellt dabei ein energetisches Optimum dar. Zum Erreichen dieses Zustands müsste eine Polypeptidkette theoretisch alle möglichen Zustände durchlaufen, eine 150 Aminosäuren lange Polypeptidkette würde dafür im Mittel 10^{11} Jahre benötigen. Tatsächlich aber läuft die Faltung sehr viel schneller ab, innerhalb der Lebensdauer von Organismen. Dieses Problem ist als Levinthal-Paradoxon bekannt. Die Faltung einer Polypeptidkette verläuft also offensichtlich nicht rein stochastisch, vielmehr muss es Mechanismen geben, die die Faltung in die eine oder andere Richtung dirigieren (Levinthal, 1969). Faltungsprozesse lassen sich mit Hilfe sogenannter Energielandschaften darstellen. Der native Zustand entspricht dabei dem Zustand mit der niedrigsten freien Energie. Ausgehend von der entfalteten Polypeptidkette, die eine Vielzahl von zufälligen (*random coiled*) Konformationen annehmen kann, werden mehrere Konformationen auf der Oberfläche eines sogenannten *folding funnels* (Faltungstrichters) durchlaufen, wobei die freie Energie entlang des Faltungsweges im Allgemeinen immer niedriger wird. Dabei gibt es eine Vielzahl möglicher Faltungswege. Lokale Minima in der Energielandsschaft entsprechen metastabilen Zuständen. Sie können sich als kinetische Fallen erweisen, die das Erreichen der nativen Konformation erschweren (Dill and Chan, 1997; Dobson and Karplus, 1999).

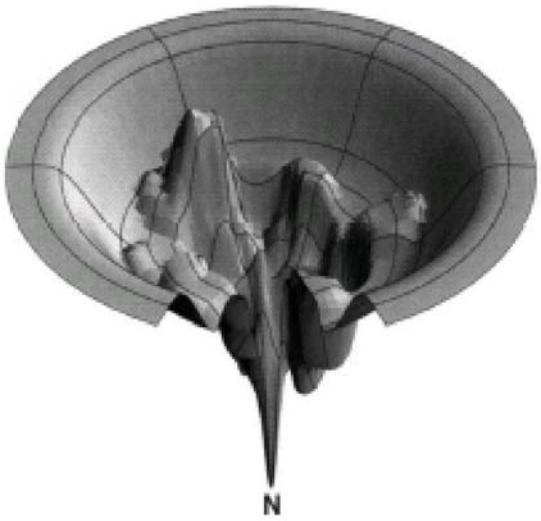

Abb. 1-1: Energielandschaft mit kinetischen Fallen, Energiebarrieren und Engpässen. N: native Konformation (nach Dill und Chan, 1997)

1.1.2. Proteinfaltung in der Zelle: Chaperone

1.1.2.1. Faltung in der Zelle

Ungefaltete Proteine exponieren hydrophobe Seitenketten, die in der nativen Struktur im Inneren verborgen sind. Diese haben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen eine starke Tendenz zu aggregieren. Diese Aggregationsneigung wird durch die Bedingungen in der Zelle, die sich völlig von denen verdünnter Lösungen unterscheiden, verstärkt. Zum einen ist das Cytosol angefüllt mit zahlreichen Proteinen und anderen Makromolekülen. Diese bewirken einen sogenannten Volumenausschluss-Effekt (*macromolecular crowding*) (Minton, 2000), der zu einer erhöhten effektiven Konzentration des jeweiligen Proteins führt. Aggregation ist unter diesen Bedingungen stark favorisiert (Minton, 2000). Translation an Polyribosomen erhöht die lokale Konzentration der Polypeptidketten zusätzlich. Ein weiteres Problem ist, dass während der Translation die in der Aminosäuresequenz kodierte Information vektoriell verfügbar ist. Bildung einer stabilen Tertiärstruktur erfordert jedoch im Allgemeinen Kontakte zwischen weiter entfernten Resten, für die die Anwesenheit der vollständigen Polypeptidkette einer Proteindomäne nötig ist. Während der Zeit der Synthese exponiert das naszierende Protein hydrophobe Seitenketten, die die Aggregationsneigung erhöhen.

1.1.2.2. Chaperone

In der Zelle sind zahlreiche Proteine daran beteiligt, effektive Faltung zu ermöglichen und Aggregation ungefalteter Polypeptidketten zu verhindern (Barral et al., 2004; Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Young et al., 2004). Zu diesen Proteinen gehören Isomerasen, z.B. die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), die Disulfidaustauschreaktionen katalysiert, und die Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen), die die Isomerisierung von X-Pro-Peptidbindungen katalysieren (Schiene and Fischer, 2000). Weiterhin gibt es die molekularen Chaperone (frz. Anstandsdame), die unproduktive Interaktionen zwischen ungefalteten Proteinen, aber auch innerhalb einer entfalteten Polypeptidkette, verhindern (Barral et al., 2004; Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Young et al., 2004). Chaperone erkennen im entfalteten Protein strukturelle Elemente wie hydrophobe Seitenketten und unstrukturierte Bereiche des Polypeptidrückgrats, die im nativen Protein im Inneren verborgen liegen, und ermöglichen Faltung durch zyklisches Binden und Freisetzen des Substrats. Dabei schützen sie die nichtnativen Polypeptidketten vor Fehlfaltung und Aggregation, steuern aber selbst keine Information zur dreidimensionalen Struktur bei. Auch verändern sie im Allgemeinen nicht die Faltungskinetik. Viele Chaperone werden bei zellulärem Stress, z.B. Hitzeschock, verstärkt exprimiert. Man nennt sie deshalb auch Hitzeschockproteine (*Hsps*) (Morimoto, 1993; Morimoto, 1998). Zusätzlich zu ihrer Funktion in der Faltung von Proteinen sind Chaperone an verschiedenen anderen zellulären Prozessen beteiligt, z.B. am zellulären *Targeting* von Proteinen, an der Proteindegradation und an der Signaltransduktion (Barral et al., 2004).

Eine Übersicht der Chaperonsysteme ist in Abb. 1-2 dargestellt. In der Zelle kooperieren die verschiedenen Chaperonsysteme bei der Faltung neusynthetisierter Proteine und bilden dabei ein funktionelles Netzwerk (Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Langer et al., 1992; Young et al., 2004). Ribosomenbindende Chaperone interagieren zuerst mit der naszierenden Polypeptidkette und halten sie in einer faltungskompetenten Konformation. Im weiteren Verlauf nehmen Hsp70-Proteine eine zentrale Stellung ein. Sie binden an nichtnative Proteine und naszierende Polypeptidketten und ermöglichen Faltung durch zyklisches Binden und Freisetzen. Der am besten untersuchte Cofaktor ist Hsp40, des Weiteren kooperieren die Hsp70-Chaperone mit verschiedenen anderen Chaperonen wie z.B. Hsp90 oder multimeren, zylindrischen Chaperonkomplexen, den Chaperoninen. In Eukaryonten transferiert der Cofaktor Prefoldin/GimC bestimmte Substrate zum Chaperonin TRiC. Ein alternativer Faltungsmechanismus über das Hsp90-Chaperonsystem ist für die Faltung einiger regulatorischer Proteine wie Steroidhormonrezeptoren und Zellzykluskinasen verantwortlich (Buchner, 1999; Young et al., 2001). Manche Chaperone der Hsp100- oder Clp-Familie

können in Kooperation mit dem Hsp70/40-System auch Proteine entfalten und kleine Aggregate auflösen (Ben-Zvi and Goloubinoff, 2001).

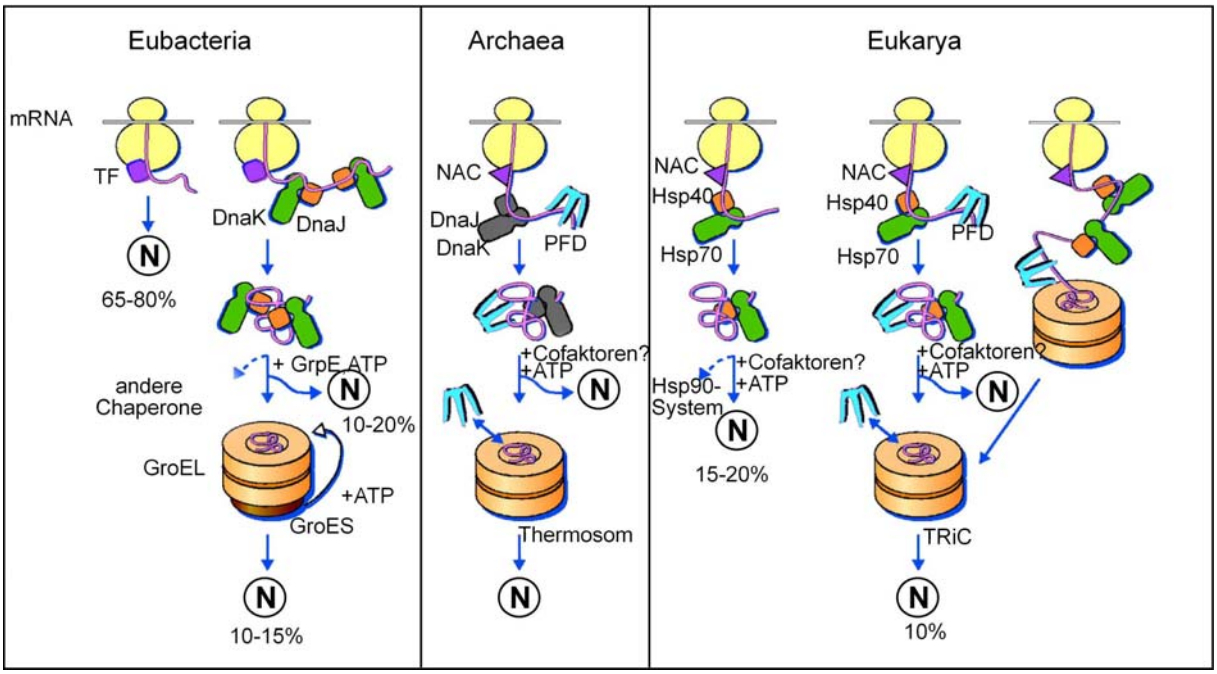

Abb. 1-2.: Zusammenstellung der Chaperonsysteme in Eubacteria, Archaea, Eukarya. TF: *Trigger* Faktor, PFD: Prefoldin, NAC: *nascent chain associated complex*, N: natives Protein (verändert nach Hartl and Hayer-Hartl, 2002)

1.1.2.3. Ribosomen-bindende Chaperone

Das erste Chaperon, das mit einer naszierenden Polypeptidkette interagiert, ist im bakteriellen Cytosol *Trigger*-Faktor (Hartl and Hayer-Hartl, 2002), ein bakterielles 48 kDa-Protein. *Trigger*-Faktor ist assoziiert mit translatierenden Ribosomen (Hesterkamp et al., 1996), dabei bindet er an die L23- und L29-Proteine der großen Ribosomen-Untereinheit nahe am Ausgangs (*exit*)-Tunnel und interagiert cotranslational mit der naszierenden Kette (Blaha et al., 2003; Kramer et al., 2002). *Trigger*-Faktor hat sowohl eine Chaperonaktivität als auch eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität (Hesterkamp et al., 1996), wobei die physiologische Rolle der Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität unklar ist, da sie *in vivo* nicht essentiell ist. Da *Trigger*-Faktor ATP-unabhängig wirkt, wird keine aktive Rolle in der Faltung angenommen, sondern eine Funktion durch Abschirmen der hydrophoben exponierten Seitenketten. Aktive Faltung hingegen wird durch die ATP-abhängigen Chaperone vermittelt. Das bakterielle Hsp70-Homolog DnaK und sein Cochaperon DnaJ kooperieren mit *Trigger*-Faktor in der Stabilisierung naszierender Ketten (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999), dabei haben sie teilweise überlappende Funktionen.

Im eukaryontischen Cytosol fehlt ein *Trigger*-Faktor-Homolog, statt dessen bindet NAC (*nascent chain associated complex*) (Wiedmann et al., 1994), ein ribosomenassoziierter heterodimerer Komplex aus einer α- und einer β-Untereinheit (Beatrix et al., 2000), an naszierende Ketten. NAC bindet an das ribosomale Protein L25 (Grallath et al., 2006), ein Homolog zum bakteriellen L23. Wie der *Trigger*-Faktor ist auch NAC ATP-unabhängig, im Gegensatz zum *Trigger*-Faktor besitzt NAC keine Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität. Unklar ist, ob NAC eine Chaperonaktivität besitzt, *in vitro* konnte eine chaperonartige Aktivität der einzelnen Untereinheiten nachgewiesen werden (Grallath et al., 2006). Auch einige eukaryontische Hsp70-Proteine, z.B. das konstitutiv exprimierte Hsc70 in Säugern, können mit naszierenden Ketten interagieren. In Hefe gibt es spezialisierte Hsp70-Homologe, die mit Ribosomen und kurzen naszierenden Ketten interagieren, nämlich die nicht-kanonischen Hsp70-Chaperone Ssb1 und Ssb2 (Pfund et al., 1998).

1.1.2.4. Das Hsp70-System

Hsp70-Proteine kommen im Cytosol von Bakterien, Eukaryonten und manchen Archaea vor, außerdem in eukaryontischen Organellen. In höheren Eukaryonten gibt es konstitutiv exprimierte Hsp70-Homologe (Hsc70) und zusätzlich stressinduzierbare Homologe (Hsp70), die bei zellulärem Stress, z.B. Hitzeschock, exprimiert werden. Hsp70-Chaperone benötigen Cochaperone der Hsp40-Familie. Faltung der Substratproteine wird durch ATP-abhängige Zyklen von Bindung und Freisetzung erreicht. Dabei bindet Hsp70 an exponierte hydrophobe Seitenketten (Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Rudiger et al., 1997)

Der Reaktionszyklus ist am besten untersucht für das bakterielle Hsp70/40-System DnaK/DnaJ/GrpE. DnaK ist das bakterielle Hsp70-Homolog und besteht aus einer N-terminalen ATPase-Domäne (44 kDa) und einer Peptidbindungsdomäne (27 kDa) (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Der ATP-gebundene Zustand von DnaK mit schnellen Assoziations- und Dissoziationsraten erlaubt schnelle Bindung des entfalteten Peptids. Bei ATP-Hydrolyse geht DnaK in eine Konformation mit langsamen Assoziations- und Dissoziationsraten über. Das Peptid ist nun fest in der Peptidbindetasche gebunden (Bukau and Horwich, 1998; Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Der ATPase-Zyklus wird reguliert durch DnaJ (ein Hsp40-Protein) und GrpE (Liberek et al., 1991; McCarty et al., 1995; Szabo et al., 1994). Mittels einer N-terminalen J-Domäne bindet DnaJ an DnaK und aktiviert die ATP-Hydrolyse (Mayer et al., 2000; Pellecchia et al., 2000; Wall et al., 1994). Mit einer C-terminalen Peptidbindungsdomäne kann DnaJ hydrophobe Reste erkennen und selbst als Chaperon

wirken oder DnaK zum nichtnativen Protein rekrutieren (Langer et al., 1992; Rudiger et al., 2001; Sha et al., 2000). Der Nukleotidaustauschfaktor GrpE ist ein Homodimer aus 20 kDa-Untereinheiten und induziert die ADP-Freisetzung von DnaK (Harrison et al., 1997). Nach erneuter ATP-Bindung dissoziiert der DnaK-Peptid-Komplex und schließt damit den Zyklus.

Eukaryontische Hsp70-Chaperone kooperieren ebenfalls mit einem Hsp40-Cochaperon, benötigen aber keinen GrpE-ähnlichen Nukleotidaustauschfaktor. Dies scheint auch gar nicht notwendig, da nicht die Dissoziation von ADP der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, sondern die ATP-Hydrolyse. Allerdings wurden verschiedene Nukleotidaustauschfaktoren identifiziert, u.a. Bag1 (Hohfeld and Jentsch, 1997), das strukturell nicht mit GrpE verwandt ist, aber einen ähnlichen Konformationswechsel in Hsc70 induziert (Sondermann et al., 2001). Eine anderer nicht GrpE-verwandter Nukleotidaustauschfaktor ist HspBP1 (*hsp70 binding protein*) bzw. sein Hefe-Homolog Fes1 (Kabani et al., 2002a; Kabani et al., 2002b). Das Cochaperon HIP (*hsp70 interacting protein*) stabilisiert den ADP-gebundenen Zustand von Hsc70 und wirkt damit Bag1 entgegen (Hohfeld et al., 1995; Nollen et al., 2001). Auch molekulare Chaperone der Hsp110-Familie können als Austauschfaktoren für Hsp70s agieren (Dragovic et al., 2006).

1.1.2.5. Prefoldin

Prefoldin (PFD) (Vainberg et al., 1998), oder auch GimC (*Genes involved in microtubule biogenesis Complex*) (Geissler et al., 1998), transferiert Substratproteine zum Chaperonin TRiC (Vainberg et al., 1998). Prefoldin/GimC ist ein hexamerer Komplex aus zwei verschiedenen Untereinheiten. Eukaryonten-PFD besteht aus zwei α- und vier β-Untereinheiten (Leroux et al., 1999). Die Struktur ähnelt einem Tintenfisch: Der Körper besteht aus einem β-*Barrel* mit sechs α-helikalen superspiralisierten tentakelartigen Fortsätzen. An den Spitzen sind diese teilweise entwunden und exponieren hydrophobe Aminosäuren, an die nichtnative Proteine binden können (Siegert et al., 2000).

1.1.2.6. Chaperonine

Chaperonine sind eine konservierte Klasse von großen zylinderförmigen Doppelring-komplexen von ~800-900 kDa, die einen geschlossenen Hohlraum ausbilden können (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Man unterscheidet zwischen Gruppe I- und Gruppe II-Chaperoninen. Gruppe I-Chaperonine (Hsp60s) werden in Eubakterien oder Organellen endosymbiontischen

Ursprungs (Mitochondrien und Chloroplasten) gefunden (Bukau and Horwich, 1998; Hartl and Hayer-Hartl, 2002). GroEL ist ein Doppelringkomplex aus zwei heptameren Ringen mit identischen 57 kDa Untereinheiten. GroEL benötigt als Cofaktor GroES (Hsp10), einen heptameren Ring aus identischen Untereinheiten von ~10 kDa. Zyklisches Binden und Freisetzen von GroES ist dabei nötig für die Funktion. Gruppe II-Chaperonine sind in Eukaryonten TRiC (*TCP-1 ring complex*), auch CCT (*chaperonin containing TCP-1*) genannt, oder in Archaea das Thermosom (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Gruppe II-Chaperonine benötigen keinen GroES-ähnlichen Cofaktor. TRiC ist ein Doppelringzylinder und enthält acht orthologe Untereinheiten pro Ring. Der Proteinfaltungsmechanismus der Chaperonine unterscheidet sich grundsätzlich von dem der anderen Chaperone. Chaperonine bilden eine geschlossene Kammer aus, in der das nichtnative Protein abgeschirmt von der Umgebung falten kann.

Am besten untersucht ist der Mechanismus der bakteriellen GroEL/GroES-Maschinerie. GroEL ist funktionell asymmetrisch, d.h. die beiden Ringe befinden sich in verschiedenen Zuständen, die durch negative Allosterie gekoppelt sind (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Ein Zyklus beginnt mit der Bindung des Polypeptidsubstrats an den offenen Ring. Bindung von ATP und GroES bewirkt eine massive Umlagerung der apikalen Domänen, wodurch die innere Kammer erweitert und die Oberfläche hydrophil wird (Roseman et al., 1996; Saibil et al., 1993; Xu et al., 1997). Diese Umgebung (Anfinsen-Käfig) begünstigt die Faltung der Polypeptidkette (Brinker et al., 2001). Öffnung der Kammer erfolgt nach ATP-Hydrolyse durch ATP- und GroES-Bindung im gegenüberliegenden Ring, worauf das Polypeptid das Chaperonin verlässt. Falls es noch nicht richtig gefalten ist und hydrophobe Seitenketten exponiert, kann es wieder gebunden werden und einen weiteren Faltungszyklus durchlaufen.

1.1.2.7. Weitere Chaperon-Systeme

Außer den am besten charakterisierten Hsp-Familien, nämlich Hsp70, Hsp40 und Hsp60, gibt es noch eine Reihe weiterer Chaperonsysteme in der Zelle mit unterschiedlichen Funktionen. Dazu gehören die Chaperone der Hsp100-Familie, der Hsp90-Familie und die kleinen Hitzeschockproteine (*small heat shock proteins: sHsps*).

Die Hsp100-Chaperone sind Mitglieder der AAA-Protein-Familie (AAA: *adenosine triphosphatases with diverse activities*) (Schirmer et al., 1996). In Gegenwart von ATP oder ADP bilden sie hexamere ringförmige Strukturen aus (Lee et al., 2003; Parsell et al., 1994). Im Gegensatz zu den Chaperonen der Hsp70-, Hsp40- und Hsp60-Familie, die Fehlfaltung

und Aggregation verhindern, können einige Hsp100-Chaperone wie z.B. Hsp104 bereits aggregierte Proteine in Kooperation mit Hsp70 solubilisieren und entfalten (Ben-Zvi and Goloubinoff, 2001; Glover and Lindquist, 1998; Lum et al., 2004).

Ein alternativer Faltungsweg ist der durch Hsp90 vermittelte. Hsp90 ist eines der häufigsten cytosolischen Proteine in Eukaryonten (Buchner, 1999; Young et al., 2001) und spielt vor allem eine Rolle in der Faltung und Regulation von Signalproteinen, z.B. Steroidhormonrezeptoren und Zellzykluskinasen (Buchner, 1999). Wie Hsp70 hat es eine ATP-regulierte Chaperonfunktion (Obermann et al., 1998).

Zusätzlich gibt es die kleinen Hitzeschockproteine (*sHsps*). Sie haben eine molekulare Masse von 15-42 kDa und assemblieren in dynamische oligomere Strukturen (Haslbeck, 2002), die entfaltete Proteine binden können. Das am besten untersuchte *sHsp* ist das α-Crystallin in der Augenlinse, das eine Trübung der Linse durch aggregierendes Protein verhindert (Clark and Muchowski, 2000). Gemeinsames Strukturmerkmal der kleinen Hitzeschockproteine ist eine C-terminale konservierte Domäne, die sogenannte α-Crystallin-Domäne (Haslbeck, 2002).

1.1.3. TRiC

1.1.3.1. TRiC-Struktur

TRiC (*TCP-1 ring complex*) oder CCT (*Chaperonin Containing TCP-1*) wurde als Chaperonin des eukaryontischen Cytosols identifiziert (Frydman et al., 1992; Gao et al., 1992). Die Untereinheiten bestehen aus je einer äquatorialen ATP-Bindungsdomäne, einer apikalen Domäne, die an der Substratbindung beteiligt ist, und einer zentralen Gelenkdomäne, die die Kommunikation zwischen der äquatorialen und der apikalen Domäne vermittelt. Die äquatoriale Domäne ist relativ konserviert, die größte Divergenz findet man in der apikalen Domäne (Kim et al., 1994). Im Gegensatz zu Gruppe I-Chaperoninen benötigen Gruppe II-Chaperonine keinen Cofaktor. Für TRiC gibt es zwar derzeit keine Kristallstruktur, aus der Kristallstruktur des Thermosoms von *T. acidophilum* (Ditzel et al., 1998) ist jedoch ersichtlich, dass die apikalen Fortsätze einen integrierten Deckel bilden, so dass Polypeptide bis zu 50 kDa innerhalb der Kammer eingeschlossen werden können (Ditzel et al., 1998). Man geht davon aus, dass sich dieser eingebaute Deckel während des ATPase-Zyklus von

TRiC öffnet und schließt (Meyer et al., 2003). Abb. 1-3 zeigt eine 3D-Rekonstruktion von TRiC in seiner offenen und seiner geschlossenen Konformation.

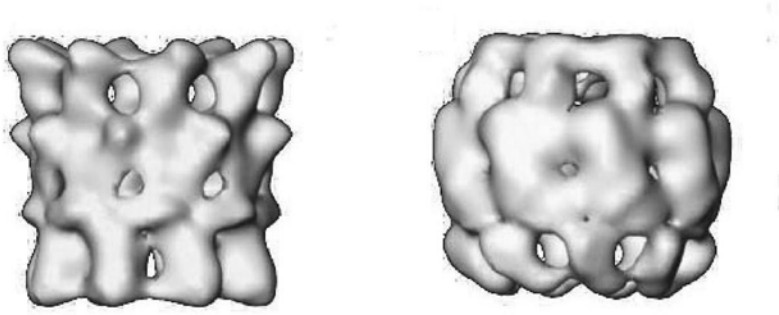

Abb. 1-3: 3D-Modell von TRiC in offener und geschlossener Konformation. (nach Llorca et al.,1999)

1.1.3.2. ATPase-Zyklus von TRiC

Folgendes Modell wurde für den ATPase-Zyklus von TRiC vorgeschlagen: In Abwesenheit von Nukleotid liegen die apikalen Domänen in einer offenen Konformation vor, die Substratbindungsstellen sind exponiert (Llorca et al., 1999b; Spiess et al., 2004). ATP-Bindung und Hydrolyse induziert die Bildung des geschlossenen Deckels, wobei erst die ATP-Hydrolyse das Schließen veranlasst (Llorca et al., 2001; Llorca et al., 1999b; Meyer et al., 2003; Spiess et al., 2004). Dadurch bildet sich eine abgeschlossene Kammer aus, die die Faltung ermöglicht. Nach Freisetzung des γ-Phosphats befindet sich das ADP-gebundene TRiC wieder in seinem offenen Zustand (Spiess et al., 2004). Der ATPase-Zyklus von TRiC ist mit 4 Minuten extrem langsam, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist das Öffnen des Deckels (Spiess et al., 2004). Die Bindung von ATP an die Untereinheiten innerhalb eines Ringes ist positiv kooperativ. Die beiden Ringe sind durch negative Allosterie gekoppelt, sie liegen also in unterschiedlichen Zuständen vor (Kafri and Horovitz, 2003; Kafri et al., 2001).

1.1.3.3. TRiC-Substrate

TRiC wird für die Faltung einiger essentieller Proteine benötigt. Die am längsten bekannten Substrate sind Aktin und Tubulin (Gao et al., 1992), aber auch andere cytosolische Proteine wie z.B. Cdc20 (Camasses et al., 2003) oder der Von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor (VHL) (Feldman et al., 1999; Melville et al., 2003) benötigen TRiC für die Faltung. Einige WD40-Proteine wurden als TRiC-Substrate identifiziert (Ho et al., 2002; Siegers et al., 2003). Viele TRiC-Substrate können nur durch TRiC, nicht jedoch durch andere pro- oder eukaryontische Chaperone gefaltet werden (Tian et al., 1995). Außer bei den

WD40-Proteinen, die eine β-Propeller-Struktur ausbilden (Smith et al., 1999), bestehen zwischen den TRiC-Substraten keine offensichtlichen Ähnlichkeiten in Sequenz und Struktur. Vielen TRiC-Substraten gemeinsam ist, dass sie Untereinheiten aus homo- oder heterooligomeren Komplexen sind. Manche Substrate (Tubulin, VHL, Cdc20) werden nur in Gegenwart ihrer Partnerproteine freigesetzt (Camasses et al., 2003; Feldman et al., 1999). Freisetzung ist dabei gekoppelt an den Einbau in den oligomeren Komplex. Einige Substrate sind auch zu groß, um in der Kammer eingeschlossen zu werden. Die Häufigkeit der β-Struktur-Elemente in TRiC-Substraten deutet auf eine Rolle von TRiC in der Faltung von β-Faltblättern hin.

TRiC interagiert mit anderen eukaryontischen Chaperonen bei der Faltung seiner Substrate. Bindung an TRiC benötigt die Kooperation mit Prefoldin/GimC (Siegers et al., 2003) oder Hsp70-Chaperonen (Frydman et al., 1994; Melville et al., 2003; Siegers et al., 2003), wobei Prefoldin spezifisch für Aktin und Tubulin zu sein scheint. Im Gegensatz zu GroEL kann TRiC auch an naszierende Ketten binden (Frydman et al., 1994; McCallum et al., 2000).

1.1.3.4. Substraterkennung durch TRiC

Ein wichtiger Unterschied zwischen GroEL und TRiC liegt in der Substraterkennung. Während GroEL mit vielen verschiedenen entfalteten Proteinen durch unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen interagieren kann, scheint die TRiC-Substraterkennung spezifischer zu sein. Substraterkennung findet wahrscheinlich an den apikalen Domänen statt, wobei die exakte Stelle nicht bekannt ist (Spiess et al., 2006). Angesichts der Diversität der apikalen Domänen ist eine attraktive Hypothese, dass verschiedene Untereinheiten verschiedene Sequenzmotive erkennen, sowohl polare als auch hydrophobe. Kryoelektronenmikroskopie zeigte, dass Aktin- und Tubulin-Intermediate in einer offenen quasi-nativen Konformation an TRiC gebunden werden (Llorca et al., 2000). Dabei binden beide an jeweils spezifische Untereinheiten (Llorca et al., 2000; Llorca et al., 1999a). Diese kryoelektronenmikroskopischen Studien wurden allerdings mit chemisch denaturiertem Aktin bzw. Tubulin durchgeführt und entsprechen deshalb nicht unbedingt der *in vivo*-Situation. Durch Photocrosslinking wurde gezeigt, dass die naszierende Aktin-Polypeptidkette während ihrer Synthese mehrere TRiC-Untereinheiten kontaktiert und dass sich diese Interaktionen während der Elongation verändern (Etchells et al., 2005). Auch für VHL, dessen Bindung über zwei kurze lineare β-Stränge mittels hydrophober Wechselwirkung erfolgt (Feldman et

al., 2003), wurde ein spezifisches Bindungsmuster gezeigt. Die beiden Motive kontaktieren jeweils spezifische Untereinheiten, die jedoch überlappen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die TRiC-Untereinheiten eine einzigartige Kombination aus Spezifität und Plastizität in der Substratbindung zeigen, die möglicherweise essentiell für die TRiC-Funktion ist (Spiess et al., 2006).

1.2. Proteinfehlfaltung und Krankheit

Da die korrekte Faltung eines Proteins eine zentrale Rolle in der Biologie einnimmt, ist es leicht vorstellbar, dass die Fehlfaltung von Proteinen drastische Konsequenzen hat und auch zu Erkrankungen führen kann. Insbesondere in höherem Lebensalter kann es zu Fehlfunktionen im Chaperonsystem und im Proteinabbau kommen, wodurch sich fehlgefaltete Proteine anreichern können. Zahlreiche Fehlfaltungskrankheiten sind bekannt, unter anderem die Cystische Fibrose, die durch eine Fehlfaltung eines Chloridkanals, des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) verursacht wird (Thomas et al., 1995), systemische Amyloidosen, Typ II Diabetes, und die Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen, bei der ein aberrant gefaltetes Protein zu Neurodegeneration und den damit assoziierten Krankheitsbildern führt.

1.2.1. Neurodegenerative Erkrankungen

Zu den neurodegenerativen Erkrankungen zählen u.a. die Alzheimer'sche Erkrankung, die Parkinson'sche Erkrankung, die Huntington'sche Erkrankung und andere Polyglutamin-erkrankungen, die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und die spongiformen Encephalopathien. Diesen Erkrankungen, mit Ausnahme der transmissiblen spongiformen Encephalopathien, ist gemeinsam, dass sie erst in der späteren Lebenshälfte auftreten und progredienten Verlauf zeigen (Soto, 2003). Mit Ausnahme der Polyglutaminerkrankungen treten sie meist sporadisch auf, es gibt jedoch auch familiäre Formen, die durch Mutation hervorgerufen werden. Die vererbten Krankheitsformen treten zumeist früher auf und zeigen oft auch einen schwereren Verlauf. Durch Infektion erworbene Krankheitsformen sind nur für die spongiformen Encephalopathien bekannt. Die neurodegenerativen Erkrankungen äußern sich durch Verlust kognitiver oder motorischer Funktionen. Neuropathologisch sind sie charakterisiert durch den selektiven Verlust bestimmter Subpopulationen von Neuronen und

durch synaptische Abnormalitäten. Auffällig sind die amyloiden Proteinablagerungen, die in *post mortem*-Gehirnen nachweisbar sind. Je nach Erkrankung sind diese intra- oder extrazellulär lokalisiert (Soto, 2003). So findet man in der Alzheimer'schen Erkrankung extrazelluläre amyloide Plaques und intrazelluläre neurofibrilläre *Tangles*. Die amyloiden Plaques enthalten vor allem amyloide Fibrillen aus Aβ-Peptid (Glenner and Wong, 1984; Masters et al., 1985), das aus einem Vorläuferprotein (APP: *amyloid precursor protein*) durch proteolytische Spaltung generiert wird. Die neurofibrillären *Tangles* enthalten vor allem hyperphosphoryliertes Tau (Grundke-Iqbal et al., 1986a; Grundke-Iqbal et al., 1986b), das aber keine amyloide Struktur aufweist. In der Parkinson'schen Erkrankung treten cytoplasmatische amyloide Einschlüsse aus α-Synuclein, die sogenannten *Lewy Bodies*, auf (Moore et al., 2005). In Polyglutaminerkrankungen wurden ebenfalls intrazelluläre Einschlüsse beobachtet, die das jeweilige krankheitsauslösende Protein beinhalten. In Tabelle 1-1 sind einige wichtige neurodegenerative Erkrankungen zusammengestellt.

Erkrankung	**Auftreten**	**Klinische Symptome**	**Betroffene Gehirnareale**	**Beteiligtes Protein**	**Charakteristische Pathologie**
Alzheimer	90%sporadisch, 10% erblich	Fortschreitende Demenz	Hippocampus, cerebraler Cortex	Amyloid-β, tau	Amyloide Plaques, neurofibrilläre Tangles
Parkinson	Meist sporadisch	Motorische Störung	Substantia nigra, Hypothalamus	α-Synuclein	Intrazelluläre Lewy Bodies
Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	90% sporadisch, 10% erblich	Motorische Störung	Motorcortex, Hirnstamm	Superoxid-Dismutase (SOD)	Intrazelluläre Einschlüsse
Spongiforme Encephalopathien	90% sporadisch, 8% erblich, 2% infektiös	Demenz, Ataxia, psychische Störungen	Verschiedene	Prion Protein	Spongiforme Degeneration, Amyloid
Huntington	Erblich (autosomal dominant)	Demenz, motorische und psychische Störung	Striatum, cerebraler Cortex	Huntingtin	Intrazelluläre Einschlüsse

Tab.1-1: Zusammenstellung einiger wichtiger neurodegenerativer Erkrankungen (nach Soto, 2003)

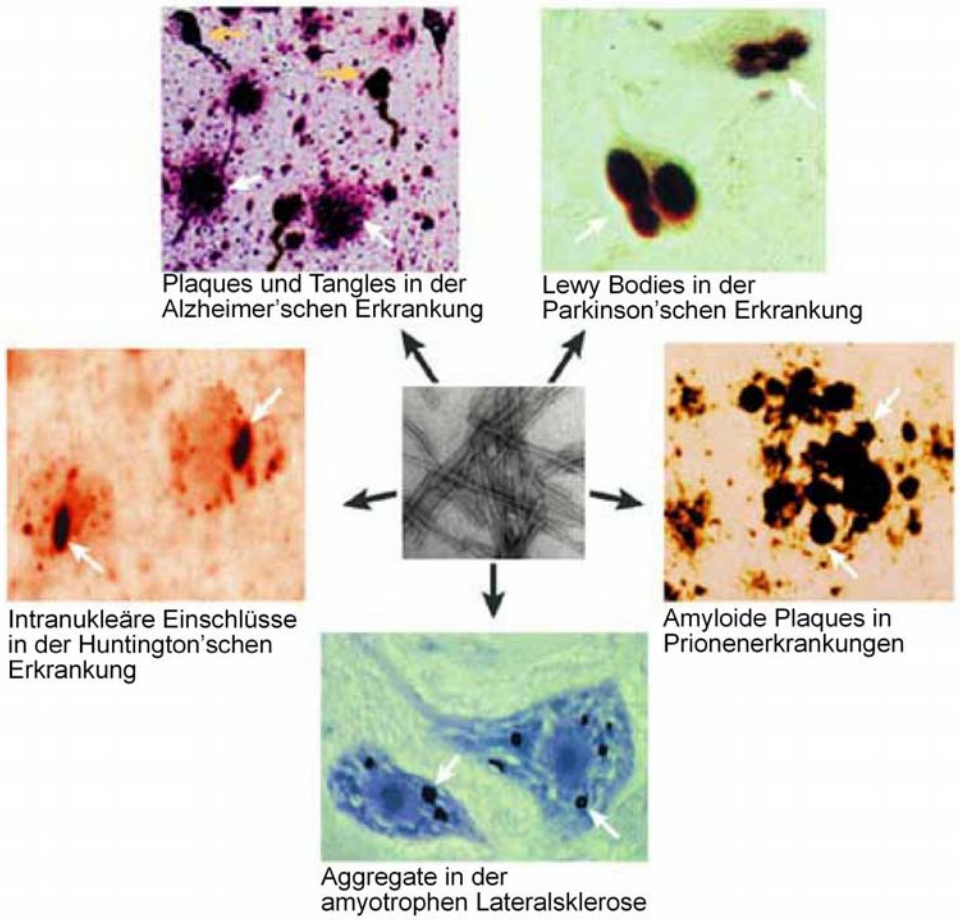

Abb. 1-4: Amyloide Ablagerungen in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen (nach Soto, 2003)

1.2.2. Chorea Huntington und andere Polyglutaminerkrankungen

Zu den Polyglutaminerkrankungen gehören die Spinobulbäre Muskuläre Atrophie (*Kennedy's Disease*, SBMA), die Dentatorubrale Pallidolysische Atrophie (DRPLA), die Spinocerebellären Ataxien (SCA) und die Huntington'sche Erkrankung (HD). Die Polyglutaminerkrankungen nehmen unter den neurodegenerativen Erkrankungen eine Sonderstellung ein, da sie nicht sporadisch auftreten, sondern erblich sind. Verursacht werden sie durch die Expansion eines repetitiven poly-CAG-Elements in einem für die Erkrankung spezifischen Gen. Diese CAG-Wiederholungen kodieren für eine Polyglutaminsequenz, daher der Name Polyglutaminerkrankungen. Die Gene, die in die verschiedenen Polyglutamin-erkrankungen involviert sind, haben außer der poly-CAG-Region keine Ähnlichkeiten in der Sequenz. Die Polyglutaminerkrankungen treten im späteren Lebensalter auf und zeichnen sich durch fortschreitende Neurodegeneration aus. Dabei sind je nach Erkrankung unterschiedliche

Subpopulationen von Neuronen betroffen, was in unterschiedlichen Krankheitsbildern resultiert (Zoghbi and Orr, 2000).

Erkrankung	**Beteiligtes Protein**	**polyQ-Länge normal**	**polyQ-Länge pathogen**
Spinobulbäre muskuläre Atrophie (SBMA)	Androgenrezeptor	9-36	38-62
Dentatorubrale Pallidolysische Atrophie (DRPLA)	Atrophin-1	6-36	49-84
Chorea Huntington	Huntingtin	6-34	36-121
Spinocerebelläre Ataxie 1 (SCA1)	Ataxin-1	6-44	39-82
Spinocerebelläre Ataxie 2 (SCA2)	Ataxin-2	15-31	36-63
Spinocerebelläre Ataxie 3 (SCA3)/ Machado-Joseph-Krankheit (MJD)	Ataxin-3	12-41	62-84
Spinocerebelläre Ataxie 6 (SCA6)	Ataxin-6	4-18	21-33
Spinocerebelläre Ataxie 7 (SCA7)	Ataxin-7	4-35	37-306
Spincerebelläre Ataxie 17 (SCA17)	TBP	38	40

Tab. 1.2: Zusammenstellung der Polyglutaminerkrankungen (nach Zoghbi und Orr,2000)

1.2.2.1. Chorea Huntington

Die Huntington'sche Erkrankung wurde erstmals 1872 von George Huntington beschrieben (Huntington, 1872). Es handelt sich um eine autosomal dominante Erbkrankheit, die gewöhnlich in der späteren Lebenshälfte beginnt und einen fatalen Verlauf nimmt. Klinische Merkmale sind u.a. Chorea, Verlust mentaler Funktionen, Verhaltensauffälligkeiten und fortschreitender Verlust motorischer Fähigkeiten. Die Symptome verschlechtern sich fortwährend über 10-15 Jahre bis zum Tod. Neuropathologisch ist die Huntington'sche Erkrankung durch neuronalen Zellverlust vor allem im Striatum und in Teilen des cerebralen Cortex gekennzeichnet (Vonsattel et al., 1985). Charakteristisch sind intrazelluläre Einschlüsse in *post mortem*-Gehirnen von Patienten.

1.2.2.2. Genetische Aspekte

Ursache der Erkrankung ist die Verlängerung einer poly-CAG-Sequenz im Huntingtin-Gen. Der krankheitsassoziierte Genlocus IT-15 wurde 1983 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 lokalisiert (Gusella et al., 1983). 1993 konnte das Gen isoliert und identifiziert werden (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Das Huntingtin-Gen enthält 67 Exons und hat eine Ausdehnung von 170 kb (Ambrose et al., 1994), wobei die poly-CAG-Region im N-terminalen Exon1 lokalisiert ist. Unter normalen Bedingungen hat

die CAG-Sequenz eine Länge von 6-39 Wiederholungen, die expandierte Form enthält 36-250 Wiederholungen (Nance et al., 1999; Rubinsztein et al., 1996). Wie bei allen Polyglutaminerkrankungen besteht zwischen der Länge der CAG-Sequenz und dem Alter bei Ausbruch der Erkrankung eine inverse Beziehung, wohingegen die CAG-Länge mit dem Schweregrad der klinischen Symptome positiv korreliert (Andrew et al., 1993; Duyao et al., 1993). Juvenile Formen zeigen einen deutlich schwereren Verlauf, außer den für die Huntington'sche Erkrankung typischen Neuronenbereiche sind auch andere vom neuronalen Zellverlust betroffen. Die Huntington'sche Erkrankung wird autosomal dominant vererbt, es gibt jedoch einige Besonderheiten, die auf der genetischen Instabilität der poly-CAG-Region beruhen. So ist ein deutlicher Antizipationseffekt, d.h. eine Verlängerung der poly-CAG-Sequenz bei der Weitergabe an nachfolgende Generationen, zu beobachten (Ridley et al., 1988). Hierbei sind die poly-CAG-Sequenzen in der männlichen Meiose wesentlich unstabiler als in der weiblichen, weshalb die juvenilen Formen der Huntington'schen Erkrankungen hauptsächlich paternal vererbt werden (Ridley et al., 1988).

1.2.2.3. Neuropathologische Aspekte

Neuronaler Verlust findet vor allem im Striatum und in Teilen des cerebralen Cortex statt, in juvenilen Formen tritt auch Degeneration der Purkinjezellen des Cerebellums auf (Vonsattel et al., 1985).

Verschiedene Tiermodelle wurden etabliert, die einen Phänotyp ähnlich der Huntington'schen Erkrankung zeigen, u.a. in *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*. Das am besten untersuchte Mausmodell ist die R6/2-Linie, die ein N-terminales Fragment von Huntingtin mit verlängerter Polyglutaminsequenz exprimiert (Mangiarini et al., 1996). Die transgenen Tiere entwickeln nach ca. 2 Monaten einen Phänotyp mit motorischen Störungen, Verhaltensauffälligkeiten, Verkleinerung des Gehirns und Gewichtsverlust (Carter et al., 1999). Es gibt jedoch keine Anzeichen für Neurodegeneration bis zu einem Alter von ca. 12 Wochen (Mangiarini et al., 1996), erst danach beginnt Neurodegeneration (Turmaine et al., 2000). Außerhalb des ZNS wurde kein Zelltod beobachtet, allerdings sind die Muskelfibrillen durchgehend kleiner (Sathasivam et al., 1999). Degenerierende Neuronen enthalten im Allgemeinen intranukleäre Einschlüsse. Da die motorischen Störungen dem Zelltod vorausgehen, muss man davon ausgehen, dass der Phänotyp eher durch neuronale Dysfunktion als durch Neurodegeneration hervorgerufen wird. Ein weiteres Mausmodell mit Volllängen-Huntingtin mit expandierter poly-CAG-Sequenz, in

dem YACs (*yeast artificial chromosomes*) verwendet wurden (Hodgson et al., 1999), wurde etabliert. Hier zeigen die transgenen Tiere frühe elektrophysiologische Abnormalitäten, die der Aggregatbildung und dem neuronalen Zellverlust nach ca. 12 Monaten vorausgehen. Neurodegeneration wird dabei unabhängig von der Bildung von Aggregaten beobachtet. Dies deutet auf einen Pathogenitätsmechanismus hin, der unabhängig von Aggregation und Neurodegeneration ist.

.

1.2.2.4. Neuronale Einschlüsse

Charakteristisch in *post mortem*-Gehirnen in der Huntington'schen Erkrankung und in Tiermodellen sind intrazelluläre Einschlüsse. Auffällig sind große singuläre intranukleäre Einschlüsse (*neuronal intranuclear inclusion, NIIs*) von granulärer und fibrilllärer Struktur (Becher et al., 1998; DiFiglia et al., 1997), die ein ~40 kDa N-terminales Fragment von Huntingtin enthalten (DiFiglia et al., 1997). Man nimmt daher an, dass proteolytische Spaltung des Huntingtin-Proteins dessen Aggregation initiiert, ähnlich wie dies auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, z.B. der Alzheimer'schen Erkrankung beobachtet wurde. *NIIs*, die das jeweilige expandierte Protein enthalten, wurden auch in anderen Polyglutaminerkrankungen detektiert, wie z.B. in der Spinocerebellären Ataxie 3 (Paulson et al., 1997), in der Spinocerebellären Ataxie 1 (Skinner et al., 1997), in der Spinocerebellären Ataxie 7 (Holmberg et al., 1998), in der DRPLA und in der SBMA (Li et al., 1998). Die Verteilung der *NIIs* im Gehirn korreliert nicht mit der selektiven Neuropathologie (Gutekunst et al., 1999), was gegen einen kausalen Zusammenhang von intranukleären Einschlüssen und Zelltod spricht.

Zusätzlich zu den intranukleären Einschlüssen lassen sich in der Huntington'schen Erkrankung auch extranukleäre Aggregate beobachten. Es wurden neuropile Aggregate (Gutekunst et al., 1999) und dystrophische neuritische Einschlüsse (DNIs) (DiFiglia et al., 1997) beschrieben, wobei die dystrophischen neuritischen Einschlüsse wahrscheinlich eine Untergruppe der neuropilen Aggregate darstellen. Sie sind in Neuriten, myelinisierten Axonen und Nervenenden lokalisiert und enthalten wie die intranukleären Einschlüsse Huntingtin (Gutekunst et al., 1999). Weder in der SBMA, in der DRPLA noch in einer der Spinocerebellären Ataxien wurden außerhalb des Zellkerns Einschlüsse beobachtet.

Neuronale Einschlüsse wurden auch in verschiedenen Tiermodellen beobachtet. So wurden in der Mauslinie R6/2 sowohl intranukleäre Einschlüsse als auch neuropile Aggregate detektiert (Davies et al., 1997; Li et al., 1999). Die Bildung von mikroskopisch sichtbaren

Einschlüssen geht dabei den neurologischen Symptomen voraus. Intranukleäre Einschlüsse beschränken sich nicht auf Neuronen, sondern sind auch in anderen postmitotischen Zellen nachzuweisen (Sathasivam et al., 1999), die Bildung der Einschlüsse erfordert also keine neuronenspezifischen Faktoren. Nicht detektierbar sind sie hingegen in Astrocyten, Oligodendrocyten oder Mikrogliazellen (Davies et al., 1997). In einem weiteren transgenen Mausmodell, das Volllängen-Huntingtin mit verlängerter Polyglutaminsequenz exprimiert (Reddy et al., 1998), wurden intranukleäre Einschlüsse vor allem im Striatum und Cortex beobachtet.

1.2.2.5. Zelluläre Funktionen von Huntingtin

Huntingtin ist ein lösliches cytosolisches ~360 kDa-Protein, das ubiquitär exprimiert wird, vor allem aber im Gehirn (Landwehrmeyer et al., 1995; Li et al., 1993; Sharp et al., 1995; Strong et al., 1993). Innerhalb des Gehirns wird Huntingtin hauptsächlich in Neuronen gefunden, aber auch in Gliazellen ist es schwach nachweisbar (Strong et al., 1993). Im Striatum, dem am stärksten von Neurodegeneration betroffenen Gehirnareal, ist keine Anreicherung von Huntingtin zu beobachten (Sharp et al., 1995). Die Verteilung der Expression des expandierten Proteins ist vergleichbar mit der des nichtexpandierten (Landwehrmeyer et al., 1995). Die Huntingtin-Expression korreliert also nicht mit der beobachteten Neurodegeneration, weshalb man davon ausgeht, dass nicht das Expressionsniveau den Grund für die selektive Neurodegeneration darstellt. Innerhalb der Neuronen ist Huntingtin vor allem im Zellkörper, in Dendriten und Nervenenden zu finden (DiFiglia et al., 1995; Sharp et al., 1995). Normalerweise ist Huntingtin cytosolisch, man findet es auch lose assoziiert mit Vesikeln und dem Cytoskelett (DiFiglia et al., 1995; Sharp et al., 1995).

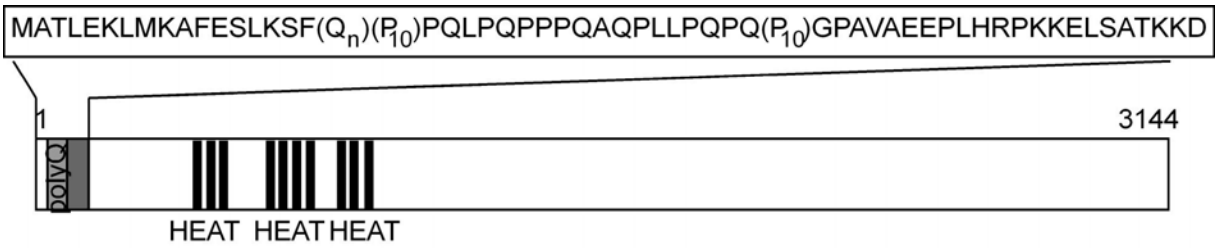

Abb. 1-5: Domänenstruktur von Huntingtin. N-terminal befindet sich die polyglutamin-und polyprolinreiche Region. (verändert nach Harjes und Wanker, 2003)

Das Huntingtin-Gen besitzt 67 Exons, wobei das N-terminale Exon1 die Polyglutamin-region enthält (Harjes and Wanker, 2003). In höheren Vertebraten enthält Exon1 außerdem eine prolinreiche Region, die möglicherweise zur Löslichkeit des Proteins beiträgt. Außerdem könnte die prolinreiche Region Wechselwirkungen mit anderen Proteinen vermitteln, z.B. mit WW-Domänen-Proteinen. Weiterhin enthält Huntingtin einige HEAT-Motive, die in Vertebraten-Huntingtin konserviert sind und in drei *Clustern* angeordnet sind. C-terminal enthält Huntingtin eine NES (*nuclear export signal*)-Sequenz und eine weniger aktive NLS (*nuclear localization signal*)-Sequenz; dies ist konsistent mit einer möglichen Funktion im Transport vom Nukleus in das Cytoplasma (Cornett et al., 2005; Xia et al., 2003). Huntingtin enthält einige Protease-Schnittstellen. So gibt es einige in Vertebraten-Huntingtin konservierte Caspase-Schnittstellen. Außerdem wurden funktionell aktive Calpain-Schnittstellen für Maus- und humanes Huntingtin beschrieben. Huntingtin kann auch post-translational modifiziert werden: die N-terminalen Lysine K6, K9 und K15 können ubiquitiniert (Kalchman et al., 1996) oder sumoyliert vorliegen (Steffan et al., 2004). Phosphorylierung an Ser421 und Ser434 beeinflusst Spaltung und Toxizität und ist in der Huntington'schen Erkrankung verändert (Humbert et al., 2002; Luo et al., 2005; Warby et al., 2005). Auch eine Palmytoylierung von Huntingtin wurde beschrieben (Huang et al., 2004). Dies ist konsistent mit einer möglichen Rolle im vesikulären Transport.

Huntingtin-*knock out*-Mäuse (Hdh $^{-/-}$) sterben als Embryonen vor dem Tag 8,5 (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995), also vor Gastrulation und der Bildung des Nervensystems. Dies deutet auf eine wichtige Funktion in der Embryonalentwicklung hin. Die verlängerte Polyglutaminsequenz im mutierten Huntingtin hat keinen Einfluss auf die Funktion in der Entwicklung, da homozygote Patienten eine normale Entwicklung zeigen (Wexler et al., 1987). Expression des pathogenen Huntingtin mit verlängerter Polyglutamin-sequenz kann in Hdh$^{-/-}$-Mäusen sogar den Phänotyp aufheben (Leavitt et al., 2001). Nach der Gastrulation wird Huntingtin für die Neurogenese wichtig. Mäuse, die weniger als 50% der Gendosis von Wildtyp-Huntingtin tragen, zeigen Defekte im Epiblast und dadurch eine reduzierte Neurogenese und eine Fehlbildung des Cortex und Striatums (White et al., 1997).

Huntingtin hat in der Zelle mehrere Funktionen (Cattaneo et al., 2005; Harjes and Wanker, 2003). Eine wichtige Funktion ist die antiapoptotische Wirkung. So zeigt Huntingtin in Gehirnzellen, die apoptotischen Stimuli ausgesetzt sind, eine neuroprotektive Wirkung (Rigamonti et al., 2000). Auch *in vivo* schützt Überexpression von Wildtyp-Huntingtin vor Excitotoxicität (Leavitt et al., 2006). Huntingtin kontrolliert die Produktion von BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), einem für das Überleben der striatalen Neuronen wichtigen

neurotrophischen Faktor. BDNF reguliert die Glutamat-Freisetzung an corticostriatalen Synapsen und trägt somit zur Excitotoxizität bei. Nur Wildtyp-Huntingtin stimuliert die corticale BDNF-Produktion, nicht jedoch mutiertes Huntingtin mit verlängerter Polyglutaminsequenz (Zuccato et al., 2001; Zuccato et al., 2003). Wildtyp-Huntingtin fördert außerdem den vesikulären Transport von BDNF entlang von Mikrotubuli, während mutiertes Huntingtin den BDNF-Transport blockiert (Gauthier et al., 2004). Diese Stimulation des vesikulären Transports geschieht u.a. durch eine Interaktion von Huntingtin mit HAP1 (*huntingtin associated protein 1*) (Li et al., 1995) und der p150(Glued)-Untereinheit von Dynactin (Engelender et al., 1997; Gauthier et al., 2004).

Weitere Interaktionspartner von Huntingtin können Aufschluss über dessen physiologische Rolle geben. So ist HIP1 (*huntingtin interacting protein 1*) (Kalchman et al., 1997; Wanker et al., 1997) an cytoskeletalen und Membran-Interaktionen beteiligt. Die Stärke der Interaktion verringert sich hierbei mit zunehmender Polyglutaminlänge. Weiterhin bindet Huntingtin an HIP-2 (E2-25K), ein ubiquitin-konjugierendes Enzym (Kalchman et al., 1996).

Über seine prolinreiche Region kann Huntingtin mit WW-Domänen in zahlreichen Proteinen interagieren (Faber et al., 1998). Außerdem wurden Interaktionen mit SH3-enthaltenden Proteinen detektiert, z.B. mit SH3GL3 (Sittler et al., 1998), das an clathrinvermittelter Endocytose beteiligt ist, oder mit PSD95, einem Schlüsselmolekül in der synaptischen Transmission, das an den NMDA (*N-methyl-D-aspartate*)- und den Kainat-Rezeptor an der postsynaptischen Membran bindet. Für mutiertes Huntingtin wurde eine reduzierte Interaktion mit PSD95 gezeigt, was zu einer Überaktivierung oder Sensitivierung der NMDA-Rezeptoren und damit zu Excitotoxizität führt. Überexpression von Wildtyp-Huntingtin reduziert die neuronale Toxizität, die durch den NMDA-Rezeptor und mutiertes Huntingtin induziert wird (Sun et al., 2001).

Huntingtin interagiert mit CBP (CREB *binding protein*) und p53 (Steffan et al., 2000), was auf eine Rolle in der Transkriptionsregulation hindeutet, mit GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), die eine wichtige Funktion im Energiemetabolismus hat (Burke et al., 1996) sowie mit der Cystathion-β-Synthetase (Boutell et al., 1998), die im Aminosäuremetabolismus beteiligt ist.

In letzter Zeit wurden zusätzliche Huntingtin-Interaktionspartner identifiziert, auf die hier nicht vollständig eingegangen werden kann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es Hinweise für eine Rolle von Huntingtin in der transkriptionellen Regulation, im vesikulären Transport, im Metabolismus und in der Signaltransduktion gibt.

1.2.3. Pathogenitätsmechanismen

Allen amyloiden neurodegenerativen Erkrankungen gemeinsam ist die Ausbildung amyloider extrazellulärer Plaques oder intrazellulärer Einschlüsse. Auch Proteine, die nicht krankheitsassoziiert sind, können unter bestimmten Bedingungen amyloide Aggregate ausbilden, die cytotoxische Wirkung haben (Bucciantini et al., 2002). Dies führte zu der Hypothese, dass amyloide Aggregate oder die fehlgefalteten Proteine an sich toxisch wirken und deutet auf einen gemeinsamen Toxizitätsmechanismus hin, der in der Struktur der fehlgefalteten Proteine oder Aggregate begründet liegt. Mehrere Hypothesen für die Toxizitätsvermittlung wurden vorgeschlagen. Darunter fallen Mechanismen wie z.B. Entzündungsreaktionen, Excitotoxizität und mitochondrielle Dysfunktion, die zum Zelltod führen. Weitere Mechanismen, die spezifisch für das jeweilige krankheitsauslösende Protein sind, könnten zusätzlich eine Rolle spielen. Die molekularen Mechanismen, die zu neuronaler Dysfunktion und Neurodegeneration führen, sollen im Folgenden erläutert werden.

Grundsätzlich gibt es in Fehlfaltungserkrankungen zwei Möglichkeiten für Toxizität. Die Fehlfaltung kann einen toxischen Funktionsverlust bewirken (*loss of function*) oder neue toxische Eigenschaften hervorbringen (*gain of function*). Im Falle der Huntington'schen Erkrankung sprechen viele experimentelle Befunde für eine *gain of function*-Mutation. So konnte z.B. durch ektopische Expression einer expandierten Polyglutaminsequenz im hprt-Gen (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) im Mausmodell ein neurologischer Phänotyp erzeugt werden (Ordway et al., 1997). Dies spricht dafür, dass Toxizität durch die Polyglutaminsequenz selbst vermittelt wird. Für die Spezifität des neuronalen Zellverlusts ist allerdings der Sequenzkontext verantwortlich, da in der hprt-Maus kein selektiver neuronaler Zellverlust festgestellt wurde. Ein weiterer Hinweis für eine *gain of function*–Mutation ist, dass es keine Unterschiede in der Schwere und im Verlauf der Erkrankung zwischen homozygoten und heterozygoten Patienten gibt (Wexler et al., 1987). *Knock out*-Modelle zeigen keinen neuropathologischen Phänotyp. Da Wildtyp-Huntingtin aber eine neuroprotektive Wirkung hat, ist es vorstellbar, dass ein Verlust dieser Funktion sich zusätzlich verschlechternd auf die Erkrankung auswirkt.

1.2.3.1. Aggregation und Toxizität

Das Auftreten intrazellulärer Einschlüsse ist ein wichtiges Charakteristikum in der Huntington'schen Erkrankung. Die Anzahl der neuronalen Einschlüsse im Patientengehirn

und die Schwere der Erkrankung korreliert mit der Länge der exprimierten Polyglutaminsequenz (Becher et al., 1998). Neuronale Einschlüsse treten bei Patienten auf und in transgenen Linien, die neurologische Symptome zeigen, nicht jedoch in asymptomatischen Linien; dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Aggregatbildung und der neurologischen Symptomatik hin. Die Bildung neuronaler Einschlüsse beginnt dabei vor dem Auftreten neurologischer Symptome; deshalb vermutete man, dass die neuronalen Einschlüsse Ursache für den pathologischen Phänotyp sind (Davies et al., 1997).

Allerdings gibt es Hinweise, dass der Prozess der Aggregatbildung toxisch wirkt, nicht aber die reifen Aggregate selbst. So resultierte die regulierte Expression von Huntingtin-Exon1 in einem konditionalen transgenen Mausmodell in einem neurologischen Phänotyp mit intrazellulären Einschlüssen, die Symptome verschwanden jedoch nach Abschalten der Expression, nachdem bereits Aggregate gebildet waren (Yamamoto et al., 2000). Es gab noch weitere Hinweise, dass nicht die Einschlüsse selbst toxisch sind. So konnte nicht immer ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten intranukleärer Aggregate und Zelltod gefunden werden. In einem zellulären Modell wurden zwar intranukleäre Aggregate beobachtet, diese korrelierten aber nicht immer mit Toxizität (Saudou et al., 1998). Umgekehrt zeigte ein Mausmodell für SCA1 zwar Purkinjezell-Pathologie und Ataxie, jedoch keine Ataxin-1-Aggregate (Klement et al., 1998). Durch Inhibition konnte in einigen Fällen die Zahl der Aggregate reduziert werden, die Toxizität wurde jedoch sogar verstärkt (Cummings et al., 1999), in anderen Fällen konnte Neurodegeneration *in vivo* unterdrückt werden, dies hatte aber keine Auswirkung auf das Auftreten intranukleärer Einschlüsse (Warrick et al., 1999). Auch bei anderen neurodegenerativen Nicht-Polyglutaminerkrankungen wurden frühe Stadien im Aggregationsprozess als toxische Stadien beschrieben: so führen in der Alzheimer'schen Erkrankung lösliche Oligomere des Aβ-Peptids, nicht die Monomere oder Fibrillen zu einer Inhibition der Langzeit-Potenzierung (Walsh et al., 2002).

Es wird auch diskutiert, dass die Bildung von intrazellulären Einschlüssen als Schutzmechanismus der Zelle funktionieren könnte, da die tatsächlich toxische Spezies in ihnen inaktiviert wird. Tatsächlich verbesserte in einem Zellkulturmodell die Bildung von Einschlüssen die Überlebenswahrscheinlichkeit der Neuronen (Arrasate et al., 2004).

Für die Toxizität scheint die subzelluläre Lokalisation des mutierten Proteins eine große Rolle zu spielen. So war in einem SCA1-Mausmodell die Kernlokalisation kritisch für die Ausbildung der Symptome (Klement et al., 1998). Auch im Zellkulturmodell für die

Huntington'sche Erkrankung war die Kernlokalisation von Huntingtin für die Induktion der Neurodegeneration essentiell (Saudou et al., 1998).

Zusammenfassend kann man sagen, dass nicht so sehr die großen Aggregate toxisch wirken als vielmehr kleinere oligomere Intermediate, große Aggregate könnten sogar eine Schutzfunktion haben.

1.2.3.2. Spaltung von Huntingtin

In intranukleären Einschlüssen in *post mortem*-Gehirnen von Huntington-Patienten wurde ein N-terminales ~40 kDa Huntingtin-Fragment nachgewiesen (DiFiglia et al., 1997). Dies spricht dafür, dass erst Spaltung des löslichen Huntingtin ein pathogenes Fragment freisetzt, ähnlich wie dies z.B. in der Alzheimer'schen Erkrankung der Fall ist. In einigen Zellkulturmodellen zeigten N-terminale Fragmente Aggregation und erhöhte Cytotoxizität, nicht jedoch Volllängenprotein (Cooper et al., 1998). Auch in anderen zellulären Modellen konnte eine inverse Korrelation der Proteinlänge mit dem Potential zur Aggregation und Cytotoxizität nachgewiesen werden (Hackam et al., 1998; Martindale et al., 1998). Ein Mausmodell, das ein N-terminales Huntingtin-Fragment exprimiert (Mangiarini et al., 1996) zeigt Verhaltensdefizite und neuronale Einschlüsse, wobei der Phänotyp schneller fortschreitet als in einem Mausmodell, das Volllängenprotein exprimiert. Dies spricht für einen Mechanismus, bei dem die toxischen Fragmente durch proteolytische Spaltung freigesetzt werden (*toxic fragment hypothesis*).

Huntingtin besitzt mehrere Protease-Schnittstellen. Eine wichtige Rolle spielt proteolytische Spaltung durch Caspasen, Cysteinproteasen, die eine zentrale Funktion in der Apoptose haben (Goldberg et al., 1996). Durch Caspase-Spaltung können *in vitro* Fragmente von definierter Größe gebildet werden, wobei in Patientengehirnen ein N-terminales Fragment detektiert wurde, das dem durch Caspase-3-Spaltung generierten entspricht (Kim et al., 2001; Wellington et al., 2002). Dieses ist schon vor Beginn der Neurodegeneration vorhanden (Wellington et al., 2002), Spaltung durch Caspasen scheint also eher der Auslöser der Erkrankung zu sein als die Folge von apoptotischem Zelltod. Es wurden Schnittstellen für verschiedene Caspasen identifiziert. Zusätzlich kann Huntingtin auch durch Calpaine gespalten werden. Calpaine sind Ca^{2+}-abhängige Cysteinproteasen. Die Fragmente, die durch Spaltung durch eine Calpain-Kaskade entstehen, sind kleiner als die, die durch Caspase-Spaltung entstehen (Gafni and Ellerby, 2002), und könnten einem der Hauptfragmente in der Huntington'schen Erkrankung entsprechen. Es ist aber durchaus möglich, dass mehrere

Proteasen zusammenwirken. Durch Caspase gespaltene Huntingtin-Fragmente könnten auch nachfolgend durch Calpaine geschnitten werden (Kim et al., 2001). Verschiedene andere Proteasen könnten ebenso involviert sein (Lunkes et al., 2002). Durch Caspase-Inhibitoren konnte Toxizität und Aggregatbildung vermindert werden (Wellington et al., 2000), ebenso durch Inhibition der Calpaine (Gafni et al., 2004). Ein Teil der proteolytischen Spaltung von Huntingtin könnte einen physiologischen Prozess darstellen, allerdings wird z.B. Spaltung durch Caspasen durch die Polyglutaminlänge verstärkt (Goldberg et al., 1996). Aktiviertes Calpain wurde nur im Caudatum von Huntington-Patienten gefunden (Gafni and Ellerby, 2002). Durch proteolytische Spaltung werden toxische Fragmente generiert, die eine erhöhte Aggregationsneigung und möglicherweise veränderte Interaktionsmöglichkeiten mit zellulären Proteinen zeigen.

1.2.3.3. Sequestrierung von zellulären Komponenten

In neuronalen Einschlüssen von Huntington-Patienten wurde vor allem ein N-terminales Fragment von Huntingtin gefunden. Aber die neuronalen Einschlüsse enthalten auch noch andere Proteine. Zum einen findet man dort Proteine der Faltungs- und Abbaumaschinerie, z.B. Ubiquitin, Untereinheiten des 19S und 20S Proteasoms und einige molekulare Chaperone (Chai et al., 1999b; Cummings et al., 1998; Davies et al., 1997). Andere Proteine, die häufig in neuronalen Einschlüssen gefunden werden, sind Transkriptionsfaktoren, z.B. TBP (*TATA binding protein*), CBP (*CREB binding protein*) und Sp1 (McCampbell et al., 2000; Nucifora et al., 2001; Suhr et al., 2001). Diese Transkriptionsfaktoren besitzen selbst nichtpathogene Polyglutaminsequenzen oder glutaminreiche Domänen. Sie können mit löslichem Polyglutaminprotein polyglutaminabhängige Interaktionen eingehen und coaggregieren, was die Menge an löslichen Transkriptionsfaktoren vermindert und damit die Transkription beeinflusst.

Tatsächlich wurde in zahlreichen Polyglutaminerkrankungen eine Veränderung der Transkription beobachtet (Luthi-Carter et al., 2002; Luthi-Carter et al., 2000; Sugars et al., 2004; Wyttenbach et al., 2001). Doch obwohl Transkriptionsfaktoren in Einschlüssen angereichert sind und auch *in vitro* mit Polyglutaminproteinen coaggregieren, sind diese nicht irreversibel sequestriert, sondern sind dynamische Komponenten der Aggregate, jedoch mit eingeschränkter Mobilität (Kim et al., 2002; Schaffar et al., 2004; Stenoien et al., 2002; Yu et al., 2002). Veränderte Genexpression scheint also eher durch eine Fehlinteraktion von löslichem Polyglutaminprotein mit den Transkriptionsfaktoren zu entstehen als durch

Verringerung der zur Verfügung stehenden Transkriptionsfaktoren. Dabei interagiert ein lösliches monomeres Huntingtin-Fragment mit TBP (Schaffar et al., 2004). Zusätzlich zur polyglutaminvermittelten Interaktion gibt es aber auch Hinweise auf andere Mechanismen, die zur transkriptionellen Dysregulation führen. So interagieren z.B. lange Polyglutaminsequenzen mit $TAF_{II}130$, einem positiven Regulator der CREB-vermittelten Transkription, obwohl dieser keine Polyglutaminsequenz besitzt. Außerdem wird eine Inhibition der Histon-Acetyltransferase (HAT)-Aktivität von CBP diskutiert. Möglicherweise führen mehrere Mechanismen zu einer Dysregulation der Transkription und damit zu Toxizität.

Das Proteasom spielt eine besondere Rolle in Polyglutaminerkrankungen. Als Werkzeug der Proteindegradation ist es zuständig für den Abbau fehlgefalteter Proteine. Dies könnte sein Vorkommen in den Aggregaten erklären. Inhibition des Proteasoms fördert die Bildung von Polyglutamineinschlüssen (Chai et al., 1999b; Cummings et al., 1999; Waelter et al., 2001). Andererseits werden Polyglutaminproteine mit verlängerter Polyglutaminsequenz vom Proteasom schlechter abgebaut (Cummings et al., 1999; Holmberg et al., 2004), obwohl sie ubiquitiniert sind (Cummings et al., 1999; Kalchman et al., 1996). Aggregierte Proteine blockieren das Ubiquitin-Proteasom-System und somit den Abbau anderer Proteine (Bence et al., 2001) und rekrutieren das Proteasom in die Aggregate (Holmberg et al., 2004).

Mutiertes Huntingtin mit expandierter Polyglutaminsequenz kann auch Wildtyp-Huntingtin mit normaler Polyglutaminlänge in Aggregate rekrutieren (Kazantsev et al., 1999). Im Unterschied zur Rekrutierung von anderen zellulären Faktoren ist diese Interaktion jedoch stabil und verändert die Struktur der amyloiden Fibrillen nicht (Schaffar et al., 2004). Dies könnte bei heterozygoten Patienten dazu führen, dass zusätzlich ein Funktionsverlust von Wildtyp-Huntingtin auftritt, was mit zur Toxizität beitragen könnte.

Diese verschiedenen Hypothesen zur Toxizität schließen sich nicht aus, vielmehr könnten mehrere Mechanismen zur Toxizität beitragen. Symptomatisch ist nicht nur Neurodegeneration, sondern auch neuronale Dysfunktion. Beide könnten durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden. Fest steht jedoch, dass es nicht genügt, die Endprodukte der Aggregation zu betrachten, da Toxizität auch durch Intermediate vermittelt wird. Im Folgenden möchte ich genauer auf den Mechanismus der Aggregation und die Struktur der Aggregate eingehen.

1.3. Amyloide Aggregate

1.3.1. Struktur amyloider und amyloid-ähnlicher Aggregate

Allen neurodegenerativen Erkrankungen gemeinsam ist die Ausbildung von sogenannten amyloiden Einschlüssen, entweder in Form von extrazellulären Plaques wie z.B. in der Alzheimer'schen Erkrankung oder als intrazelluläre Einschlüsse z.B. in der Huntington'schen Erkrankung. Dabei beschränkt sich die Fähigkeit, amyloide Strukturen auszubilden, keineswegs auf krankheitsauslösende Proteine, sondern stellt vielmehr eine allgemeine Eigenschaft von Proteinen dar (Lansbury, 1999; Stefani and Dobson, 2003). Amyloide Strukturen konnten z.B. mit Acylphosphatase (Chiti et al., 1999) und der SH3-Domäne (PI3-SH3) der p85α-Untereinheit der bovinen Phosphatidylinositol-3-Kinase gebildet werden (Guijarro et al., 1998). Dabei neigen die globulären Proteine unter Bedingungen zur Aggregation, die eine partiell entfaltete Konformation begünstigen. Die Fähigkeit zur Bildung amyloider Strukturen stellt somit eine allgemeine Eigenschaft von Proteinen dar. Es wurde auch vorgeschlagen, dass die Ausbildung amyloider Fibrillen bei einigen Proteinen eine physiologische Funktion hat (Chiti and Dobson, 2006).

1.3.1.1. Amyloide Aggregate in neurodegenerativen Erkrankung

Ursprünglich wurde der Name Amyloid für die extrazellulären Proteinablagerungen, wie sie in der Alzheimer'schen Erkrankung und in systemischen amyloiden Störungen gefunden werden, geprägt. Inzwischen wurde der Begriff aber auch auf intrazelluläre Einschlüsse erweitert (Soto, 2003). Obwohl die Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen löslichen monomeren amyloidogenen Proteine keinerlei Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz haben, besitzen die amyloiden Ablagerungen einige charakteristische Gemeinsamkeiten: Sie lassen sich mit dem Diazofarbstoff Congorot färben und zeigen dabei eine typische grüne Doppelbrechung und Rotverschiebung des Absorptionsspektrums (Klunk et al., 1989; Puchtler and Sweat, 1965). Außerdem binden sie an Thioflavin S und Thioflavin T und verändern deren Fluoreszenzspektren. Amyloide Aggregate sind unlöslich und mehr oder weniger resistent gegen proteolytische Degradation. Sie besitzen einen hohen β-Faltblatt-Anteil (Bouchard et al., 2000).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Cohen and Calkins, 1959; Shirahama and Cohen, 1967; Sunde and Blake, 1997) und Rasterkraftmikroskopie (AFM: *atomic force microscopy*)-Analysen (Stine et al., 1996) zeigten, dass sie aus Aggregaten mit fibrillärer Morphologie bestehen, die gerade und unverzweigt sind, einen Durchmesser von ungefähr 75-80 Å haben und 0,1 – 10 μm lang sind. Sie bestehen aus fünf bis sechs Protofibrillen von ungefähr 25-30 Å Durchmesser, die parallel angeordnet sind (Shirahama and Cohen, 1967).

Röntgenstrukturanalysen zeigen ein charakteristisches Beugungsmuster mit einer intensiven 4,5-4,7 Å-meridionalen Reflexion und einer diffuseren 9,8-10,0 Å-äquatorialen Reflexion (Abb. 1-6A). Dieses Beugungsmuster ist typisch für die sogenannte Kreuz-β-Struktur (Eanes and Glenner, 1968; Stromer and Serpell, 2005; Sunde et al., 1997), bei der die β-Stränge senkrecht zur Fibrillenachse angeordnet sind. Stabilisiert wird diese Struktur durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hauptkettenamiden parallel zur Fibrillenachse. Dabei entspricht die 4,5-4,7 Å-meridionale Reflexion den Abständen der β-Stränge, die 9,8-10,0 Å-äquatoriale Reflexion entspricht dem Abstand zwischen den verschiedenen β-Faltblättern, an der Struktur müssen daher mindestens zwei β-Faltblätter beteiligt sein. Spätere Röntgenstrukturanalysen mit Synchrotron-Strahlung bestätigten die Kreuz-β-Struktur und zeigten außerdem, dass die β-Stränge kein flaches β-Faltblatt bilden, sondern um 15° gegeneinander verdreht sind, ein Faltblatt aus sechs Strängen würde also eine 90°-Umdrehung durchlaufen. In einem verfeinerten Modell wurde deshalb vorgeschlagen, dass die β-Faltblätter eine Helix entlang der Fibrillenachse bilden, wobei 24 β-Stränge eine Umwindung darstellen (Sunde et al., 1997).

Amyloide verschiedener Herkunft aus verschiedenen amyloidogenen Proteinen zeigen fast identische Beugungsmuster, besitzen also eine gemeinsame Kernstruktur. Das Vorhandensein einer gemeinsamen Kernstruktur wird durch einige Antikörper (WO1 und WO2) bestätigt, die die amyloiden oder amyloid-ähnlichen Formen verschiedener Proteine erkennen, u.a. Aβ-Fibrillen, Transthyretin-Fibrillen und Polyglutaminfibrillen, nicht aber deren lösliche, monomere Form (O'Nuallain and Wetzel, 2002). Dies bedeutet, dass es gemeinsame Strukturmerkmale geben muss, die der Antikörper erkennt. Dass an der Ausbildung der Kreuz-β-Struktur nur das Polypeptidrückgrat beteiligt ist, nicht jedoch die Seitenketten, weist ebenfalls auf eine allgemeine Eigenschaft aller Polypeptidketten hin. Die Unterschiede, die zwischen den verschiedenen amyloiden Fibrillen bestehen, lassen sich hingegen auf die jeweilige Aminosäuresequenz und damit auf die Eigenschaften der Seitenketten der jeweiligen Proteine zurückführen. Besonders in Polyglutaminfibrillen ergibt

sich als Besonderheit, dass auch die Seitenketten Wasserstoffbrücken ausbilden können. Die Struktur der amyloid-ähnlichen Polyglutaminfibrillen könnte sich also stärker von der Struktur klassischer amyloider Fibrillen unterscheiden. Dies zeigt sich auch darin, dass im Röntgenkristallogramm die charakteristische 9,8-10,0 Å-äquatoriale Reflexion fehlt.

Neuere elektronenmikroskopische Studien befassen sich mit der strukturellen Hierarchie in den Amyloiden. Amyloide Fibrillen sind aus mehreren Protofilamenten aufgebaut, die um einen Kern gewunden sind. Die genaue Anordnung und Anzahl der Protofilamente variiert jedoch je nach Amyloid (Serpell et al., 2000a; Serpell et al., 2000b). Abb.1-6B zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus von amyloiden Fibrillen.

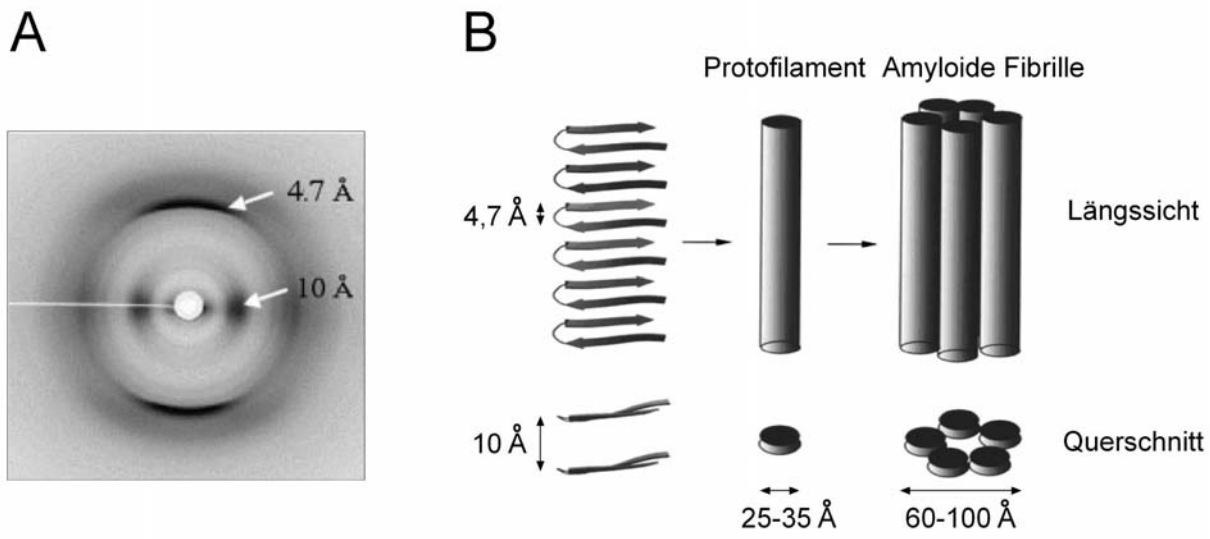

Abb. 1-6: Struktur einer amyloiden Fibrille. (A) Röntgenbeugungsmuster einer amyloiden Fibrille (Aβ42) (nach Stromer and Serpell, 2005). (B) Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus einer amyloiden Fibrille (nach Serpell et al., 2000a).

1.3.1.2. Struktur von Polyglutamin-Aggregaten

Zur Strukturbestimmung von Polyglutaminaggregaten wurden zum einen synthetische Polyglutaminpeptide, die durch geladene flankierende Aminosäuren in Lösung gebracht wurden (Chen et al., 2001), verwendet, zum anderen ein Fusionsprotein aus GST und Huntingtin-Exon1 (Htt-Exon1) mit verschiedenen Polyglutaminlängen (Scherzinger et al., 1997). Der GST-Fusionspartner erhöht dabei die Löslichkeit des Htt-Exon1, mit bis zu 52 Glutaminen ist es als lösliches Protein in *E.coli* exprimierbar. Nach proteolytischer Abspaltung des GST aggregiert Htt-Exon1, wenn die Anzahl der Glutamine über 36 liegt (Scherzinger et al., 1997). Dieser Schwellenwert korreliert erstaunlich gut mit dem pathologischen Schwellenwert, der in Huntington-Patienten beobachtet wird.

Polyglutaminaggregate weisen eine Reihe von Eigenschaften auf, die für amyloide Aggregate typisch sind (Chen et al., 2002a). So zeigen sie β-faltblattreiche Circulardichroismus-Spektren (Bevivino and Loll, 2001; Chen et al., 2002a). Fibrillen aus Polyglutaminpeptiden sind ca. 3 nm breit und ähneln somit den amyloiden Protofibrillen. Fibrillen, die *in vitro* aus Htt-Exon1 gebildet wurden, sind 10-12 nm breit und 100 nm lang und ähneln somit amyloiden Fibrillen (Scherzinger et al., 1997). *Ex vivo* Fibrillen aus R6/5-Mäusen beinhalten fibrilläre Strukturen mit einem Durchmesser von 5-10 nm mit bis zu 250 nm Länge (Scherzinger et al., 1997). Polyglutaminaggregate binden Thioflavin T und Congorot und zeigen bei Congorotbindung grüne Doppelbrechung (Scherzinger et al., 1997), wobei bei Fibrillen aus Peptiden mit kürzeren Polyglutaminsequenzen zwar Congorotbindung, aber keine grüne Doppelbrechung beobachtet wurde (Chen et al., 2002a).

Verschiedene Circulardichroismus- und Infrarotspektroskopie-Studien beschäftigten sich mit der Sekundärstruktur der löslichen expandierten oder nichtexpandierten Polyglutaminsequenz (Ross et al., 2003). Fast alle fanden für expandierte Polyglutaminsequenzen im monomeren Zustand eine zufällige (*random coil*) Konformation (Altschuler et al., 1997; Masino et al., 2002), im aggregierten Zustand eine β-Struktur. Sharma et al. dagegen erhielten für Polyglutaminsequenzen eine β-Struktur (Sharma et al., 1999). Für Ataxin-3 mit expandierter Polyglutaminregion wurde im Vergleich zu nichtexpandiertem Ataxin-3 ein niedrigerer Anteil an α-helikaler Struktur und dafür ein höherer Anteil an zufälliger (*random coiled*) Struktur festgestellt (Bevivino and Loll, 2001). In den Aggregaten war dagegen ein hoher β-Faltblattanteil zu beobachten (Bevivino and Loll, 2001).

Um die Struktur der Aggregate im Detail zu analysieren, wurden verschiedene experimentelle Methoden und Simulationstechniken eingesetzt. Mehrere Modelle wurden vorgeschlagen (Masino and Pastore, 2001), u.a. eine parallele oder antiparallele β-Faltblatt-Struktur, eine α-Helix und eine π-Helix (Lathrop et al., 1998). Auch eine annuläre Struktur (Marchut and Hall, 2006) und ein membran-depolarisierender Ionenkanal aus einer rechtshändigen Helix mit einer Pore von 6,6 Å, genannt μ-Helix, wurde vorgeschlagen (Monoi, 1995). Diese Möglichkeit ist allerdings unwahrscheinlich, da die Aggregate intrazellulär lokalisiert sind.

Abgeleitet aus einer Röntgenstrukturanalyse (Abb.1-7A) schlug Max Perutz 1994 das Modell des molekularen Reißverschlusses (*polar zipper*) vor (Perutz et al., 1994) (Abb.1-7B). In diesem Modell sind antiparallele β-Stränge durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Seitenketten- und Hauptkettenamiden verbunden. 2002 schlug er ein überarbeitetes Modell

vor, das das Fehlen der 9,8-10,0 Å-äquatorialen Reflexion erklären sollte (Perutz et al., 2002). Das Modell sah eine wassergefüllte parallele β-Helix aus nur einem β-Faltblatt mit 20 Glutaminen pro Umdrehung vor, die durch Wasserstoffbrücken zwischen Haupt- und Seitenkettenamiden stabilisiert wird (Abb.1-7C). Dieses Modell könnte den pathologischen Schwellenwert erklären, da erst, wenn mindestens zwei Umdrehungen vollendet sind, die Helix stabilisiert werden kann, die dann einen Aggregationsnukleus bildet.

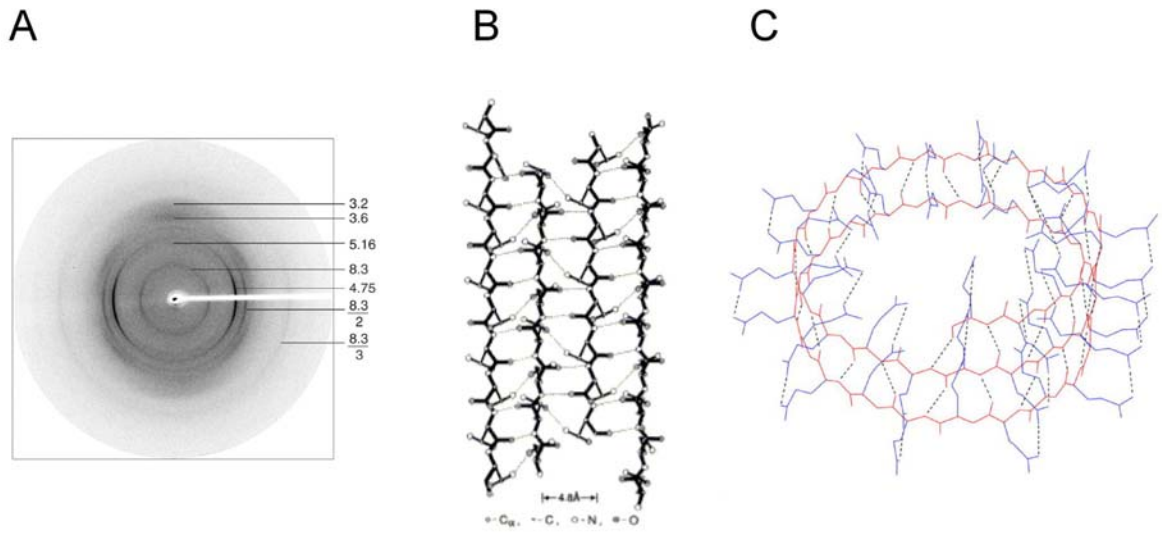

Abb. 1-7: Struktur einer Polyglutaminfibrille. (A) Röntgenbeugungsmuster einer Fibrille aus dem Peptid $D_2Q_{15}K_2$ (nach Perutz, 2002). (B) Reißverschluss (*Polar zipper*)- Modell (nach Perutz, 1994). (C) β-Helix-Modell (nach Perutz, 2002)

Dieses Modell beeinflusste die weitere Forschung stark und ist inzwischen sehr umstritten. Verschiedene Simulationsstudien beschäftigten sich theoretisch damit. Stork et al. stellten fest, dass eine solche wassergefüllte zirkuläre Helix nicht stabil wäre. Stattdessen schlagen die Autoren eine trianguläre Helix aus 18 Glutaminen pro Umdrehung vor, die durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird (Stork et al., 2005). Merlino et al. kamen zu dem Schluss, dass die stabilste Struktur abhängig von der Polyglutaminlänge ist. Bei sehr langen Polyglutaminsequenzen wäre eine wassergefüllte Helix stabil, bei kürzeren Sequenzen dagegen unstabil. Bei einer Polyglutaminlänge von 71 Glutaminen wäre die stabilste Form ebenfalls eine trianguläre Helix aus 18-21 Glutaminen pro Umdrehung (Merlino et al., 2006). In einer anderen Arbeit wurden die röntgenkristallographischen Ergebnisse neu interpretiert. Die Autoren ordneten eine 8,6 Å-Reflexion dem Abstand der β-Faltblätter zu und leiteten daraus eine kompakte kristalline Struktur ab, bei der die Faltblätter eng gestapelt sind (Sikorski and Atkins, 2005).

Weitere experimentelle Daten sprechen ebenfalls gegen das Modell einer wassergefüllten Helix. Durch eine Mutationsanalyse, bei der einzelne Glutamine durch eine Prolin-Glycin-Folge (Pro-Gly) ersetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Glutamine nicht äquivalent sind, sondern dass sie je nach Position durch Pro-Gly ersetzt werden können oder nicht. Ein antiparalleles β-Faltblatt aus sieben Glutaminen in einer Reihe und dann folgender Haarnadelschleife wäre nach dieser Analyse optimal (Thakur and Wetzel, 2002). Die Daten wären nicht konsistent mit einer zirkulären Helix, würden aber einer triangulären Helix mit 18 Glutaminen pro Umdrehung nicht wiedersprechen. In Säugerzellkultur und in primären corticalen Neuronen wurde die Mutationsanalyse bestätigt (Poirier et al., 2005). Sharma et al. fanden bei röntgenkristallographischen Untersuchungen eine scheibenartige β-Faltblattstruktur, wobei die Polyglutaminsequenz mehrere reverse Umkehrungen durchführen müsste (Sharma et al., 2005). Es existiert also eine Fülle von Modellen, welches der Wirklichkeit am ehesten entspricht, bleibt ein herausforderndes Ziel für die Zukunft.

1.3.2. Amyloidogenese

1.3.2.1. Kinetik der Aggregation

Da die Bildung von amyloiden Aggregaten charakteristisch für neurodegenerative Erkrankungen ist und der Prozess der Aggregation toxisch wirkt, ist es wichtig, den Vorgang der Bildung von Amyloiden im Detail zu verstehen. Verschiedene Studien analysierten die Kinetik der Fibrillogenese. Es wurde ein nukleationsabhängiger Polymerisationsmechanismus vorgeschlagen, wie er auch bei Kristallisationsprozessen und anderen biologischen Prozesse, z.B. der Assemblierung der viralen Hülle, der Mikrotubuli-Bildung oder der Flagellen-Bildung vorkommt (Harper and Lansbury, 1997; Jarrett and Lansbury, 1993). Ein nukleationsabhängiger Polymerisationsmechanismus ist charakterisiert durch eine langsame Nukleationsphase, in der in energetisch ungüngstigen Schritten der Nukleus gebildet wird. Danach folgt eine Wachstumsphase, die in eine Gleichgewichts (*Steady-State*)-Phase übergeht, in der der geordnete Aggregatszustand mit dem monomeren Zustand im Gleichgewicht ist. Bei einer einfachen nukleationsabhängigen Polymerisation findet Aggregation nicht unter einer bestimmten Proteinkonzentration, der kritischen Konzentration, statt. Charakteristisch ist eine *lag* (Verzögerungs)-Phase, die auftritt, wenn die Proteinkonzentration leicht über der kritischen Konzentration liegt. Es ist möglich, die *lag*-Phase zu verkürzen oder ganz zu

eliminieren, indem man vorgeformte Fibrillen als Polymerisationskeim (*seed*) hinzugibt, und so den zeitlimitierenden Faktor der energetisch ungünstigen Nukleus-Bildung umgeht.

Diese allgemeinen Kriterien einer nukleationsabhängigen Polymerisation konnten auf die Bildung von Aβ-Fibrillen, den am besten untersuchten amyloiden Fibrillen, angewendet werden (Harper and Lansbury, 1997). Für die Bildung von Aβ-Fibrillen ist eine kritische Konzentration nötig. Es wird eine *lag*-Phase beobachtet, deren Länge abhängig von der Proteinkonzentration ist. Die langsame Nukleationsphase kann durch Zugabe von Nukleationskeimen verkürzt werden. Die Bildung von Aβ-Fibrillen zeigt also alle Eigenschaften einer nukleationsabhängigen Polymerisation (Harper and Lansbury, 1997). Auch für die Fibrillogenese von α-Synuclein wurde ein nukleationsabhängiger Polymerisationsmechanismus vorgeschlagen (Wood et al., 1999).

Der Mechanismus der polyglutaminabhängigen Aggregation wurde in verschiedenen *in vitro*-Modellen untersucht. Die Aggregation von Polyglutaminpeptiden zeigt Konzentrations- und Längenabhängigkeit und eine *lag*-Phase, die durch Zugabe von Nukleationskeimen (*seeding*) verkürzt werden kann (Chen et al., 2002a). Dabei machen die Polyglutaminpeptide eine Konformationsänderung von einer *random coil*- zu einer β-Faltblatt-Konformation durch, wobei die Kinetik des Übergangs der Aggregationskinetik entspricht (Chen et al., 2002b). Dies spricht für einen einfachen nukleationsabhängigen Polymerisationsmechanismus, ohne Auftreten von Intermediaten. Interessanterweise ist der Nukleus monomer, d.h. die Bildung des Nukleus entspricht der Konformationsumlagerung des Monomers (Chen et al., 2002b). Der Nukleus ist ein alternativ gefalteter, hochenergetischer Zustand des Monomers. Konzentrations- und Längenabhängigkeit wurde auch mit dem GST-Htt-Exon1-Fusionsprotein gezeigt, auch die Möglichkeit, die *lag*-Phase durch s*eeding* zu verkürzen (Scherzinger et al., 1999). Die Nukleationsphase wird gefolgt von einer Elongationsphase. Es wurde ein zweiphasiger Wachstumsmechanismus vorgeschlagen, bei dem ein initialer reversibler Bindungsschritt (*docking*) von einem darauffolgenden geschwindigkeitsbestimmenden Rearrangement (*locking*) gefolgt wird (Berthelier et al., 2001)..

Bei der Analyse der polyglutaminabhängigen Aggregation durch Polyglutaminpeptide wurde nur die Polyglutaminsequenz an sich untersucht. Man geht jedoch davon aus, dass der Sequenzkontext eine nicht zu vernachlässigende Rolle in der Aggregation spielt (Duennwald et al., 2006). Die Polyglutaminregion im Huntingtin wird direkt gefolgt von einer auffälligen prolinreichen Sequenz. *In vivo* können prolinreiche Sequenzen Toxizität unterdrücken (Dehay

and Bertolotti, 2006; Duennwald et al., 2006). Um den Einfluss der prolinreichen Sequenz auf die Aggregation von Polyglutaminpeptiden zu testen, wurden Polyglutamin-Oligoprolin-Peptide synthetisiert. Einfügen einer C-terminalen Prolinsequenz aus mindestens fünf Prolinen verringerte die Geschwindigkeit der Bildung und die apparente Stabilität der amyloid-ähnlichen Aggregate und bestätigte damit die wichtige Rolle der prolinreichen Region (Bhattacharyya et al., 2006).

1.3.2.2. Intermediate

Wie bereits vorher erwähnt, spielen intermediäre Formen, die während der Aggregatbildung entstehen, eine wichtige Rolle in der Pathogenese (Caughey and Lansbury, 2003; Glabe, 2005; Lansbury, 1999; Rochet and Lansbury, 2000; Ross et al., 2003). Potentielle Inhibitoren, die die Bildung reifer Aggregate unterbinden, aber die Entstehung toxischer Intermediate zulassen, könnten deshalb einen ungewollten Effekt haben. Deshalb ist auch im Hinblick auf potentielle Therapeutika eine genaue Charakterisierung der Intermediate und des genauen Ablaufs der Fibrillogenese wichtig.

Für Aβ wurden mehrere oligomere Formen nachgewiesen, u.a. durch Gelfiltrations-chromatographie, Quasielastische Lichstreuungsspektroskopie, Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie (AFM: *atomic force microscopy*). So konnten oligomere Formen wie lösliche Aβ-Oligomere, sogenannte ADDLs (*Aβ-derived diffusible ligands*) (Lambert et al., 1998) und Protofibrillen identifiziert werden (Harper et al., 1997; Walsh et al., 1997). Protofibrillen binden Congorot und Thioflavin T und besitzen eine Sekundärstruktur, die für amyloide Fibrillen charakteristisch ist, sind jedoch SDS-löslich (Walsh et al., 1999). Sie erscheinen transient während der Fibrillogenese und wachsen weiter zu reifen Fibrillen (Harper et al., 1997; Walsh et al., 1997). Durch *Time-lapse*-AFM kann das Amyloid-Fibrillen-wachstum visualisiert werden: Protofibrillen (hier aus humanem Amylin) werden durch bidirektionales Wachstum elongiert (Goldsbury et al., 1999). Auch für α-Synuclein wurden verschiedene lösliche oligomere Spezies gefunden. So wurden sphärische und annuläre Protofibrillen beobachtet. Dabei sind die annulären Spezies membrangebunden und bilden ähnliche Strukturen wie porenbildende bakterielle Toxine aus. Dies führte zu der Hypothese, dass Toxizität durch Permeabilisierung der Membran durch Porenbildung vermittelt wird (Ding et al., 2002; Lashuel et al., 2002).

Lösliche Oligomere verschiedener amyloider Proteine besitzen gemeinsame Konformationseigenschaften, die für lösliche oligomere Spezies einzigartig sind. Ein

Antikörper (A11) gegen lösliche Oligomere von Aβ-Peptid erkennt auch lösliche Oligomere anderer amyloider Proteine, z.B. α-Synuclein, *Islet amyloid polypeptide* (IAPP), Polyglutamin, Lysozym, humanes Insulin, Prion Peptide 106-146, nicht aber deren Monomere oder reife Fibrillen (Kayed et al., 2003). Diese gemeinsamen Strukturmerkmale könnten einem gemeinsamen pathogenen Mechanismus entsprechen. Die *in vitro*-Toxizität löslicher Oligomere kann mit Hilfe des A11-Antikörpers inhibiert werden. Außerdem konnte mit Hilfe des A11-Antikörpers gezeigt werden, dass Oligomere im Alzheimer-Gehirn getrennt von Fibrillen vorkommen und somit eine gesonderte toxische Form darstellen (Kayed et al., 2003). Präfibrilläre Aggregate nichtpathogener Proteine, wie z.B. HypF-N, haben ebenso eine cytotoxische Wirkung (Bucciantini et al., 2004). Dies spricht dafür, dass präfibrilläre Aggregate generell cytotoxische Eigenschaften besitzen, möglicherweise durch die Exposition hydrophober Seitenketten, die in korrekt gefalteten Proteinen verborgen sind. Lösliche Aβ-Oligomere können die Langzeit-Potenzierung inhibieren (Lambert et al., 1998; Walsh et al., 2002). Dies bestätigt die Hypothese, dass lösliche Intermediate pathogen wirken, schließt aber die pathogene Wirkung anderer, höher strukturierter Spezies nicht aus.

Lösliche Intermediate wurden auch für Polyglutaminaggregate beobachtet. So konnten mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskopie, Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie und AFM globuläre, annuläre und protofibrilläre Intermediate identifiziert werden (Poirier et al., 2002; Wacker et al., 2004). Globuläre Intermediate treten bereits nach kurzer Zeit auf, im weiteren Verlauf des Aggregationsprozesses entstehen fibrilläre Strukturen, die zum Teil mit der globulären Spezies koexistieren (Poirier et al., 2002). Wacker et al. identifizierten zusätzlich annuläre Strukturen, ähnlich wie sie für α-Synuclein gefunden wurden (Wacker et al., 2004). In der Reaktion befinden sich zu jeder Zeit mehrere intermediäre Spezies, wobei unklar ist, welche Spezies einen Aggregatvorläufer (*on pathway*) und welche ein unproduktives Seitenprodukt (*off pathway*) darstellt. SDS-lösliche protofibrilläre Intermediate können sich zu reifen SDS-unlöslichen Fibrillen zusammenlagern, eine Interaktion, die durch Congorot inhibiert werden kann (Poirier et al., 2002).

1.4. Proteinfehlfaltung und Chaperone

Eine wichtige Rolle der molekularen Chaperone in der Zelle ist es, Fehlfaltung und Aggregation zu verhindern. Daher erwartete man einen Einfluss molekularer Chaperone auf die Fehlfaltung und Aggregation in neurodegenerativen Erkrankungen. Unterstützt wird diese

Hypothese durch die Tatsache, dass molekulare Chaperone und Proteine der Degradationsmaschinerie in Einschlüssen gefunden wurden (Auluck et al., 2002; Chai et al., 1999a; Cummings et al., 1998; Matsumoto et al., 2006). Dies könnte entweder bedeuten, dass diese Proteine in die Aggregate rekrutiert werden, oder aber es handelt sich um einen physiologischen Prozess, bei dem fehlgefaltete Proteine erkannt werden und die zelluläre Qualitätskontroll-Maschinerie aktiviert wird. FRAP (*fluorescence recovery after photo-bleaching*)- und FLIP (*fluorescence loss in photobleaching*)-Analyse zeigte, dass Hsp70 in Polyglutaminaggregaten schnelle Assoziations- und Dissoziationskinetik zeigt, während die Polyglutaminproteine sehr stabil integriert sind (Chai et al., 2002; Kim et al., 2002; Matsumoto et al., 2006). Hsp70 ist in Polyglutaminaggregaten also nicht irreversibel eingeschlossen, sondern ist im dynamischen Gleichgewicht. Dies spricht für eine aktive Rolle von Hsp70.

1.4.1. Neuroprotektive Wirkung von Chaperonen

Es gibt mehrere Hinweise, dass molekulare Chaperone vor allem des Hsp70/40-Systems eine protektive Funktion in neurodegenerativen Erkrankungen ausüben (Barral et al., 2004; Muchowski and Wacker, 2005; Sakahira et al., 2002). So konnte z.B. Überexpression von cytosolischem Hsp70 Neuronen vor intrazellulärer Aβ42-vermittelter Toxizität schützen (Magrane et al., 2004). In einem *D. melanogaster*-Modell für die Parkinson'sche Erkrankung hatte Hsp70 ebenfalls protektive Funktion (Auluck et al., 2002). Coexpression von humanem Hsp70 und Wildtyp- oder mutiertem α-Synuclein in dopaminergen Neuronen bewahrte diese vor Toxizität, ohne jedoch die intrazellulären Einschlüsse zu beeinflussen. Auch in einem Zellkulturmodell für die Parkinson'sche Erkrankung bewirkte Überexpression von Hdj1 (einem Hsp40-Chaperon) oder Hsp70 eine Verringerung der Anzahl der Zellen mit Einschlüssen, der Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen wurde nicht getestet (McLean et al., 2002). Überexpression von Hsp70 bewirkte im Zellkulturmodell so wie *in vivo* einen Rückgang von detergenzunlöslichen hochmolekularen α-Synuclein-Spezies sowie in der Gesamtmenge an α-Synuclein, was bedeuten könnte, dass Chaperone den Abbau von α-Synuclein beschleunigen (Klucken et al., 2004). Überexpression bewirkte auch einen Rückgang der Toxizität in transfizierten Zellen (Klucken et al., 2004).

Auch für Polyglutaminerkrankungen konnte ein protektiver Effekt von Chaperonen beobachtet werden. Überexpression von Hsp40 oder Hsp70 unterdrückte die Bildung von

Polyglutamineinschlüssen und ihre Toxizität (Chai et al., 1999a; Jana et al., 2000). In einem Hefemodell inhibierte Überexpression von Ssa1 (Hsp70) oder Ydj1 (Hsp40) die Bildung großer detergenzunlöslicher Einschlüsse zu Gunsten der Akkumulation amorpher Aggregate (Muchowski et al., 2000). Ein *D. melanogaster*-Modell für SCA3, das eine verkürzte Form von Ataxin 3 mit 78 Glutaminen im Auge exprimiert, zeigte massive Degeneration des Auges (Warrick et al., 1998), die durch eine dominant-negative Form von Hsp70 verstärkt wurde, durch Coexpression von humanem Hsp70 aber verbessert wurde (Warrick et al., 1999). Der protektive Effekt war hierbei unabhängig von einem Effekt auf die neuronalen Einschlüsse (Warrick et al., 1999). Überexpression von Hdj1 unterdrückte ebenfalls den Phänotyp, nicht aber Hdj2. Coexpression von Hdj2 und Hsp70 hatte einen synergistischen Effekt auf die Unterdrückung der Neurodegeneration, aber keinen Einfluss auf die Bildung neuronaler Einschlüsse (Chan et al., 2000). Auch in anderen Tiermodellen konnte eine protektive Wirkung der Chaperone gezeigt werden. So konnte z.B. Überexpression von Hsc70 in einem *D. melanogaster*–Modell den neuronalen Transport wiederherstellen und Zelltod unterdrücken (Gunawardena et al., 2003). In der R6/2-Mauslinie hatte Überexpression von Hsp70 allerdings außer einer kleinen Verringerung des Gewichtsverlustes keinen Effekt auf den Phänotyp (Hansson et al., 2003), in anderen Mausmodellen konnte jedoch eine Modulation der Neurodegeneration nachgewiesen werden. So konnte Kreuzung eines SCA1-Modells mit einer Hsp70-überexprimierenden Linie den Verhaltens- und neuropathologischen Phänotyp verbessern, wieder ohne die Morphologie der neuronalen Einschlüsse zu verändern (Cummings et al., 2001). Überexpression von Hsp70 in einem Mausmodell für SBMA bewirkte eine dosisabhängige Verbesserung der motorischen Koordination, die mit einer Verringerung der Kernlokalisation des mutierten Androgen-Rezeptors einherging (Adachi et al., 2003). In Drosophila- und Hefe-S*creens* wurden mehrere Hsp40-Homologe als Suppressoren der polyglutaminvermittelten Toxizität identifiziert (Fernandez-Funez et al., 2000; Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000; Willingham et al., 2003). Ein genom-weiter RNAi-*Screen* in *C.elegans* identifizierte ebenfalls zwei Hsp70-Chaperone und ein Hsp40-Chaperon als Suppressor (Nollen et al., 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der protektive Effekt nicht immer mit Veränderungen in den neuronalen Einschlüssen gekoppelt ist. Man stellt jedoch fest, dass Chaperone zwar oftmals keinen Einfluss auf das mikroskopisch sichtbare morphologische Erscheinungsbild haben, sehr wohl aber die biochemischen Eigenschaften der Aggregate verändern. So konnte gezeigt werden, dass Chaperone die Löslichkeit der Aggregate verändern (Muchowski et al., 2000).

Neuroprotektion scheint durch verschiedene Mechanismen vermittelt zu sein. Die wichtigsten dabei sind Förderung der Degradation von fehlgefalteten und aggregierten Proteinen und Verhinderung von Fehlfaltung und Aggregation, es wurden aber auch Mechanismen beobachtet, die den oxidativen Stress der Zelle unterdrücken (Wyttenbach et al., 2002). Den Mechanismus, der zur Verhinderung der Aggregation führt, möchte ich im Folgenden genauer betrachten.

1.4.2. Prävention der Aggregation

Verschiedene *in vitro*-Studien geben Hinweise auf den möglichen Wirkungsmechanismus der Prävention der Aggregation. Hsp70 und Hsp40 inhibieren die Bildung geordneter detergenzunlöslicher amyloider Aggregate, stattdessen wird die Bildung SDS-löslicher amorpher Aggregate favorisiert (Muchowski et al., 2000). Dies konnte *in vitro* und in Hefe gezeigt werden. Auch in einem *D. melanogaster*-Modell erhöht Überexpression von Hsp70 und Hsp40 die SDS-Löslichkeit der Aggregate. Hsp70 und Hsp40 agieren dabei kooperativ und ATP-abhängig (Muchowski et al., 2000). Hsp70 und Hsp40 wirken dabei sehr früh im Aggregationsprozess. Wacker et al. zeigten, dass Hsp70 und Hsp40 die Ausbildung von globulären und annulären Intermediaten vermindern (Wacker et al., 2004). Schaffar et al. zeigten, dass Hsp70 und Hsp40 eine intramolekulare Konformationsänderung im Huntingtin-Monomer inhibieren (Schaffar et al., 2004). Gebildet wird stattdessen eine Struktur, die zur Bildung amorpher Aggregate führt, nicht jedoch zur Bildung fibrillärer amyloid-ähnlicher Strukturen. Chaperone können auch Fehlinteraktionen von Proteinen mit verlängerter Polyglutaminsequenz mit Transkriptionsfaktoren verhindern (Schaffar et al., 2004).

1.4.3. Hsp104

Eine andere Rolle spielen Chaperone wie Hsp104/p97 (Sakahira et al., 2002). Sowohl Überexpression als auch Deletion von Hsp104 reduzierte die Bildung von Polyglutamin-aggregaten (Kimura et al., 2001; Krobitsch and Lindquist, 2000; Satyal et al., 2000). Anscheinend katalysiert Hsp104 eine Konformationsänderung, die die Aggregation erleichtert. Überexpression von Hsp104 hingegen könnte bewirken, dass bereits gebildete Aggregate wieder aufgelöst werden (Sakahira et al., 2002).

1.5. Zielsetzung

Intermediate im Aggregationsprozess spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Toxizität in neurodegenerativen Erkrankungen. Zu Beginn dieser Arbeit waren zwar Aggregationsintermediate in zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen identifiziert (Ding et al., 2002; Harper et al., 1997; Lambert et al., 1998; Lashuel et al., 2002; Walsh et al., 1997), nicht jedoch für die Huntington'sche Erkrankung. Erst später wurden globuläre, annuläre und fibrilläre Intermediate beobachtet (Poirier et al., 2002; Wacker et al., 2004). Dennoch war wenig über sehr frühe Formen in der Aggregation wie Dimere, Trimere oder kleine Oligomere bekannt. Um die frühe Aggregationsphase und auch die weitere Elongationsphase näher zu charakterisieren, sollten in dieser Arbeit mehrere fluoreszenzbasierte Methoden etabliert werden.

Die Struktur der Huntingtin-Aggregate ist bis heute nicht abschließend geklärt. Es existieren mehrere Modelle, manche davon basierend auf experimentellen Daten. Richtungsweisend waren die Arbeiten von Max Perutz, der 1994 ein sogenanntes Reißverschluss (*polar zipper)*-Modell vorschlug (Perutz et al., 1994), in einem späteren verfeinerten Modell eine wassergefüllte parallele β-Helix (Perutz et al., 2002). Andere Modelle favorisieren ein antiparalleles β-Faltblatt (Thakur and Wetzel, 2002). In dieser Arbeit sollte versucht werden, eines der Modelle mit Hilfe von FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) zu erhärten, indem die Distanzen von Fluorophoren direkt vor bzw. nach der Polyglutaminsequenz bestimmt werden sollten. Auch sollten Aussagen über frühere intermediäre Aggregate gewonnen werden.

Chaperone üben einen neuroprotektiven Effekt in neurodegenerativen Erkrankungen aus. Hsp70 und Hsp40 können die Huntingtin-Aggregation modulieren und die Bildung toxischer Spezies vermindern (Muchowski et al., 2000; Schaffar et al., 2004). Ein RNA-*interference screen* in *C.elegans* identifizierte das cytosolische Chaperonin TRiC als potentiellen Suppressor der Huntingtin-Aggregation (Nollen et al., 2004). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit TRiC die Aggregation von Huntingtin unterdrücken kann, und die zugrunde liegenden Mechanismen genauer ergründet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Fluka (Buchs, Schweiz), Calbiochem (Bad Soden, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen. Alle Chemikalien wurden mindestens in der Qualität *pro analysi* verwendet.

Adenosin-5'-Diphosphat (ADP)
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)
AgaroseLE (BMA, Rockland, USA)
Albumin (BSA)
Ampicillin
Apyrase
Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA)
Bacto-Hefeextrakt (Difco, Detroit, USA)
Bacto-Trypton (Difco, Detroit, USA)
Benzonase
Congo Rot
Creatin-Kinase
Creatin-Phosphat
Coomassie, Serva BlueR
Complete Protease Inhibitor Cocktail
Dithiotreitol (DTT)
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Ethidiumbromid (BioRad, Herkules, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
Glutathion (reduziert)

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)

Kanamycin

Luminol (3-aminophtalhydrazid)

Lysozym

β-Mercaptoethanol

p-Coumarinsäure

Pefabloc® SC-Protease Inhibitor

Phosphatase (alkalische)

PreScission™ Protease (Amersham/Pharmacia, Freiburg)

Protogel (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)

TEMED (N'N'N'N' Tetramethylethylendiamin)

Trichloressigsäure (TCA)

Triton X-100

TWEEN 20

2.1.2. Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Schnittstelle	Referenz
BamHI	G▼GA TC C C CT AG▲G	New England Biolabs (NEB)
NheI	G▼CT AG C C GA TC▲G	New England Biolabs (NEB)
SacI	G AG CT▼G C▲TC GA G	New England Biolabs (NEB)
SalI	G▼TC GA C C AG CT▲G	New England Biolabs (NEB)

2.1.3. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Referenz
BL21(DE3) competent cells	Stratagene
BL21-CodonPlus®-(DE3)-RP competent cells	Stratagene
SURE® competent cells	Stratagene

2.1.4. Vektoren und Oligonukleotide

Vektor	Beschreibung	Referenz
pGEX6-P1	E.coli Expressionsvektor zur Expression von Glutathion S-Transferase Fusionsproteinen mit einer PreScission™-Protease-Spaltungssequenz	Amersham/Pharmacia
pMAL™-c2	E.coli Expressionsvektor zur Expression von MBP (*maltose binding protein*)-Fusionsproteinen, periplasmatische Lokalisationssequenz deletiert	New England Biolabs (NEB)

Oligonukleotid	Sequenz
PPMKC-F2	CG GGT GCA GGA TCG GAT CTG GGA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCT CGT AGG GCA TCT GTG GCT AGC TGT G
PPMKC-R2	GA TCC ACA GCT AGC CAC AGA CGT TCC ACG AGA TCC CAG GGG CCC CTG GAA CAG AAC TTC CAG ATC CGA TCC TGC ACC CGA GCT
HA-Htt-F1	CGC GGA TCC ATG GGA TAC CCA TAC GAC GTC CAA GAC TAC GCT GGA AGA TCT ATG GCG ACC CTG GAA AAG CTG
HA-Htt-R1	AAA CGC GTC GAC TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG ACC AGA AGA ACC CGG TCG GTG CAG CGG
MAL-Htt-C2-F1	GCT AGC AGT GGA TCC ATG GGA TAC C
MAL-Htt-C2-F2	G CTG ATG AAG GCC TTC CAG TCC CTC AAG TGC TTC CAG
MAL-Htt-C2-R1	CTG GAA GCA CTT GAG GGA CTC GAA GGC CTT CAT CAG C
His-Htt-R1	AAA CGC GTC GAC TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG ACC AGA AGA ACC CGG TCG GTG CAG CGG
HA-Htt-C2-F1	AGT GGA TCC ATG GGA TAC CCA TAC GAC GTC
BamHI-HD50b	CGC GGA TCC ATG GCG ACC CTG G
Mal-Htt-C2-R1	CTG GAA GCA CTT GAG GGA CTC GAA GGC CTT CAT CAG C
Mal-Htt-C2-F2	GCT GAT GAA GGC CTT CGA GTC CCT CAA GTG CTT CCA G
DP-His-R2c	AAA CGC GTC GAC TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG ACC AGA AGA ACC CTC ACA CGG CGG TGG CGG
CQCdP-F1	CAG GAG CAG CAA CAG TGT GAG GGT TCT TCT GGT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TGA GTC GAC
CQCdP-F2	CAG CAG CAG CAA CAG CCG TGT GAG GGT TCT TCT GGT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TGA GTC GAC
CQCdP-R1	GTC GAC TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG ACC AGA AGA ACC CTC ACA CTG TTG CTG CTG CTG
CQCdP-R2	GTC GAC TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG ACC AGA AGA ACC CTC ACA CGG CTG TTG CTG CTG CTG
BamHI-HA-F	GAT CCA TGG GAT ACC CAT ACG ACG TCC CAG ACT ACG CTG GAG
BamHI-HA-R	GAT CCT CCA GCG TAG TCT GGG ACG TCG TAT GGG TAT CCC ATG

In dieser Arbeit benutzte Plasmide:

Name	Ursprungsvektor	Referenz
pGEX-myc-Htt53Q		G. Schaffar
pGEX-C4S-6P		N. Tzvetkov
pGEX-C4S-myc-Htt53Q	pGEX-C4S-6P	diese Arbeit
pMALc-PPMKC	pMALc	diese Arbeit
pMALc-PPMKC-HA-Htt53Q	pMALc-PPMKC	diese Arbeit
pMALc-PPMKC-HA-Htt53Q-His	pMALc-PPMKC	diese Arbeit
pMALc-PPMKC2-HA-Htt53Q-His	pMALc-PPMKC	diese Arbeit
pGEX-5-Htt11ΔP		E.E. Wanker
pGEX-5-Htt50ΔP		E.E. Wanker
pGEX-C4S-Htt50QΔP4P-CQC-His	pGEX-C4S-6P	diese Arbeit
pGEX-C4S-Htt53QΔP1P-CQC-His	pGEX-C4S-6P	diese Arbeit
pGEX-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His	pGEX-C4S-6P	diese Arbeit
pGEX-C4S-HA-Htt40QΔP0P-CQC-His	pGEX-C4S-6P	diese Arbeit
pGEX-C4S-HA-Htt30QΔP1P-CQC-His	pGEX-C4S-6P	diese Arbeit

Konstruktion der Plasmide:

pGEX-C4S-myc-Htt53Q:

myc-Htt53Q wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI, SalI aus pGEX-myc-Htt53Q (G. Schaffar) ausgeschnitten und in den Vektor pGEX-C4S-6P (N. Tzvetkov), der ebenfalls mit BamHI und SalI geschnitten wurde, ligiert.

pMALc-PPMKC:

Für das Insert wurden die zwei Oligonukleotide PPMKC-F2 und PPMKC-R2 hybridisiert und in den Vektor pMAL^{TM}-c2, der mit SacI und BamHI geschnitten wurde, ligiert. PPMKC enthält eine PreScission-Protease-Schnittstelle, eine Herzmuskel-Kinase-Stelle und ein Cystein.

pMALc-PPMKC-HA-Htt53Q:

HA-Htt53Q wurde aus pGEX-HA-Htt53Q mit Hilfe von BamHI und SalI ausgeschnitten und in den Vektor pMALc-PPMKC, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert.

pMALc-PPMKC-HA-Htt53Q-His:

Der His-*tag* wurde mit Hilfe von PCR hergestellt. Verwendet wurden als Primer die Oligonukleotide HA-Htt-F1 und HA-Htt-R1, mit pMALc-PPMKC-HA-Htt53Q als Vorlagen-DNS. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI verdaut und in den Vektor pMALc-PPMKC, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert.

pMALc-PPMKC2-HA-Htt53Q-His:

Diese Klonierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Mit Hilfe der Primer Mal-Htt-C2-F1 und Mal-Htt-C2-R1 wurde das erste Fragment des Inserts amplifiziert, mit Hilfe der Primer Mal-Htt-C2-F2 und His-Htt-R1 das zweite Fragment. Als Vorlagen-DNS diente pMALc-PPMKC-HA-Htt53Q-His. Die beiden Fragmente wurden äquimolar für die darauffolgende PCR eingesetzt. Hier wurden die beiden äußeren Primer Mal-Htt-C2-F1 und His-Htt-R1 verwendet. Als PCR-Produkt entstand das gesamte Insert. Das PCR-Produkt wurde mit NheI und SalI verdaut und in den Vektor pMALc-PPMKC, der mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert. Das neu entstandene Konstrukt besitzt ein einzelnes Cystein vor der Polyglutaminsequenz.

pGEX-C4S-Htt50QΔP4P-CQC-His:

Dieses Konstrukt wurde in zwei Schritten kloniert. Mit Hilfe der Primer BamHI-HD50b und Mal-Htt-C2-R1 wurde das erste Fragment in einer PCR hergestellt, mit Hilfe der Primer Mal-Htt-C2-F2 und DP-His-R2c wurde das zweite Fragment hergestellt. Als Vorlagen-DNS diente pGEX-5-Htt50QΔP. Für die darauffolgende PCR wurden die beiden Fragmente äquimolar eingesetzt. Hier wurden die äußeren Primer BamHI-HD50b und DP-His-R2c verwendet. Als PCR-Produkt wurde das gesamte Insert gewonnen. Dieses wurde mit SalI und BamHI verdaut und in den Vektor pGEX-C4S-6P, der ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten wurde, ligiert. Das Konstrukt besitzt zwei Cysteine, eines

vor der Polyglutaminsequenz und eines nach der Polyglutaminsequenz, sowie vier Proline der Oligoprolinsequenz.

pGEX-C4S-Htt53QΔP1P-CQC-His:

Dieses Konstrukt besitzt nur noch ein Prolin der Oligoprolin-Sequenz. Es wurde eine PCR durchgeführt mit den Primern CQCdP-F2 und CQCdP-R2, pGEX-C4S-Htt50QΔP4P-CQC-His diente als Vorlagen-DNS. Dadurch wurde der Oligoprolin-Strang verkürzt. Das PCR-Produkt wurde mit BamHI und SalI verdaut und in den Vektor pGEX-C4S-6P ligiert, der mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurde.

pGEX-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His:

Der HA-*tag* wurde aus zwei hybridisierten Oligonukleotiden hergestellt, nämlich BamHI-HA-F1 und BamHI-HA-R1. pGEX-C4S-Htt53QΔP1P-CQC-His wurde mit BamHI geschnitten und das 5'-Ende dephosphoryliert. In die BamHI-Schnittstelle wurde der HA-*tag* ligiert.

pGEX-C4S-HA-Htt40QΔP0P-CQC-His/ pGEX-C4S-HA-Htt30QΔP1P-CQC-His:

Diese Konstrukte wurden als Nebenprodukte bei der Klonierung von pGEX-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His durch Deletion mehrerer CAG-Wiederholungen erhalten.

2.1.5. Proteine

Protein	Spezies	Referenz
Hdj1 (Hsp40)	human, rekombinant in E.coli	N. Tzvetkov, J. Young
Hsc70 (Hsp70)	Schwein, Gehirn	N. Tzvetkov, J. Young
Aktin, in 6 M Guanidin-hydrochlorid	rekombinant in E.coli	M. Stemp

2.1.6. Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Referenz
anti-HA	Maus HA.11 Klon 16B12, monoklonal	Babco MMS-101R
anti-c-myc	Maus Klon 9E10, monoklonal	Santa Cruz sc-40
anti-MBP	Ratte, polyklonal	NEB, E80315
anti-GST	Ziege, polyklonal	Amersham 27-4577
anti-TCP-1α(CCT)	Ratte, monoklonal	Stressgen
anti-hHsc70	Maus, monoklonal	Stressgen

Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Referenz
anti-MausIgG-HRP-Konjugat	Ziege, polyklonal	Sigma A3562
anti-RatteIgG-HRP-Konjugat	Ziege, polyklonal	Sigma A5795
anti-ZiegeIgG-HRP-Konjugat	Kaninchen	Sigma

2.1.7. Fluorophore

Alle Fluorophore wurden von Molecular Probes bezogen.

Fluorophor	Absorption-maximum	$\varepsilon \times 10^{-3}$	Emissions-maximum	Lösungs-mittel
1,5-IAEDANS	336 nm	5,7	490 nm	DMF
IANBD Ester	472 nm	23	536 nm	DMF
NCD-4	333 nm	8,9	414 nm	DMF
Fluorescein-5-maleimid	492 nm	83	515 nm	DMF
Alexa Fluor® 488 C_5-maleimid	493 nm	72	516 nm	DMSO
Alexa Fluor® 633 C_5-maleimid	622 nm	143	640 nm	DMSO
Alexa-Fluor® 647 Carboxylsäure, Succinimidyl-Ester	651 nm	270	672 nm	DMSO
Bis-ANS	395 nm	23	500 nm	DMSO

1,5-IAEDANS: 5-((((2-iodoacetyl)amino)ethyl)amino)napthalen-1-sulfonsäure
IANBD Ester: N-((2-(iodoacetoxy)ethyl)-N-methyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3 diazol
NCD-4: N-cyclohexyl-N'-(4-(dimethylamino)naphthyl)carbodiimid
Bis-ANS: 4,4'-dianilino-1,1'-binaphtyl-5,5'-disulfonsäure

Zum Blockieren:
N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)ethylendiamin

2.1.8. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Millipore-Wasser angesetzt.

1x PBS:	137 mM	NaCl	(PBST:
	2,7 mM	KCl	PBS + 0,5 % TWEEN 20)
	8,4 mM	Na_2HPO_4	
	1,5 mM	KH_2PO_4	
	pH 7,4 (eingestellt mit HCl)		

2.1.9. Medien

Alle Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert.

Luria-Bertani (LB)-Medium:	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl

SOB-Medium:	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	$MgCl_2$
	10 mM	$MgSO_4$

SOC-Medium:	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	$MgCl_2$
	10 mM	$MgSO_4$
	20 mM	Glucose
M9-Minimal-Medium	12,8 g	Na_2HPO_4
	3 g	KH_2PO_4
	0,5 g	NaCl
	1 g	NH_4Cl
	0,4 %	Glucose
2x TY-Medium:	5 g/l	NaCl
	10 g/l	Hefeextrakt
	16 g/l	Trypton
	20 mM	MOPS-KOH (pH 7,9)
	2 %	Glucose
LB-Agar-Platten	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	15 g/l	Agarose

Die Platten wurden direkt nach dem Autoklavieren gegossen.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Agarose-Gelelektrophorese

Elektrophorese-Puffer (TAE):	40 mM	Tris/HAc
	1 mM	EDTA
	pH 8,0 (eingestellt mit Essigsäure)	
Probenauftrags-Puffer:	50 %	Glycerol
		Orange G

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1-2 % Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst und aufgekocht, nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde das Gel gegossen. Alle Gele enthielten 10 µg/ml Ethidiumbromid. Die Proben wurden mit 2x Auftragspuffer versetzt und je 5-20 µl (analytisches Gel) oder 50 µl (präparatives Gel) aufgetragen. Als Laufpuffer diente TAE. Die Elektrophorese fand bei 100 V statt. Als Längenstandard wurde der *Gene Ruler 1kb-DNA-ladder* bzw. *Gene Ruler 100bp-DNA-ladder* (Fermentas) verwendet Bei präparativen Agarose-Gelen wurde nach der Elektrophorese das betreffende Fragment ausgeschnitten und mit Hilfe eines Gelextraktionskits (Promega) nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.1.2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR-Ansätze (je 50 µl) wurden nach folgendem Schema angesetzt. Als Polymerase wurde entweder Taq-Polymerase (NEB) oder PfuTurbo-Polymerase (NEB) verwendet.

Ansatz	Vorlagen-DNS	5-50 ng
	F-Primer (*sense*)	0,2 µM
	R-Primer (*antisense*)	0,2 µM
	dNTP-Mix	200 µM
	10x Reaktionspuffer	5 µl
	DMSO	10 %
	Polymerase	2,5 U

Ein typisches Protokoll für eine PCR-Reaktion (mit kleineren Abweichungen):

4°C	5 min	
95°C	5 min	
94°C	30s	35 Zyklen
55°C	30s	
72°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C		

Anschließend wurde die DNS entweder durch einen PCR-Reinigungs-Kit (Promega) oder durch Gelelektrophorese und anschließende Extraktion aus dem Gel mit Hilfe eines Gel-Extraktions-Kits (Promega) gereinigt.

2.2.1.3. Hybridisierung von Oligonukleotiden (*annealing*)

Je 100 µM *sense*- und *antisense* Olignukleotid wurden gemischt und für 3 min bei 98 °C gekocht. Danach wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend langsam auf ca. 37 °C abgekühlt (ca. 1-2 h). Die 5'-Enden wurden durch T4-PNK (NEB) (1 U/ 100 pmol dsDNS) 30 min bei 37 °C phosphoryliert, die T4-PNK anschließend durch Erhitzen auf 65 °C inaktiviert. Zur weiteren Verwendung wurde die dsDNS typischerweise 1:10 verdünnt.

2.2.1.4. Restriktionsverdau von DNS

Für präparativen Restriktionsverdau wurden typischerweise 2-4 µg DNS eingesetzt, für analytischen Restriktionsverdau ca. 1 µg. Für präparativen Restriktionsverdau wurde ein Reaktionsvolumen von 50 µl verwendet, für analytische Ansätze 10-20 µl. Die Ansätze

wurden mit dem jeweiligen Restriktionspuffer und BSA versetzt und mit dem jeweiligen Restriktionsenzym 1-6 h bei 37 °C inkubiert (normalerweise 1 h, 6 h für SalI) (Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer von NEB). Bei Doppelrestriktionsverdau mit BamHI und SalI wurde BamHI entsprechend nach 5 h Inkubation mit SalI zugegeben. Die Ansätze wurden mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Falle eines präparativen Restriktionsverdaus wurde das gewünschte Fragment oder das geschnittene Plasmid aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe eines Gel-Extraktions-Kits (Promega) extrahiert.

2.2.1.5. Dephosphorylierung des Vektors

Um eine Religation des geschnittenen Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurden 2-4 µg DNS mit 1 U CIP (*calf intestine* Alkalische Phosphatase) (NEB) für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde der Ansatz über den PCR-Reinigungskit (Promega) oder über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

2.2.1.6. Ligation von DNS-Fragmenten

Typischerweise wurde 1 µl geschnittenes Plasmid (1-2 µg) mit 1-10 µl des gewünschten Inserts in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Die Ansätze wurden mit T4-DNS-Ligase (NEB) und dem zugehörigen Puffer entweder 1 h bei Raumtemperatur oder bei 16 °C über Nacht inkubiert.

2.2.1.7. Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Puffer:	Transformationspuffer I:	30 mM	KOAc
	(pH 5,8, eingestellt	100 mM	RbCl (frisch)
	mit Essigsäure)	10 mM	$CaCl_2$
		50 mM	$MnCl_2$
		15 % (v/v)	Glycerol

Transformationspuffer II:	10 mM	MOPS
(pH 6,5, eingestellt	10 mM	RbCl
mit KOH)	75 mM	$CaCl_2$
	15 % (v/v)	Glycerol

Die Puffer wurden durch einen 0,22 µm-Filter sterilisiert und bei -20 °C in Dunkelheit aufbewahrt.

Alle Materialien wurden vor der Verwendung autoklaviert. Die *E.coli*-Zellen wurden auf kanamycinhaltigen LB-Platten ausgestrichen und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Eine Kolonie wurde in 2 ml SOB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin angeimpft und bei 25 °C über Nacht inkubiert. 200 ml SOB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin wurden mit 1 ml der Übernachtkultur angeimpft und bei 25 °C mit 160-200 Upm inkubiert, bis eine OD_{550} von 0,45-0,50 erreicht wurde (ca. 4-7 h). Die Flasche wurde auf Eis 15 min gekühlt, danach wurden die Zellen bei 2000 x g bei 4 °C für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde gründlich entfernt. Die Zellen wurden in 80 ml vorgekühltem sterilen Transformationspuffer I vorsichtig resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie bei 2000 x g bei 4 °C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 8 ml vorgekühltem sterilen Transformationspuffer II resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 100 µl-Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.8. Transformation kompetenter E.coli-Zellen

Das gewünschte Plasmid (1 µg gereinigtes Plasmid oder 20 µl Ligationsansatz) wurde zu einem 100 µl-Aliquot kompetenter *E.coli*-Zellen gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte bei 42 °C ein Hitzeschock für 2 min. Die Zellen wurden anschließend sofort gekühlt und 10 min auf Eis inkubiert. Zu einem 100 µl –Aliquot wurden 900 µl SOC-Medium gegeben und die Zellen bei 37 °C, 600 Upm 1 h inkubiert. Bei zu erwartender niedriger Transformationseffizienz wurden die Ansätze pelletiert und in 200 µl SOC-Medium aufgenommen. Es wurden je 200 µl Bakterien auf LB-Platten mit dem passenden Antibiotikum ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.9. DNS-Plasmid-Präparation

Für Plasmidpräparationen wurden jeweils 5 ml bzw. 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 240 Upm inkubiert. Die Bakterien wurden bei 20 000 x g für 1 min (5 ml-Ansätze) oder 5000 x g für 15 min (100 ml- Ansätze) geerntet. Lyse und nachfolgende Plasmidreinigung erfolgte mit Hilfe des Promega Miniprep- bzw. Midiprep-Kits (Promega) nach Herstellerangaben. Das isolierte Plasmid wurde in autoklaviertem H_2O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.10. Bestimmung der DNS-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierzu wurde ein Beckman DU640 Spektrophotometer verwendet. Dabei entspricht eine optische Dichte OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 μg/ml dsDNS.

2.2.1.11. Sequenzierung der DNS

Sequenzierung der DNS wurde von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen wurden eindimensionale diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970). Zur Fokussierung wurde ein 4%-Sammelgel verwendet, die eigentliche Auftrennung erfolgte in 10%- oder 12%- Trenngelen.

	Trenngel (10%)	**Trenngel (12%)**	**Sammelgel**
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	3,3 ml	4,0 ml	0,67 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	
1 M Tris-HCl, pH 6,8			1,25 ml
H_2O	4,0 ml	3,3 ml	3,0 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	50 µl
10% Ammoniumpersulfat (APS)	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	20 µl	20 µl	10 µl

Die Lösungen wurden nach obiger Rezeptur vorbereitet, wobei APS und TEMED erst direkt vor dem Gießen der Gele zugegeben wurden. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit H_2O überschichtet. Nach ca. 1 h Polymerisationszeit wurde das Sammelgel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach wiederum 1 h Polymerisationszeit war das Gel fertig zur Verwendung.

Für kontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele wurden Gradienten mit ansteigender Polyacrylamidkonzentration verwendet. In dieser Arbeit wurden Gradienten von 2,5%- 15% -Acrylamid benutzt. Gradientengele wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers aus zwei unterschiedlichen Acrylamidlösungen hergestellt.

	2,5%-Acrylamidlösung	15%-Acrylamidlösung
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	2,5 ml	15 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	6 ml	6 ml
H_2O	21,5 ml	
Sucrose (2M)		9 ml
10% SDS	300 µl	300 µl
10% APS	60 µl	60 µl
TEMED	6 µl	6 µl

Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel wie üblich gegossen und ein Kamm eingesetzt.

SDS-Laufpuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	380 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
2x Probenpuffer:	1 M	Tris-HCl (pH 6,8)
	80 %	Glycerin
	10 %	SDS
		Bromphenolblau
	0,6 M	β-Mercaptoethanol

Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, bei 95°C 5 min gekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Gelelektrophorese wurde bei 30 mA in SDS-Laufpuffer durchgeführt. Für kleine Gele wurde eine Mini-ProteanII-Apparatur (Biorad) verwendet, für große Gele eine Elektrophoreseapparatur von Hoefer. Als Molekulargewichtstandard wurde entweder *Prestained Protein Marker* (NEB) oder *Protein Ladder* (Fermentas) eingesetzt.

2.2.2.2. Färbung von SDS-Gelen

Coomassie-Färbelösung:	1,2 g/l	Coomassie-ServaBlue
	50 %	Ethanol
	10 %	Essigsäure
Entfärbe-Lösung:	10 %	Ethanol
	10 %	Essigsäure

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele für ca. ½ h in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nach mehrstündiger Entfärbung bleiben die Proteine angefärbt. Konservierung der Gele erfolgte durch Trocknen zwischen zwei Cellophanfolien in einem Gel Air Dryer (Biorad).

2.2.2.3. Western Blot-Analyse

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach Auftrennung durch SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose- (Schleicher & Schuell) oder PVDF-Membran (Pall) transferiert.

Western Blot-Puffer:	50 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol
ECL-Lösung1:	100 mM	Tris, pH 8,5
	2,5 mM	Luminol (Stocklösung in DMSO)
	400 µM	p-Coumarinsäure
ECL-Lösung2:	100 mM	Tris, pH 8,5
	5,4 mM	H_2O_2
Strip-Puffer:	63 mM	Tris-HCl, pH 6,7
	2 %	SDS
	350 µl	β-Mercaptoethanol

Transfer erfolgte im *Semi-dry*-Verfahren. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: 3 Schichten Whatmanpapier getränkt in Western-Blot-Puffer, Nitrocellulose oder PVDF-Membran, Gel, 3 Schichten Whatmanpapier getränkt in Western-Blot-Puffer. Transfer erfolgte für 1 h bei konstanten 100 mA bei kleinen Gelen (7 cm x 8 cm) oder bei konstanten 24 V für 2 h bei großen Gelen (15 cm x 15 cm).

Die Effizienz des Transfers wurde mit Ponceau S-Färbung überprüft. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in PBST + 5% Milchpulver gelegt.

Zur immunologischen Detektion von Proteinen mit Hilfe von Chemilumineszenz wurde die Membran 1 h mit dem Primärantikörper in PBST + 5% Milchpulver inkubiert, nach waschen mit PBST 1 h mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in PBST + 5% Milchpulver inkubiert und anschließend wiederum in PBST gewaschen. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe von Chemilumineszenz detektiert. Hierzu wurden je 1 ml ECL1- und ECL2-Lösung auf die Membran gegegeben und die Lumineszenz entweder durch Auflegen eines Röntgenfilms oder in einem Fujifilm Image Reader LAS-3000 detektiert.

Durch Inkubation der Membran für 1 h bei 50 °C in Strip-Puffer wurde der gebundene Antikörper entfernt. Anschließend wurde die Membran gründlich gewaschen und erneut in

PBST + 5% Milchpulver blockiert. Die so behandelte Membran konnte nun mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert werden.

2.2.2.4. Dot Blot Analyse

Bei der Dot Blot Analyse wurden die Proben punktförmig direkt auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher&Schuell) aufgetragen. Nach kurzer Trocknungszeit wurde die Membran in PBST + 5% Milchpulver blockiert. Nachweis der Proteine erfolgte auch hier immunologisch.

2.2.2.5. Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Expression von GST-Fusionsproteinen wurde in SURE-Zellen oder BL21(DE3)-Zellen durchgeführt.

Medium: 2x TY-Medium + 100 µg/ml Ampicillin

Puffer:	Lysepuffer:	50 mM	Natriumphosphatpuffer pH 8,0
		100 mM	NaCl
		10 %	Glycerol
		0,1 mM	DTT (frisch)
		1 mM	Pefabloc®SC Protease Inhibitor (Roth)
			Complete protease inhibitor cocktail (Roche)
	Puffer 2:	50 mM	Natriumphosphatpuffer pH 8,0
		500 mM	NaCl
		10 %	Glycerol
		0,1 mM	DTT (frisch)
		0,1 mM	Pefabloc®SC Protease Inhibitor (Roth)

Puffer 3:	100 mM	Tris-HCl pH 8,0
	100 mM	NaCl
	10 %	Glycerol
	0,1 mM	DTT (frisch)
	0,1 mM	Pefabloc®SC Protease Inhibitor (Roth)
Elutionspuffer:	100 mM	Tris-HCl pH 8,5
	100 mM	NaCl
	10 %	Glycerol
	20 mM	Glutathion reduziert (frisch)
	0,1 mM	DTT (frisch)
	0,1 mM	Pefabloc®SC Protease Inhibitor (Roth)
Dialysepuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150 mM	KCl
	10 %	Glycerol

Säulenmaterial: Glutathion-Agarose 4B (Amersham/Pharmacia)

100 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin wurden mit einer einzelnen frisch transformierten Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 2x TY-Medium + 100 µg/ml Ampicillin wurde mit der Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C, 200 Upm inkubiert, bis eine OD_{600} von ca. 0,6 erreicht wurde. Die Expression des gewünschten Proteins wurde induziert durch 0,6 mM IPTG bei 25 °C für 4 h. Danach wurden die Zellen bei 4000 x g für 30 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in vorgekühltem Lysepuffer (40 ml Puffer pro 1 l Kultur) aufgenommen. Lyse erfolgte durch aufeinanderfolgendes Einfrieren bei -80 °C und auftauen, Inkubation mit 0,5 mg/ml Lysozym + 0,1 µl/ml Benzonase + 0,1% Triton X100 für 30 min bei 4 °C und anschließendem Sonifizieren (5 x 30s). Anschließend wurden große Zellfragmente bei 30 000 x g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde durch Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose 4B gereinigt.

Pro Liter Ausgangskultur wurde 2,5 ml Glutathion-Sepharose 4B verwendet. Diese wurde in eine Säule überführt und mit 10 Säulenvolumen Lysepuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand der Zentrifugation geladen. Die Säule wurde mit je 5 Säulenvolumen Waschpuffer 1 (Lysepuffer + 0,1% TritonX-100), Puffer 2 und Puffer 3

gewaschen. Elution erfolgte mit 3 Säulenvolumen Elutionspuffer (reduziertes Glutathion wurde frisch zugegeben).

Das Eluat wurde 2x gegen Dialysepuffer mindestens 16 h und 4 h dialysiert. Anschließend wurde das Protein gegebenenfalls mit Hilfe von VivaSpin30-Konzentratoren (Vivascience) nach Hersteller-Angaben konzentriert. Das Protein wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Bei Fusionsproteinen, die zusätzlich einen His-*tag* enthielten, wurde bei ungenügender Reinheit des Proteins nach dem ersten Reinigungsschritt zusätzlich eine Ni-NTA-Agarose-Säule (Qiagen) verwendet. Es wurde 1 ml Ni-NTA-Agarose pro Liter Ausgangskultur verwendet.

Zusätzliche Puffer:	Puffer 4:	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
		500 mM	NaCl
		10 %	Glycerol
		0,1 mM	Pefabloc®SC
	Puffer 5:	100 mM	Tris-HCl, pH 8.0
		100 mM	NaCl
		10 mM	Imidazol
		10 %	Glycerol
		0,1 mM	Pefabloc®SC
	Elutionspuffer 2.	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
		100 mM	NaCl
		300 mM	Imidazol
		10 %	Glycerol
		0,1 mM	Pefabloc®SC

In diesem Falle wurde die Reinigung ohne DTT durchgeführt. Ni-NTA-Agarose wurde mit Puffer 3 äquilibriert. Das Eluat aus der Glutathion-Sepharose-4B-Reinigung wurde geladen, anschließend wurde mit je 5 Säulenvolumen Puffer 4 und 5 gewaschen. Elution erfolgte mit 4 Säulenvolumen Elutionspuffer 2. Anschließende Dialyse, Konzentrierung und Aufbewahrung wie oben beschrieben.

2.2.2.6. Expression und Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

Expression von MBP-Fusionsproteinen wurde in BL21-CodonPlus®(DE3)-RP-Zellen durchgeführt

Medien: LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin + 40 µg/ml Chloramphenicol

Bei der Expression von MBP-Huntingtin-Fusionsproteinen mit verlängerter Polyglutaminsequenz zusätzlich:
M9-Minimal-Medium + 100 µg/ml Ampicillin + 40 µg/ml Chloramphenicol

Puffer:	Lysepuffer:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
		200 mM	KCl
		10 %	Glycerol
		1 mM	Pefabloc®SC Protease Inhibitor (Roth)
			Complete protease inhibitor cocktail (Roche)
	Waschpuffer 1:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
		1 M	KCl
		10 %	Glycerol
		0,1 mM	Pefabloc®SC Protease Inhibitor (Roth)
	Waschpuffer 2:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
		200 mM	KCl
		20 mM	Imidazol
		10 %	Glycerol
		0,1 mM	Pefabloc®SC Protease Inhibitor (Roth)
	Elutionspuffer:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
		200 mM	KCl
		200 mM	Imidazol
		0,1 mM	Pefabloc®SC Protease Inhibitor (Roth)

Puffer 3:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	400 mM	KCl
	0,1 mM	DTT
	0,1 mM	Pefabloc®SC Protease Inhibitor (Roth)

100 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin + 40 µg/ml Chloramphenicol wurde mit einer einzelnen frisch transformierten Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin + 40 µg/ml Chloramphenicol wurde mit der Übernachtkultur angeimpft (Start-OD_{600} = 0,1) und bei 18 °C, 200 Upm inkubiert, bis eine OD_{600} von ca. 0,4 erreicht wurde. Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG bei 18 °C für mindestens 16 h. Im Falle von Huntingtin mit verlängerter Polyglutaminsequenz (MBP-PPMKC-HA-Htt53Q-His) erfolgte Induktion in M9-Minimalmedium. Danach wurden die Zellen bei 4000 x g, 30 min. pelletiert und in vorgekühltem Lysepuffer (50 ml Puffer pro 1 l Kultur) aufgenommen. Lyse erfolgte durch aufeinanderfolgendes Einfrieren bei -80 °C und auftauen, Inkubation mit 0,5 mg/ml Lysozym + 0,1 µl/ml Benzonase + 0,1% TritonX-100 für 30 min bei 4 °C und anschließendem Sonifizieren (5 x 30s). Anschließend wurden große Zellfragmente bei 22 000 x g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gereinigt.

Pro Liter Ausgangskultur wurden 3 ml Ni-NTA-Agarose verwendet. Ni-NTA-Agarose wurde in Lysepuffer äquilibriert, der Überstand aus der Zentrifugation wurde geladen. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde der Durchfluß nochmals auf die Säule geladen. Danach wurde die Säule mit je 5 Säulenvolumen Waschpuffer 1 und 2 gewaschen. Das gereinigte Protein wurde mit 5 Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert.

Anschließend wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Als Säule wurde eine HiLoad16/60Superdex200PrepGrade (Amersham) mit 120 ml Bettvolumen verwendet. Das Eluat aus der Ni-NTA-Reinigung wurde mit Centriprep YM30-Konzentratoren (Centricon) auf 2 ml konzentriert und auf die mit Puffer 3 äquilibrierte Säule geladen. Es wurde eine Flussrate von 0,5 ml/min und eine Fraktionsgröße von 2,5 ml gewählt. Die das monomere Protein enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und mit Centriprep YM30-Konzentratoren konzentriert. Das Protein wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.7. Reinigung von TRiC aus Rinder-Hoden

Puffer:	Homogenisierungs-:	50 mM	HEPES-KOH, pH 8,0
	puffer	2 mM	EGTA, pH 8,0
		10 mM	NaCl
		5 mM	$MgCl_2$
		10 %	Glycerol
		2 mM	DTT
		1 mM	PMSF
			Complete protease inhibitor cocktail

	A	B	
SourceQ-Puffer:	20 mM	20 mM	HEPES-KOH, pH 8,0
	2 mM	2 mM	EDTA, pH 8,0
	5 mM	5 mM	$MgCl_2$
	0 mM	500 mM	NaCl
	10 %	10 %	Glycerol
	2 mM	2 mM	DTT
HiTrap-Heparin-:	20 mM	20 mM	HEPES-KOH, pH 7,4
Puffer	2 mM	2 mM	EDTA, pH 8,0
	5 mM	5 mM	$MgCl_2$
	0 mM	1 M	NaCl
	10 %	10 %	Glycerol
	2 mM	2 mM	DTT

Superdex200-Puffer:	20 mM	HEPES-KOH, pH 7,4
	1 mM	$MgCl_2$
	100 mM	NaCl
	10 %	Glycerol
	1 mM	DTT

Säulen: Source30Q 50/13 cm (250 ml) (Pharmacia Biotech)
HiTrapHeparin (20 ml) (Pharmacia Biotech)
HiLoadSuperdex200pg (Pharmacia Biotech)

250 g-300 g Rinderhoden (frisch oder bei -80 °C gelagert) wurden zerkleinert und in 250 ml vorgekühlten Homogenisierungpuffer gegeben. Das Gewebe wurde homogenisiert, anschließend wurde 0,2 µl/ml Benzonase zugeben und das Homogenat bei 4 °C 30 min inkubiert. Anschließend wurden größere Zellfragmente durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte entfernt. Zuerst wurde 45 min bei 38 000 x g bei 4 °C zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand 1 h bei 131 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert und mit SourceQ-Puffer A so verdünnt, dass ein pH-Wert von 7,0- 8,0 erreicht wurde.

Die Source30Q-Säule wurde mit SourceQ-Puffer A äquilibriert. Mit Hilfe einer P1-Pumpe wurde der Überstand geladen (Flussrate 7 ml/min). Die weiteren Schritte wurden an einer Äkta (Amersham) durchgeführt. Die Säule wurde mit ca. 2 Säulenvolumen SourceQ-Puffer A gewaschen (Flussrate 7 ml/min). Danach erfolgte Elution durch einen Gradienten von 0-300 mM NaCl (0-60% SourceQ-Puffer B). Die TRiC-enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und die Leitfähigkeit mit Heparin-Puffer B auf ca. 15-20 mS/cm gebracht. Die HiTrapHeparin-Säule wurde mit 20% Heparin-Puffer B äquilibriert, dies entspricht 200 mM NaCl (Flussrate 2 ml/min). Die gesammelten Fraktionen (ca. 300 ml) wurden auf die Säule geladen, mit 10 Säulenvolumen 20% Heparin-Puffer B gewaschen und mit einem Gradienten von 200-700 mM NaCl (20-70% Heparin-Puffer B) eluiert. Die TRiC-enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt (ca. 72 ml), mit VivaSpin100-Konzentratoren (Vivascience) auf weniger als 4 ml konzentriert und auf die äquilibrierte HiLoadSuperdex200pg-Säule geladen (Flussrate 0,2 ml/min). Die TRiC-enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und mit VivaSpin100-Konzentratoren (Vivascience) konzentriert. Das Protein wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.8. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch durch Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die Konzentration berechnet sich hierbei nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz $E = d \cdot \varepsilon \cdot c$ für d = 1 cm aus dem Quotienten aus Absorption E und molarem Extinktionskoeffizient ε des jeweiligen Proteins. Der theoretische molare

Extinktionskoeffizient wurde mit Hilfe des ProtParam-Programms des Expasy Servers ermittelt (http://www.expasy.org).

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen, deren Sequenz und molarer Extinktionskoeffizient unbekannt waren, wurde die Konzentrationsbestimmung nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). Als Färbereagenz wurde das Protein-Assay-Reagenz von Biorad verwendet. Mit Hilfe einer BSA-Standard-Eichgeraden kann die Konzentration durch Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt werden.

2.2.2.9. TCA-Fällung von Proteinen

TCA (Trichloressigsäure)- Fällung wurde zur Ankonzentrierung von Proteinen verwendet. Hierzu wurde TCA im Verhältnis 1:1 zu den Proben gegeben, 20 min auf Eis inkubiert und das präzipitierte Protein bei 20 000 x g, 4 °C 10 min pelletiert. Das Pellet wurde mit -20 °C kaltem Aceton gewaschen und in Probenpuffer resuspendiert. Zur Einstellung des pH-Werts wurde jeweils 10% Tris zugegeben.

2.2.3. Biochemische und biophysikalische Methoden

2.2.3.1. *In vitro*-Aggregation von Huntingtin

Aggregationspuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	50 mM	KCl
	5 mM	$MgCl_2$
gegebenenfalls	2 mM	ATP
	200 µg/ml	Creatin-Kinase
	20 mM	Creatinphosphat

Für *in vitro*-Aggregationsreaktionen wurden typischerweise 1-3 µM GST- oder MBP-Htt-Exon1 verwendet. Die Aggregationsreaktion wurde durch Abspaltung des GST- oder MBP-Fusionspartners durch PreScission™-Protease gestartet (0,8 U pro 1 µM Protein). Die Spaltung erfolgte bei 30 °C. Die Aggregationsreaktionen wurden weiter bei 30 °C, 300 Upm

inkubiert. Gegebenenfalls wurde die Reaktion durch Kochen in 2% SDS, 50 mM DTT bei 95 °C für 5 min. gestoppt. Nach 8 h war die Aggregation typischerweise vollständig.

2.2.3.2. Aggregations-Filter-Retardations-Assay

Zur Analyse großer Aggregate wurde ein Filter-Retardations-Assay eingesetzt (Scherzinger et al., 1997). Er basiert auf der Tatsache, dass große Aggregate eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 μm nicht passieren können und deshalb zurückgehalten werden. Diese zurückgehaltenen Aggregate können dann immunologisch detektiert werden.

Für den Filter-Retardations-Assay wurde eine Nitrocellulose-Acetat-Membran mit einer Porengröße von 0,2 μm verwendet (Schleicher & Schuell), die mit 0,1% SDS oder Puffer äquilibriert wurde. Aggregationsreaktionen, die gegebenenfalls mit 2% SDS, 50 mM DTT aufgekocht wurden, wurden auf die Membran aufgetragen. Durch eine spezielle Slot-Blot-Apparatur (Hoefer) wurden die Proben mit Hilfe eines Vakuums durch die Membran gesaugt. Nach anschließendem zweimaligem Waschen mit 0,1% SDS oder Puffer wurde die Membran in PBST + 5% Milchpulver blockiert. Detektion der Aggregate erfolgte immunologisch (siehe Western Blot).

2.2.3.3. Gelfiltrationschromatographie

Gelfiltrationschromatographie im analytischen Maßstab wurde mit Hilfe des SMART-Systems (Pharmacia) durchgeführt. Es wurde eine Superose6PC3.2/30 (Amersham) oder eine Superdex200PC32/30-Säule (Amersham) verwendet. Aggregationsreaktionen wurden wie üblich angesetzt. Vor der Gelfiltrationschromatographie wurden die Proben für 15 min bei 20 000 x g zentrifugiert, nur der Überstand wurde auf die Säule geladen. Es wurden 100 μl-Fraktionen gesammelt und durch anschließende Western Blot-Analyse (eventuell mit vorheriger TCA-Fällung) analysiert. Detektiert wurden ausschließlich lösliche Spezies. Größenbestimmung erfolgte durch Vergleich der Laufzeit mit der von Standardproteinen. Als Standardproteine wurden verwendet: Blue Dextran (2 MDa), Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Ovalbumin (43 kDa), RNAse (14 kDa).

2.2.3.4. Elektronenmikroskopie

Aggregationsreaktionen wurden wie vorher angesetzt und bei 30 °C, 300 Upm inkubiert. Nach 5 h wurde je ein Tropfen aus jeder Probe auf einen kohlebeschichteten Träger getropft. Nach einigen Minuten wurden die Tropfen abgesaugt und je 2% Uranylacetatlösung auf die Probe getropft. Nach 1 min wurde die Uranylacetatlösung abgesaugt. Anschließend wurde Puffer aufgetropft und abgesaugt. Die Proben wurden in einem Philips CM12 Elektronenmikroskop von Frau Bharathi Vasudeva Rao analysiert.

2.2.3.5. Fluoreszenz-Markierung von Proteinen mit thiolreaktiven Farbstoffen

Zur Markierung eines einzelnden Cysteins in Huntingtin-Fusionsproteinen wurden thiolreaktive Farbstoffe verwendet. Die Reaktion erfolgte mit mindestens 50 µM Protein in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM KCl, 10% Glycerol für GST-Huntingtin-Fusionsproteine und in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 400 mM KCl für MBP-Huntingin-Fusionsproteine. 20facher Überschuß an Fluorophor wurde mit dem Protein für 3 h auf Eis inkubiert. Nichtgebundener Farbstoff wurde anschließend durch Entsalzungssäulen (BioSpin 30) entfernt. Die Markierungsausbeute wurde spektrometrisch mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt.

2.2.3.6. Fluoreszenz-Markierung von Proteinen mit lysinreaktiven Farbstoffen

Zur Markierung von TRiC wurde ein lysinreaktiver Farbstoff verwendet. TRiC (23 µM) wurde mit 3fachem Überschuß Farbstoff für 1 h bei 20 °C inkubiert. Der Markierungspuffer war hierbei 20 mM HEPES-KOH, pH 7,4, 1 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 10% Glycerol. Nichtgebundener Farbstoff wurde durch Entsalzungssäulchen (BioSpin 30) entfernt.

2.2.3.7. Doppelmarkierungen

Für intramolekulare FRET-Messungen wurden doppelmarkierte Proteine benötigt. Für Doppelmarkierungen mit NCD-4 (Donor) und einem thiolreaktiven Farbstoff (Akzeptor) wurde das Protein zuerst 2 h auf Eis mit 20fachem Überschuß NCD-4 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 5,5 inkubiert, danach wurde durch ein Entsalzungssäulchen (BioSpin 30) gleichzeitig überschüssiger Farbstoff entfernt und der Puffer gewechselt (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM KCl, 10% Glycerol). Inkubation mit dem zweiten,

thiolreaktiven Farbstoff erfolgte 3 h auf Eis mit 30fachem Überschuß an Farbstoff. Anschließend wurde nichtgebundener Farbstoff durch Entsalzungssäulchen (BioSpin 30) entfernt. Die Bestimmung der Markierungseffizienz erfolgte spektrometrisch mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten. Das Donor-Akzeptor-Verhältnis war ungefähr 1:1. NCD-4 wurde kovalent an einen von zwei Glutamat-Resten im C-terminalen Ende des Proteins gebunden (Schaffar et al., 2004).

Für Doppelmarkierungen mit zwei thiolreaktiven Farbstoffen wurde ein Protein mit zwei Cysteinen verwendet, die differentiell markiert wurden. Zuerst wurde das Protein mit 5-10fachem Überschuß Donor bzw. N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)ethylenediamin 2 h auf Eis in 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM KCl, 10% Glycerol inkubiert. Anschließend wurde nicht-gebundenes Protein durch ein Entsalzungssäulchen (BioSpin 30) entfernt. Danach wurde das Protein mit 50fachem Überschuß Akzeptor in 50 mM Tris, pH 8,5, 250 mM KCl, 10% Glycerol für mindestens 3 h auf Eis inkubiert. Nichtgebundenes Protein wurde wieder durch eine Entsalzungssäule (BioSpin 30) entfernt. Die Bestimmung der Markierungseffizienz erfolgte spektrometrisch mit Hilfe der molaren Extinktions-koeffizienten. Das Donor-Akzeptor-Verhältnis war ungefähr 1:1.

2.2.3.8. Fluoreszenzspektroskopie

Die Aggregation von Htt-Exon1 wurde mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Dabei wurde der umgebungssensitive Fluoreszenzfarbstoff 1,5-IAEDANS verwendet. Die Fluoreszenz wurde in einer Quarzglasküvette in einem Fluorimeter (Perkin ElmerLS50B oder Fluorolog3, Jobin Yvon) bei 30 °C gemessen. Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 360 nm. Es wurden sowohl die Emissionsspektren zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen als auch der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz bei einer bestimmten Wellenlänge (475 nm oder 445 nm). Als Kontrolle wurde entweder Puffer oder 1 µM unmarkiertes Protein verwendet, die entsprechenden Emissionsspektren wurden als Hintergrundsignal vom Signal abgezogen. Zur Analyse der Aggregation durch Fluoreszenz-spektroskopie wurde 1 µM markiertes GST-myc-Htt53Q bzw. MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His mit 1 U PreScission™Protease direkt in der Küvette inkubiert (Gesamtvolumen 150 µl). In diesem Fall war Schütteln während der Inkubation nicht möglich, vor jeder Messung der Emissionsspektren wurde jedoch der Ansatz durch Auf-und Abpipettieren gemixt.

Analyse der Hydrophobizität von Proteinen durch bis-ANS wurde an einem PerkinElmerLS50B-Fluorimeter bei 30 °C durchgeführt. Die Aggregation erfolgte direkt in

der Quartzglasküvette. Zu einer Aggregationsreaktion mit 1,5 µM GST-C4S-myc-Htt53Q wurde 45 µM bis-ANS gegeben. Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 400 nm, die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm registriert.

2.2.3.9. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ist die strahlungsfreie Energie-Übertragung von einem angeregten Donor auf ein Akzeptormolekül durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die Transfer-Effizienz hängt hierbei vom spektralen Überlapp zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, der Quantenausbeute des Donors, der relativen Orientierung der Fluorophore zueinander und dem Abstand der beiden Fluorophore voneinander ab (Förster, 1965). Die Transfer-Effizienz berechnet sich nach folgender Formel:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Hierbei ist R_0 die Distanz, bei der die Transfer-Effizienz 50% beträgt. R_0 heißt Förster-Distanz.

R_0 berechnet sich nach folgender Formel:

$$R_0 = 9{,}78 \cdot 10^3 \left[\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)\right]^{1/6}$$

Q_D ist dabei die Quantenausbeute des Donors,
n der Brechungsindex des Mediums,
κ^2 der Orientierungsfaktor,
$J(\lambda)$ das Überlapp-Integral.
Für n wurde 1,33 verwendet, für κ^2 wurde 2/3 gewählt, was einer zufälligen Rotation der Fluorophore entspricht.

$J(\lambda)$ wurde anhand normalisierter Emissions-und Absorptionsspektren von Donor bzw. Akzeptor nach folgender Formel ermittelt:

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d(\lambda)$$

$F_D(\lambda)$ ist dabei die Fluoreszenz-Intensität des Donors bei der Wellenlänge λ,
$\varepsilon_A(\lambda)$ der Extinktionskoeffizient des Akzeptors bei der Wellenlänge λ.

Zur Bestimmung der Quantenausbeute Q_D wurden aus den Absorptions- und Emissionsspektren des gebundenen Farbstoffes die maximale Emission E_{max} und die Absorption bei der Anregungswellenlänge λ $A_{\lambda(exc)}$ bestimmt. Als Referenz diente Quininsulfat in 0,1N H_2SO_4. Die Quantenausbeute von Quininsulfat Q_{St} ist dabei 0,55.

$$Q_D = Q_{St} \cdot \frac{E_{D,\max}}{A_{D,\lambda(exc)}} \cdot \frac{A_{St,\lambda(exc)}}{E_{St,\max}}$$

Q_{St} ist die Quantenausbeute der Referenzsubstanz Quininsulfat,

$A_{St,\lambda(exc)}$ ist die Absorption des Standards bei der Anregungswellenlänge λ (exc),

$A_{D,\lambda(exc)}$ ist die Absorption des Donors bei der Anregungswellenlänge λ (exc),

$E_{D,max}$ ist die maximale Emission des Donors,

$E_{St,max}$ die maximale Emission des Standards.

Für die Berechnung der Transfer-Effizienz wurde die Fluoreszenzintensität des Donors bestimmt, und zwar sowohl in Anwesenheit des Akzeptors als auch in Abwesenheit. Daraus ergibt sich die Transfer-Effizienz nach folgender Formel:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

F_{DA} ist die Fluoreszenzintensitäts des Donors in Anwesenheit des Akzeptors

F_D ist die Fluoreszenzintensität des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

Aus der Transfer-Effizienz kann für ein bestimmtes Donor-Akzeptor-Paar mit einer bestimmten Förster-Distanz die Distanz der Fluorophore zueinander berechnet werden. FRET eignet sich somit als spektroskopisches Lineal (Stryer, 1978). Auch der zeitliche Verlauf von Reaktionen kann mit Hilfe von FRET verfolgt werden, wenn sich dabei die Abstände zwischen den Fluorophoren geeignet ändern. In dieser Arbeit wurde FRET zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen eingesetzt.

Für die Analyse des zeitlichen Verlaufs von Aggregatiosreaktionen wurde je 0,5 µM Donor-markiertes Huntingtin-Fusionsprotein mit je 0,5 µM Akzeptor-markiertem Huntingtin-Fusionsprotein gemischt. PreScission™Protease wurde direkt in die Küvette gegeben. Die Reaktion fand bei 30 °C statt. FRET wurde anhand des Rückgangs der Donor-Emission registriert. Anregungswellenlänge war für 1,5-IAEDANS als Donor 360 nm, Emission wurde

bei 445 nm registriert. Zusätzlich wurden Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm aufgenommen. Als Kontrolle wurden die Emissionsspektren von Puffer oder unmarkiertem Protein aufgenommen und von den jeweiligen Emissionsspektren als Hintergrund abgezogen.

Für die Analyse der intramolekularen Kompaktion wurde mit Donor-und Akzeptor doppelmarkiertes GST-C4S-myc-Htt53Q, verwendet (Donor: NCD-4, Akzeptor: IANBD-Ester). 1 μM doppelmarkiertes Protein wurde in eine Quarzglasküvette gegeben, direkt dazu PreScission™-Protease. Die Emission des Donors bei 415 nm wurde bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm registriert. Als Kontrolle wurden Reaktionen mit NCD-4-markiertem Protein gemessen.

FRET wurde in dieser Arbeit auch zur Distanzmessung verwendet. Hierzu wurde mit Donor und Akzeptor doppelmarkiertes GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His verwendet (Donor: 1,5-IAEDANS, Akzeptor: Fluorescein). Dieses aggregierte für mindestens 16 h bei 30 °C. Nach Pelletieren des aggregierten Materials und anschließender Resuspension in Puffer wurde das Emissionsspektrum gemessen. Anregungswellenlänge war hierbei 360 nm. Das Emissionsspektrum nichtmarkierter Aggregate gleicher Proteinkonzentration wurde vom jeweiligen Emissionsspektrum abgezogen, da Aggregate relativ starke Lichtstreuung zeigen.

2.2.3.10. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Zur Analyse der Huntingtin-Aggregation wurden auch konfokale Einzelmolekül-Messungen durchgeführt, die auf Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) basieren. Klassische Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie beruht auf der Analyse von Fluktuationen in der Fluoreszenz, die durch Diffusion der markierten Moleküle durch ein Fokusvolumen von ungefähr 1 fl hervorgerufen wird. Durch Verwendung eines Zwei-Laser-*Setups* kann die Komplexbildung durch SIFT-Analyse (*Scanning for intensely fluorescent targets*)(Giese et al., 2005) oder durch Kreuzkorrelationsanalyse (Schwille et al., 1997) beobachtet werden. Zusätzlich kann die molekulare Helligkeit der Partikel, die mit der Größe korrespondiert, und die Konzentration der jeweiligen Partikel durch Fluoreszenz-Intensitätsverteilungsanalyse (FIDA: *Fluorescence Intensity Distribution Analysis*) (Kask et al., 2000; Palo et al., 2000) erhalten werden.

Konfokale Einzelmolekülmessungen wurden an einem Insight Reader (Evotec-Technologies, Hamburg) in 96-Well-Platten (Evotec-Technologies, Hamburg) mit einem

Probenvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Proben waren dabei stark verdünnt. Es wurde entweder ein Zwei-Laser-Setup mit Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm und 633 nm verwendet, oder nur mit einem Laser bei 488 nm angeregt. Es wurde ein 40 x 1,2 NA Mikroskop-Objektiv verwendet (Olympus, Japan). Die Messungen wurden bei FIDA-Einstellungen durchgeführt, der Blendendurchmesser betrug 70 µm. Die Laserleistung lag bei 200 µW für den 488 nm-Laser und bei 300 µW für den 633 nm-Laser. Die Messungen wurden für 15 s bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Länge eines *Scans* betrug 100 µm, die *Beamscanner*-Frequenz war 50 Hz, die Tischbewegung lag bei 2000 µm. Die Daten wurden mit Hilfe der FCSPP Evaluations-Software (version 2) (Evotec-Technologies, Deutschland) analysiert.

Für SIFT und FIDA-Analyse wurde ein FRET-basierter Ansatz verwendet. Hierbei wurde Donor-markiertes Protein mit dem 488 nm-Laserstrahl angeregt, jedoch nur die Fluoreszenz des Akzeptors registriert, also nur FRET-positive Partikel.

Zur Analyse der Huntingtin-Aggregation wurde je 1 µM AlexaFluor®488- und 1 µM AlexaFluor®633-markiertes GST-C4S-myc-Htt53Q gemischt und mit 2 U PreScission™-Protease versetzt. Die Aggregationsreaktion wurde bei 30 °C, 300 Upm auf dem Schüttler inkubiert. Zur Einzelmolekül-Analyse wurden die Proben jeweils 1:100 verdünnt und je 20 µl analysiert.

Zur Analyse von TRiC-Huntingtin-Komplexen wurde 2 µM AlexaFluor®488 GST-C4S-myc-Htt53Q mit 1 µM TRiC-Alexa-Fluor®647 inkubiert, dann wurde die Reaktion mit PreScission™Protease gestartet. Die Aggregationsreaktion wurde wiederum bei 30 °C, 300 Upm auf dem Schüttler inkubiert. Zur Analyse wurden die Proben jeweils 1:200 verdünnt.

3. ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde die polyglutamin (polyQ)-abhängige Huntingtin-Aggregation auf molekularer Ebene untersucht. Ein besonderes Interesse lag hierbei auf der frühen Phase der Aggregation, da frühe Intermediate eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Neurotoxizität spielen. Durch Einzelmolekül-Analyse wurde auch die Elongationsphase näher untersucht (Kapitel 3.1.).

Strukturanalyse von unlöslichen Aggregaten bleibt auch in Zukunft eine Herausforderung. FRET-Analyse wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, Hinweise auf die Struktur von Aggregaten zu erhalten (Kapitel 3.2.).

Chaperone spielen eine wichtige Rolle in der Modulation der Aggregation. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des eukaryontischen Chaperonins TRiC auf das Aggregationsverhalten von Huntingtin untersucht (Kapitel 3.3.).

3.1. Molekulare Analyse der Huntingtin-Aggregation

3.1.1. Frühe Phase der Aggegation

Die polyglutaminabhängige Aggregation von Huntingtin mit verlängerter Polyglutaminsequenz ist eine charakteristische Eigenschaft der Huntington'schen Erkrankung. Hierbei werden durch proteolytische Spaltung kleinere Fragmente freigesetzt, die im weiteren Verlauf der Erkrankung aggregieren. Für die *in vitro*-Analyse der Aggregation kann diese Situation durch Verwendung eines GST-Fusionsproteins reproduziert werden (Scherzinger et al., 1997). Die Fusion von Exon1 des Huntingtin-Proteins (Htt-Exon1) mit GST erlaubt die Expression und Reinigung in *E. coli*, während Htt-Exon1 mit pathologischer Polyglutaminlänge ohne Fusionspartner nicht löslich ist. Eine spezifische Protease-Schnittstelle zwischen den beiden Fusionspartnern ermöglicht die gezielte Htt-Exon1-Freisetzung, was den Beginn der Aggregationsreaktion darstellt. Morphologisch und biochemisch sind die dabei gebildeten Aggregate mit *in vivo* gebildeten Aggregaten vergleichbar.

3.1.1.1. Analyse der frühen Phase der Aggregation durch Fluoreszenz

Für die Analyse der *in vitro*-Aggregation wurde in der Vergangenheit ein Filter-Retardations-Assay etabliert (Scherzinger et al., 1997). Der Nachteil dieses Filter-Retardations-Assays besteht darin, dass nur die Endprodukte der Aggregation, nämlich große, SDS-resistente Aggregate detektiert werden können. Es etabliert sich allerdings in letzter Zeit immer mehr die Idee, dass nicht die vollständig aggregierten Fibrillen, sondern vielmehr die oligomeren löslichen Intermediate das eigentliche toxische Agens sind (siehe Einleitung). Zur Analyse dieser Spezies wurden in dieser Arbeit neue Methoden etabliert. Bei vielen biophysikalischen Methoden, die geeignet wären, Aussagen über die Eigenschaften der Intermediate zu machen, wie z.B Circulardichroismus oder Lichtstreuungsexperimente, stört der Beitrag von GST und der PreScission™Protease. Durch fluoreszenzbasierte Methoden, bei denen ein Fluorophor kovalent an Htt-Exon1 gekoppelt wird, kann dieses Problem umgangen werden. Umgebungssensitive Fluorophore können als wertvolle Indikatoren für die Konformation eines Proteins dienen. Hierbei ändert sich sowohl die Quantenausbeute als auch das Emissionsmaximum des Farbstoffes je nach Polarität der Umgebung.

Für die Fluoreszenz-Analyse von Htt53Q wurde ein GST-Htt53Q-Fusionsprotein konstruiert, das nur ein einzelnes Cystein im *c-myc-tag* besitzt, Cysteine im GST wurden zu Serin mutiert (N. Tzvetkov) (GST-C4S-myc-Htt53Q) (Abb. 3-1A). An das einzelne Cystein können thiolreaktive Farbstoffe kovalent gebunden werden. Die Aggregationskinetik des GST-C4S-myc-Htt53Q zeigt keine Unterschiede im Vergleich zu GST-myc-Htt53Q, daraus kann man schließen, dass die eingeführte Mutation keine zusätzliche Strukturveränderung verursacht. GST-C4S-myc-Htt53Q kann wie GST-myc-Htt53Q durch Glutathion-Sepharose gereinigt werden (Abb. 3-1B) und zeigt wie GST-myc-Htt53Q ein ungewöhnliches Laufverhalten im SDS-Gel, das nicht dem theoretischen Molekulargewicht entspricht. In Abbildung 3-1C und 3-1D ist eine typische Aggregationsreaktion gezeigt, die durch Western Blot-Analyse und Filter-Retardations-Assay analysiert wurde. Im Western Blot (Abb. 3-1C) konnte das GST-C4S-Fusionsprotein in Spur 1 (ohne Spaltung durch PreScission™Protease) detektiert werden. Nach Zugabe der Protease verschwand diese Bande innerhalb der ersten 15 min. Zu dieser Zeit konnten die ersten SDS-resistenten Aggregate im Filter-Retardations-Assay detektiert werden (Abb. 3-1D). Die Menge der SDS-unlöslichen Aggregate nahm im weiteren Verlauf der Aggregation deutlich zu, im Western Blot konnten nach ca. 4 h SDS-unlösliche Aggregate in den Taschen des Sammelgels detektiert werden (Abb. 3-1C).

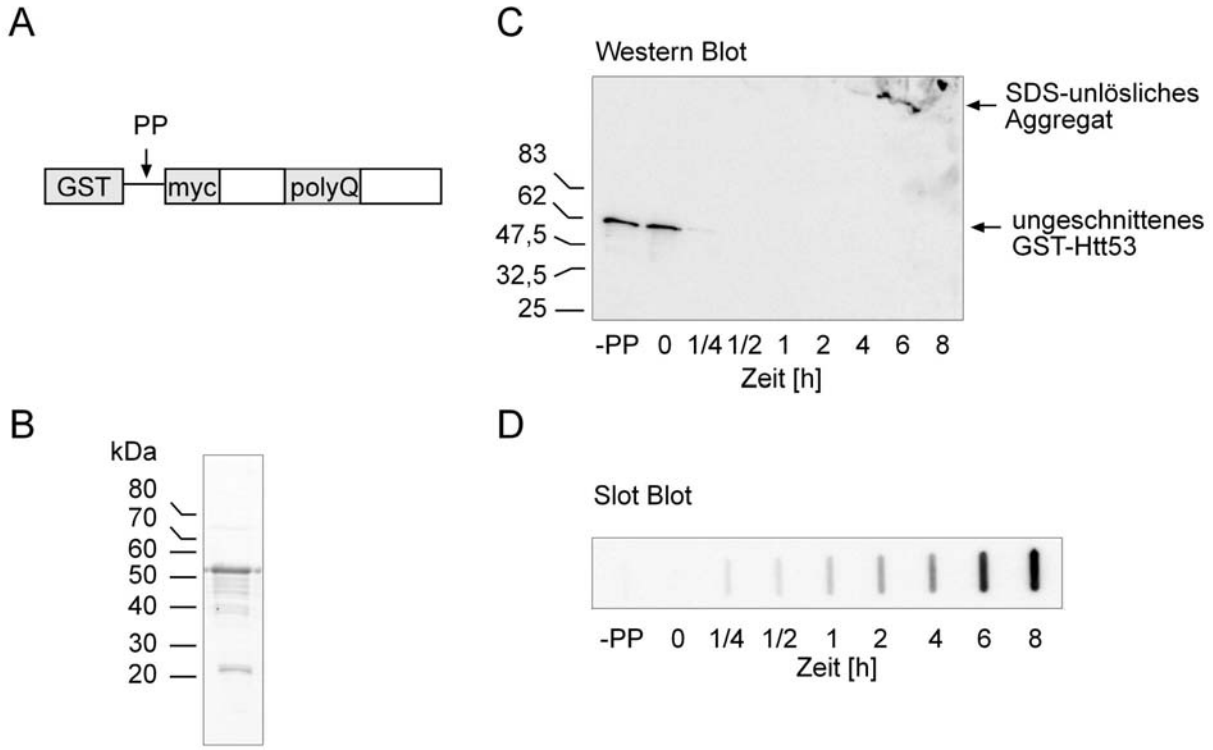

Abb. 3-1: Eigenschaften von GST-C4S-myc-Htt53Q (A) Schematische Darstellung von GST-C4S-myc-Htt53Q. (B) Coomassie-gefärbtes 12 %-Polyacrylamidgel mit gereinigtem GST-C4S-myc-Htt53Q. GST-C4S-myc-Htt53Q läuft im SDS-Polyacrylamidgel nicht bei seiner theoretischen Größe. (C) Western Blot Analyse einer Aggregationsreaktion. 3 µM GST-C4S-myc-Htt53Q wurde mit 2,5 U PreScission™-Protease versetzt und bei 30 °C, 300 Upm inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Kochen für 5 min bei 95 °C in 2% SDS, 50 mM DTT gestoppt. Je 5 µl wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und durch SDS-PAGE und anschließende Western Blot Analyse analysiert. Myc-Htt53Q wurde mit Hilfe des anti-c-myc-Antikörpers immunologisch detektiert. (D) Filter-Retardations-Assay einer Aggregationsreaktion. Die Ansätze aus (C) wurden nach Aufkochen in 2% SDS, 50 mM DTT 1:10 mit 0,1% SDS verdünnt und durch eine Nitrocellulose-Acetat-Membran mit Porengroße 0,2 µm gefiltert. Die Aggregate wurden anschließend immunologisch mit dem anti-c-myc-Antikörper detektiert.

Für die Fluoreszenz-Analyse wurde GST-C4S-myc-Htt53Q mit IAEDANS markiert, das kovalent an das einzelne Cystein gekoppelt wurde. Ein repräsentatives Absorptionsspektrum des markierten Proteins ist in Abbildung 3-2A zu sehen. Es konnte ein Markierungsverhältnis von ungefähr 1:1 (Fluorophor:Protein) erzielt werden. Der gekoppelte Farbstoff störte die Aggregationseigenschaften nicht, im Filter-Retardations-Assay waren wie beim unmarkierten Protein nach 15 min die ersten SDS-unlöslichen Aggregate detektierbar (Abb. 3-2B). Die etwas höhere Intensität der Banden in Abbildung 3-2B im Vergleich zu 3-1D ist durch eine längere Exposition des Blots zu erklären, dies hatte jedoch keine Auswirkung auf die Kinetik der Aggregation.

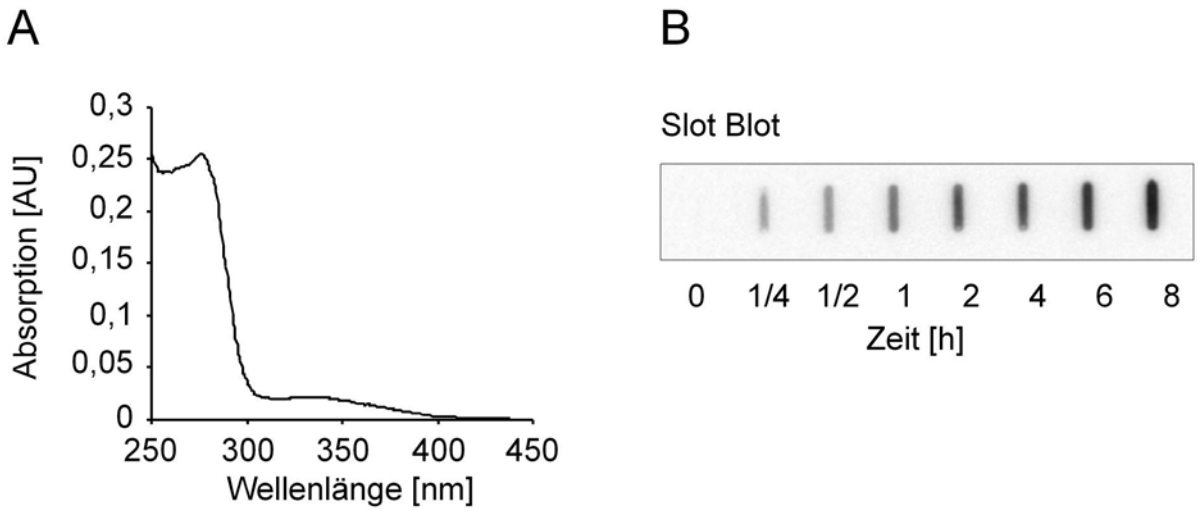

Abb. 3-2: Markierung von GST-4CS-myc-Htt53Q mit IAEDANS. (A) Absorptionsspektrum des markierten Proteins. (B) Filter-Retardations-Assay einer Aggregationsreaktion mit markiertem GST-C4S-Htt53Q. Die Reaktion wurde wie in Abb.3-1 beschrieben durchgeführt.

Wie bereits oben erwähnt, ist IAEDANS ein umgebungssensitiver Fluoreszenzfarbstoff. Je hydrophober dabei das Lösungsmittel ist, desto mehr verschiebt sich das Emissionsspektrum hin zu kürzeren Wellenlängen (Blauverschiebung) (Abb. 3-3A). Sein Emissionsmaximum in Wasser liegt bei 485 nm (Abb. 3-3A). Kopplung an GST-C4S-myc-Htt53Q verschiebt das IAEDANS-Emissionsmaximum, es liegt dann bei 475 nm (Abb. 3-3B). Dies entspricht einer Blauverschiebung um 10 nm, d.h. der gebundene Fluorophor befindet sich in einer hydrophoberen Umgebung. Denaturiert man GST-C4S-myc-Htt53Q in 6 M Guanidinhydrochlorid, so liegt der Fluorophor exponiert in deutlich polarer Umgebung, das Emissionsmaximum liegt jetzt bei 495 nm. Die Rotverschiebung des Emissionsspektrums wird von einer Verringerung in der Fluoreszenzintensität begleitet (Abb. 3-3B). IAEDANS kann also dazu verwendet werden, Konformationsänderungen während der Aggregation zu detektieren, die sich in einer Änderung der Polarität der Umgebung des Fluorophors äußern. Dazu wurde die Intensität der IAEDANS-Fluoreszenz bei gleich bleibender Anregungswellenlänge (360 nm) in der frühen Phase der Aggregation verfolgt. Es wurde eine Abnahme der Fluoreszenz um 30% beobachtet (Abb. 3-3C), die unter den gewählten Bedingungen für 1 µM Protein nach ungefähr 120 min ein Plateau erreichte. Diese Intensitätsverringerung wurde von einer Rotverschiebung des Emissionspektrums um 10 nm begleitet (Abb. 3-3D). Während der ersten 120 min ändern sich also die Konformations-eigenschaften deutlich, der Fluorophor wird exponiert, sein Emissionsmaximum entspricht dem von ungebundenem Fluorophor.

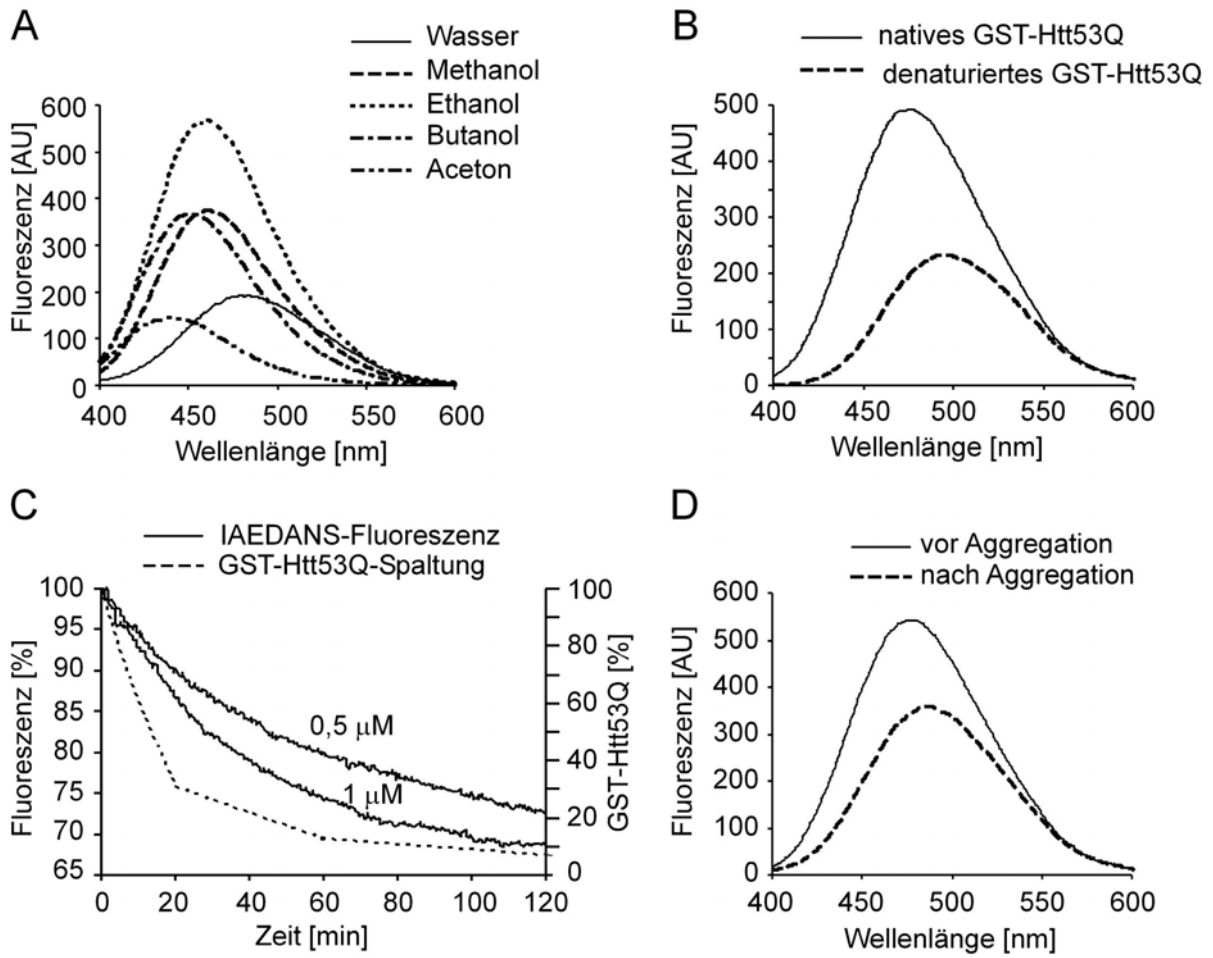

Abb. 3-3: Fluoreszenz-Analyse von IAEDANS-Htt53Q. (A) Emissionsspektren von IAEDANS in verschiedenen Lösungsmitteln. Je nach Lösungsmittel ändern sich Quantenausbeute und Emissionsmaximum. Die Emissionsspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm aufgenommen. (B) Emissionsspektren von GST-C4S-myc-Htt53Q-IAEDANS vor und nach Denaturierung in 6 M Guanidinhydrochlorid. Anregungswellenlänge war 360 nm. (C). Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz-Abnahme während der frühen Phase der Huntingtin-Aggregation. 1 µM bzw. 0,5 µM GST-C4S-myc-Htt53Q-IAEDANS wurde mit 1 U PreScission™-Protease versetzt und die Abnahme der Fluoreszenz beobachtet. Anregungswellenlänge war 360 nm, Emission wurde bei 475 nm registriert. Die Spaltung von GST-C4S-myc-Htt53Q wurde durch Western Blot analysiert. (D) Emissionsspektren von GST-C4S-myc-Htt53Q-IAEDANS vor Beginn der Aggregation und nach 2 h Aggregation. Anregung war bei 360 nm.

Die Abnahme der Fluoreszenz erfolgte im Vergleich zur Spaltung des GST-C4S-myc-Htt53Q-Proteins leicht verzögert (Abb. 3-3C). Die Fluoreszenzkinetik kann dabei weder mit einer unimolekularen noch mit einer bimolekularen Reaktion angenähert werden, es handelt sich also weder um eine reine Umlagerung des Proteins noch um eine reine Dimerisierung. Sehr wahrscheinlich überlagern sich hier mehrere Reaktionen, wie die Spaltung des Proteins und die Bildung von Monomeren, Dimeren und höhermolekularen Oligomeren. Da die Reaktionsgeschwindigkeit konzentrationsabhängig und langsamer als die Spaltungskinetik ist, kann man davon ausgehen, dass es sich hauptsächlich um die Bildung kleiner oligomerer Spezies handelt, wie z.B. Dimere und Trimere. Das Plateau wurde nach ungefähr 120 min erreicht, zu dieser Zeit waren bereits Aggregate im Filter-Retardations-Assay detektierbar. Es

laufen also mehrere Prozesse gleichzeitig ab, je nach Methode kann aber nur der eine oder andere Prozess registriert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der ersten Phase der Aggregation wahrscheinlich Dimere und/oder Trimere gebildet werden, die veränderte Konformationseigenschaften aufweisen im Vergleich zum Fusionsprotein vor der Spaltung.

Zur Analyse der Konformation in unmittelbarer Nähe zur Polyglutaminregion selbst wurde ein weiteres Konstrukt hergestellt (MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His) (Abb. 3-4A), in dem sich das einzelne Cystein zur Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes unmittelbar vor der Polyglutaminregion befindet. Es wurde ein MBP (*maltose binding protein*)-Fusionsprotein verwendet, das anstelle eines *c-myc-tags* einen HA-*tag* enthält. Außerdem wurde ein Hexahistidin-*tag* eingeführt, der Affinitätsreinigung des vollständigen Proteins ermöglicht, da wie beim GST-Htt-Fusionsprotein starker C-terminaler Abbau erwartet wurde. Weder MBP, Htt-Exon1 noch der HA-*tag* enthalten Cysteine. MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His konnte nur in geringen Mengen unter speziellen Bedingungen exprimiert werden (siehe Material und Methoden). Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe von Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose und nachfolgender Gelfiltration. Abbildung 3-4B zeigt das gereinigte Protein. Durch Spaltung mit PreScission^{TM}Protease wurde die Aggregation gestartet, SDS-unlösliche Aggregate konnten im Filter-Retardations-Assay mit einem anti-HA-Antikörper detektiert werden (Abb. 3-4C).

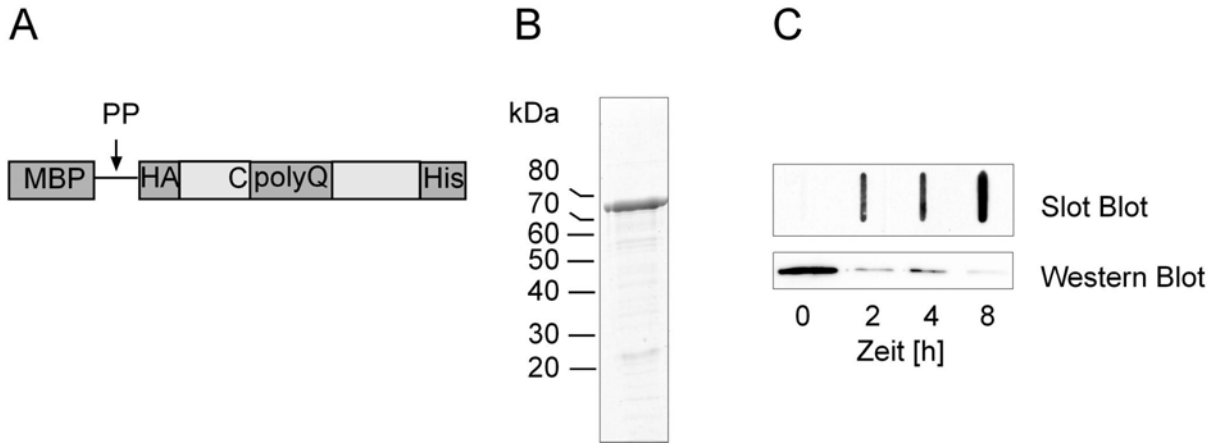

Abb. 3-4: Eigenschaften von MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His. (A) Schematische Darstellung des Konstrukts. (B) Coomassie-gefärbtes 12%-Polyacrylamidgel mit dem gereinigten Protein. (C) Filter-Retardations-Assay und Western Blot-Analyse von Aggregationsreaktionen mit MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His. 3 µM Protein wurde mit 2,5 U PreScission^{TM}Protease versetzt und bei 30 °C, 300 Upm inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Kochen in 2% SDS, 50 mM DTT gestoppt und entweder durch einen Filter-Retardations-Assay oder durch Western Blot Analyse analysiert. Immundetektion fand mit einem anti-HA-Antikörper statt.

Zur Fluoreszenz-Analyse wurde IAEDANS verwendet. Wie auch schon beim GST-C4S-myc-Htt53Q konnte ein Markierungsverhältnis von etwa 1:1 erreicht werden (Abb. 3-5A). Die Markierung störte die Aggregationsreaktion nicht (Abb. 3-5C).

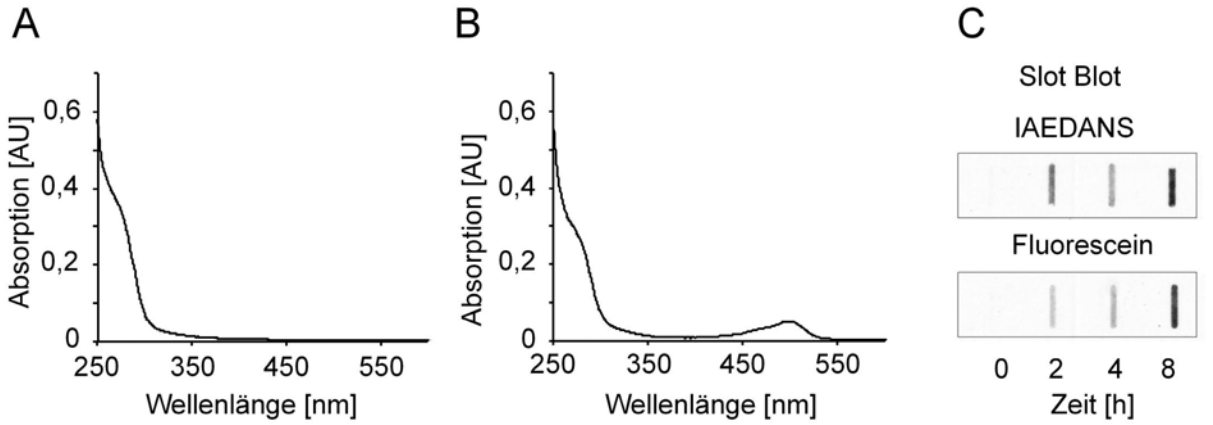

Abb. 3-5: Markierung von MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His mit IAEDANS oder Fluorescein. (A) Absorptionsspektrum von MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His-IAEDANS. (B) Absorptionsspektrum von MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His-Fluorescein. (C) Filter-Retardations-Assay einer Aggregationsreaktion von MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His-IAEDANS bzw. Fluorescein. Die Aggregationsreaktionen wurden mit 3 µM markiertem Protein + 2,5 U PreScission™Protease angesetzt, nach 8 h gestoppt und durch einen Filter-Retardations-Assay analysiert. Immundetektion erfolgte durch einen anti-HA-Antikörper.

Wie bei GST-C4S-myc-Htt53Q konnte eine Abnahme der IAEDANS-Fluoreszenz beobachtet werden. Allerdings war die Reaktion hier deutlich langsamer als bei GST-C4S-Htt53Q, dies entspricht jedoch der langsameren Spaltungskinetik des MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His. Das Plateau wurde nach ungefähr 6 h erreicht (Abb. 3-6A), zu diesem Zeitpunkt waren bereits Aggregate im Filter-Retardations-Assay detektierbar. Im ungespaltenen Protein lag das Emissionsmaximum des Donors bei 466 nm. Während der Aggregation wurde eine Blauverschiebung des Spektrums zu einem Emissionsmaximum von 460 nm beobachtet (Abb. 3-6B). Die Umgebung des Fluorophors wurde also während der Dimerisierung deutlich hydrophober als im unstrukturierten Protein. Dies deutet auf eine kompaktere Struktur der Polyglutaminregion hin.

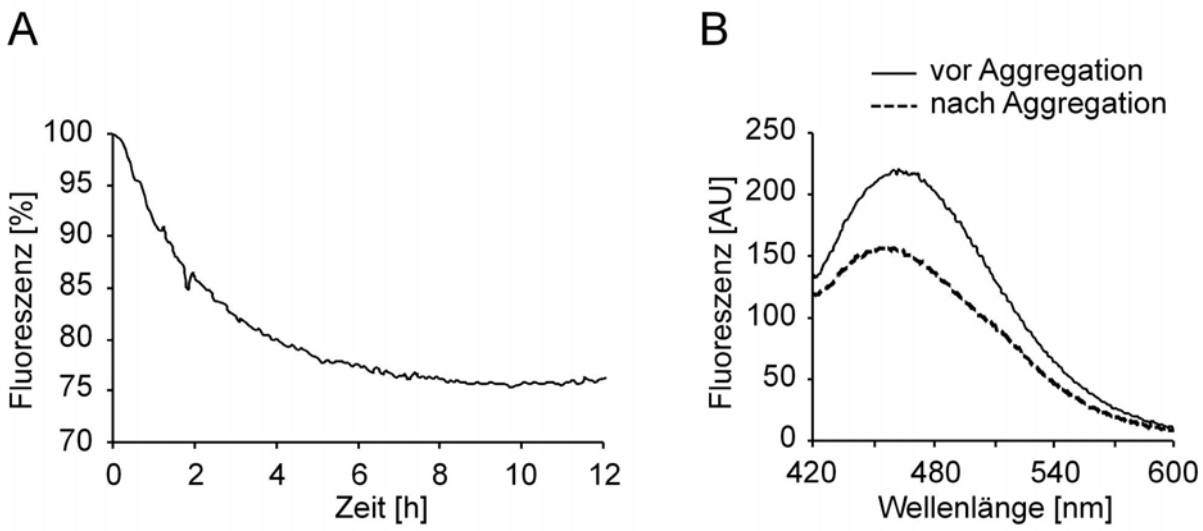

Abb. 3-6: Fluoreszenz-Analyse von MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His-IAEDANS. (A) Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Fluoreszenz. 1 µM Protein wurde mit 1 U PreScission™Protease versetzt und die Emission bei 445 nm registriert. Anregungswellenlänge war 360 nm. (B) Emissionsspektren vor und nach der Aggregation. Anregungswellenlänge war 360 nm.

Weitere umgebungssensitive Fluorophore wie z.B. Bis-ANS können ebenfalls eingesetzt werden, um Konformationsänderungen eines Proteins, die mit Änderungen in der Hydrophobizität einhergehen, zu detektieren. Bis-ANS bindet an zugängliche hydrophobe *Cluster*. Bindung bewirkt dabei eine starke Zunahme der Fluoreszenz und eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums.

Abb. 3-7: Analyse der Huntingtin-Aggregation durch Bis-ANS-Fluoreszenz. Zu einer Aggregationsreaktion mit 1,5 µM GST-C4S-myc-Htt53Q mit 1 U PreScission™Protease wurde 45 µM Bis-ANS gegeben. Aggregation fand direkt in der Küvette statt. Anregungswellenlänge war 400 nm, die Emission wurde bei 490 nm gemessen.

Während der Htt53Q-Aggregation (GST-myc-Htt53Q) nahm die Bis-ANS-Fluoreszenz kontinuierlich zu (Abb. 3-7), dies korrespondiert mit einer Konformationsänderung während der Aggregation. Dabei spricht die Kontinuität der Fluoreszenzzunahme für einen

kontinuierlichen Prozess ohne das Auftreten von anders strukturierten Intermediaten. Nach ca. 8-9 h wurde ein Zwischenplateau erreicht, danach stieg die Bis-ANS-Fluoreszenz weiter an, ein Plateau wurde während einer Messdauer von 12 h nicht erreicht (Abb. 3-7). Dies korrespondiert mit früheren Beobachtungen, nach denen die SDS-resistente Aggregation nach 8 h weitgehend abgeschlossen ist, die Fibrillen aber danach noch weitere Umlagerungen durchmachen und sich zu größeren Komplexen zusammenlagern (Schaffar, 2004).

3.1.1.2. Analyse der frühen Phase der Aggregation durch FRET

Zur Analyse der Dimerisierung kann man einen weiteren Effekt nutzen: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). FRET ist der strahlungsfreie Energietransfer von einem angeregten Donor auf ein Akzeptormolekül durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die Transfer-Effizienz hängt hierbei vom spektralen Überlapp des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, der Quantenausbeute des Donors, der relativen Orientierung der Fluorophore zueinander und dem Abstand der beiden Fluorophore voneinander ab. FRET lässt sich anhand der Verminderung der Donor-Emission messen, die bei den hier verwendeten Fluorophoren gleichzeitig zu einer Erhöhung der Akzeptor-Emission führt. Durch Mischen einer Population von Donor-markiertem Htt53Q mit einer Population Akzeptor-markiertem Htt53Q und Registrierung von FRET während der Aggregation kann die Dimerisierung bzw. frühe Oligomerisierung verfolgt werden.

Als Donor wurde IAEDANS, als Akzeptor wurde Fluorescein-maleimid verwendet. Ein repräsentatives Absorptionsspektrum des Fluorescein-markierten MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His ist in Abbildung 3-5B zu sehen. Die Markierungseffizienz lag bei ungefähr 1:3 (Fluorophor:Protein). Die Markierung störte auch hier die Aggregationsreaktion nicht (Abb. 3-5C). Das Emissionsspektrum von IAEDANS zeigt einen deutlichen Überlapp mit dem Absorptionsspektrum von Fluorescein-maleimid (Abb. 3-8B). Das Überlapp-Integral $J(\lambda)$ beträgt $1{,}595 \times 10^{-13} M^{-1} cm^3$. Die Quantenausbeute von IAEDANS wurde mit Quininsulfat als Referenz errechnet und beträgt 0,02. Damit kann ein Förster-Radius R_0 von 29 Å errechnet werden. Distanzen in diesem Bereich kann das Donor-Akzeptor-Paar IAEDANS-Fluorescein am empfindlichsten detektieren.

Für die Registrierung der Dimerisierung allerdings wurden keine absoluten Abstände gemessen, sondern vielmehr die relativen Veränderungen während der Aggregation. Abbildung 3-8C zeigt das Emissionsspektrum vor bzw. nach der Aggregation. Es wurde eine Verminderung der Donor-Fluoreszenz beobachtet, die mit einer Erhöhung der Akzeptor-

Fluoreszenz korrespondiert. In Abbildung 3-8D kann die FRET-Kinetik, gemessen an der Abnahme der IAEDANS (Donor)-Fluoreszenz, verfolgt werden. Da IAEDANS selbst Veränderungen in der Fluoreszenz während der Aggregation zeigt, wurde die Kurve entsprechend korrigiert. Da für den Akzeptor keine 1:1-Markierung erzielt werden konnte, war auch hier eine entsprechende Korrektur nötig. Die Veränderung der FRET-Effizienz entspricht der Abnahme der korrigierten Donor-Fluoreszenz und erreicht am Ende der Reaktion ca. 25%. Interessanterweise entspricht die (korrigierte) FRET-Kinetik genau der Kinetik der Abnahme der IAEDANS-Fluoreszenz ohne Akzeptor. Beide repräsentieren wahrscheinlich die Dimerisierung des Proteins.

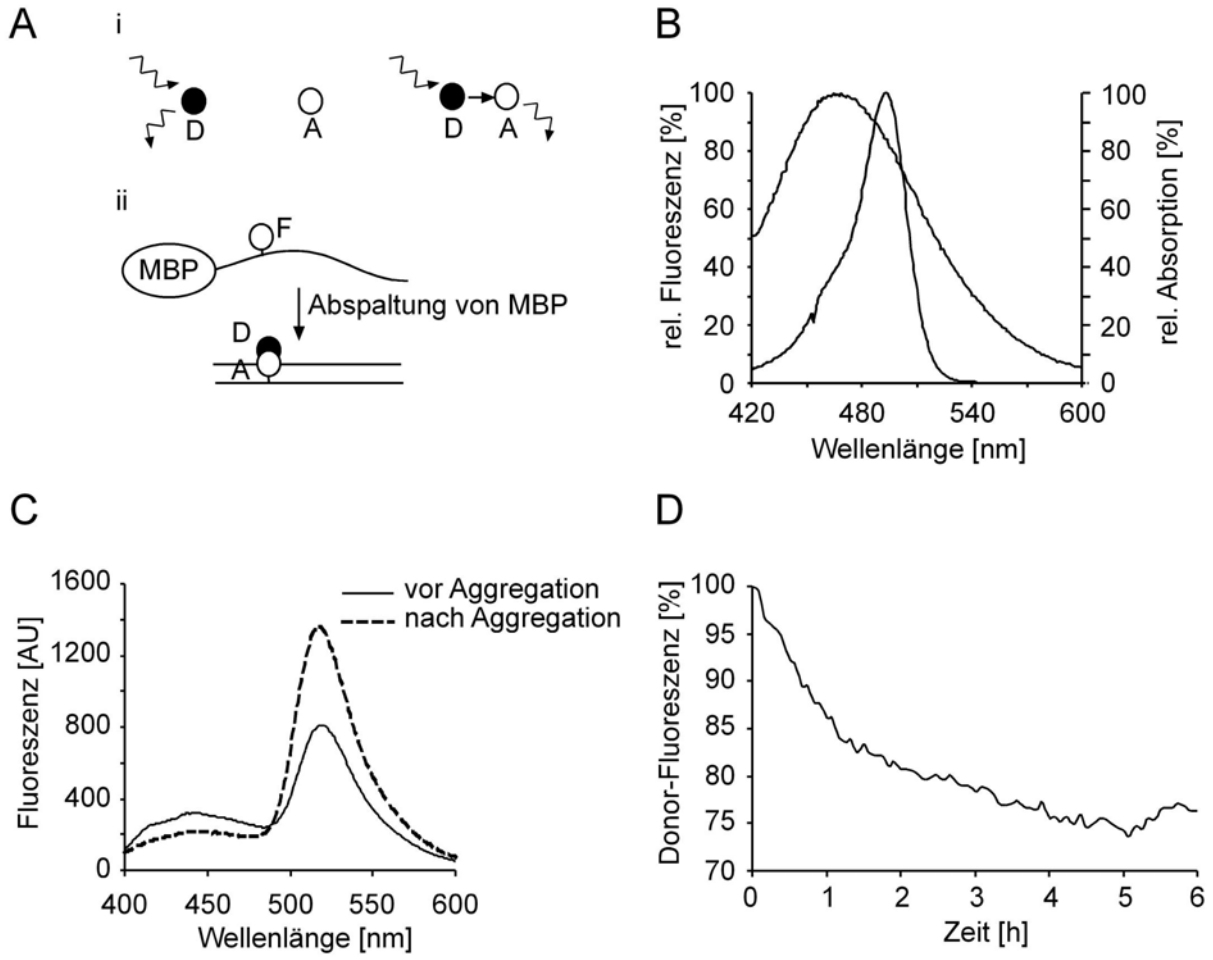

Abb. 3-8: FRET. (A) Schematische Darstellung der Dimerisierung, registriert durch FRET. (i) Die FRET-Effizienz ist abhängig von der Distanz der Fluorophore zueinander. Nur wenn Donor und Akzeptor nahe genug zusammen liegen, findet Energietransfer statt. (ii) Bei Dimerisierung nach Spaltung des Fusionsproteins gelangen die beiden Fluorophore in nächste Nähe, Dimerisierung kann durch FRET registriert werden. (B) Überlapp-Integral von IAEDANS und Fluorescein. (C) Emissionsspektren vor und nach der Aggregation. Anregungswellenlänge war 360 nm. (D) Zeitlicher Verlauf der Donor-Fluoreszenz. 0,5 µM Donor-markiertes MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His + 0,5 µM Akzeptor-markiertes MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His wurden mit 1 U PreScission™-Protease versetzt. Der zeitliche Verlauf der Donor-Fluoreszenz bei 445 nm bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm wurde verfolgt. Die Donor-Fluoreszenz wurde für nicht-komplette Markierung und Veränderungen der Donor-Fluoreszenz in Abwesenheit des Akzeptors korrigiert.

Zusätzliche FRET-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Raina Boteva durchgeführt. Dimerisierung konnte auch bei GST-myc-Htt53Q durch intermolekularen FRET verfolgt werden. Donor-Akzeptor-Paar war hierbei IAEDANS-IANBD (Schaffar et al., 2004).

Durch intramolekulare FRET-Experimente mit GST-myc-Htt53Q wurde die Konformationsänderung im Monomer verfolgt. Für intramolekularen FRET wurde GST-myc-Htt53Q sowohl mit Donor (NCD-4), der an ein Glutamat am C-terminus des Proteins gebunden war, als auch mit Akzeptor (IANBD), der kovalent an ein Cystein im *c-myc-tag* gekoppelt war, markiert. Die verwendeten Farbstoffe haben eine Förster-Distanz von 16,7 Å, sind also für die Messung kleiner Distanzen geeignet. Intermolekularer FRET zwischen Donor und Akzeptor an unterschiedlichen Molekülen trat nicht auf. Durch intramolekularen FRET konnte die Kompaktion des Monomers nach Spaltung mit PreScission^{TM}Protease registriert werden. Ein wichtiger Hinweis, dass hier die Umlagerung des Monomers verfolgt wurde, ist die Tatsache, dass die Reaktion konzentrationsunabhängig war. Die Kinetik der Kompaktion verlief parallel zur Spaltungskinetik, während die Dimerisierung verzögert erfolgte. Die Umlagerung der Monomere geht also der Bildung von Dimeren und Oligomeren voraus (Schaffar et al., 2004).

3.1.2. Elongationsphase der Aggregation

Zur detaillierten Analyse des molekularen Mechanismus der Elongationsphase wurden konfokale Einzelmolekül-Analyse-Methoden wie Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsanalyse (Schwille et al., 1997), Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (FIDA: *Fluorescence Intensity Distribution Analysis*) (Kask et al., 2000) oder SIFT (*Scanning for Intensely Fluorescent Targets*) (Giese et al., 2005) angewandt. Diese Methoden beruhen auf Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und wurden bereits erfolgreich bei der Untersuchung der Aggregation verschiedener Proteine verwendet, z.B PrP oder α-Synuclein (Bieschke et al., 2000; Giese et al., 2005). Klassische Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie basiert auf der Analyse von Fluktuationen in der Fluoreszenz, die durch Diffusion der markierten Moleküle durch ein Fokusvolumen von ungefähr 1fl hervorgerufen wird. Durch Verwendung eines Zwei-Farben-Setups mit zwei anregenden Lasern kann die Komplexbildung durch SIFT-Analyse oder durch Kreuzkorrelationsanalyse beobachtet werden. Zusätzlich kann

durch Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse die molekulare Helligkeit der Partikel, die mit der Größe korrespondiert, und die Konzentration der jeweiligen Partikel erhalten werden.

Da bei größeren Teilchen die Diffusionszeiten nicht ausreichen, um während der Messzeit durch den Fokus zu diffundieren, verwendet man zur Analyse größerer Teilchen einen *Beamscanner*. Hierbei wird der Laser-Fokus durch die Probe bewegt. Dabei können Teilchen mit langsamen Diffusionszeiten registriert werden. Bei Messungen mit *Beamscanner* können allerdings keine Aussagen über Diffusionszeiten wie in der klassischen Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie gemacht werden, da diese durch den sich bewegenden Fokus verfälscht werden.

Für die konfokalen Einzelmolekülmessungen in dieser Arbeit wurde ein Ansatz verwendet, der auf Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) beruht. Für die FRET-basierte Analyse wurde nur ein den Donor anregender Laser verwendet. Die Akzeptor-Emission wurde registriert und weiter analysiert. Diese Vorgehensweise erlaubt die Detektion von neugebildeten Oligomeren, während Monomere, ungebundener Farbstoff und bereits vor der Reaktion gebildete Oligomere in der Messung unberücksichtigt bleiben.

Für die Einzelmolekülmessungen wurde GST-C4S-myc-Htt53Q verwendet (siehe oben). Als Donor-Akzeptor-Paar wurde AlexaFluor488 und AlexaFluor633 verwendet. Repräsentative Spektren von AlexaFluor488- bzw. AlexaFluor633-markiertem GST-C4S-myc-Htt53Q sind in Abb. 3-9A bzw. 3-9B zu sehen. Es wurde eine Markierungseffizienz von ungefähr 1:2 erzielt (Fluorophor:Protein). Die Markierung mit AlexaFluor behinderte die Aggregation nicht (Abb. 3-9C).

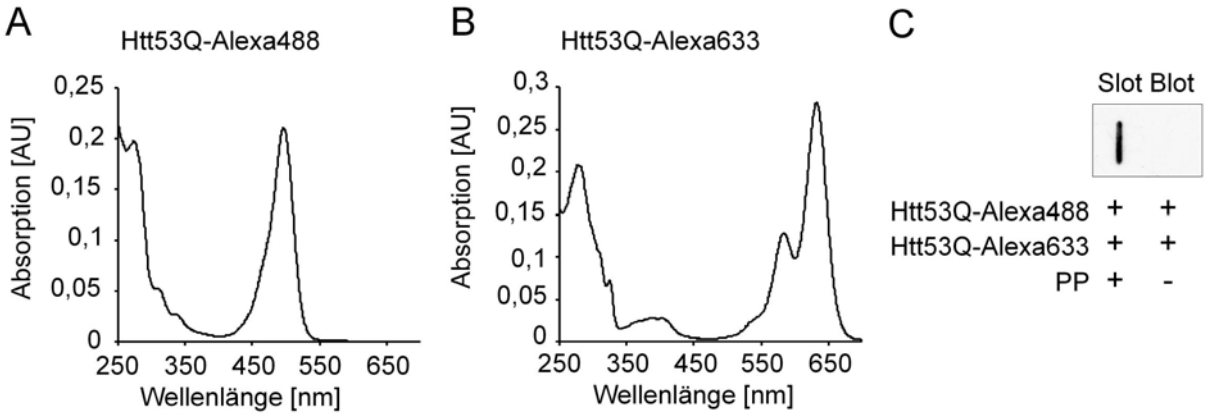

Abb. 3-9: Markierung von GST-C4S-myc-Htt53Q mit Alexa488 bzw. Alexa633. (A) Absorptionsspektrum von GST-C4S-myc-Htt53Q-Alexa488. (B) Absorptionsspektrum von GST-C4S-myc-Htt53Q-Alexa633. (C) Filter-Retardations-Assay einer Aggregationsreaktion mit markiertem GST-C4S-myc-Htt53Q. Die Aggregationsansätze wurden mit 2 µM Protein angesetzt und für 16 h bei 30 °C, 300 Upm inkubiert, durch Kochen in 2% SDS, 50 mM DTT gestoppt und mit Hilfe eines Filter-Retardations-Assays analysiert.

Abbildung 3-10 zeigt die Aggregation von Htt53Q gemessen mit Zwei-Farben-Analyse. AlexaFluor488-markiertes und AlexaFluor633-markiertes Htt53Q wurde 1:1 gemischt, mit PreScission™Protease gespalten und ca. 16 h bei 30 °C inkubiert. In Abbildung 3-10 sind die zweidimensionalen Intensitäts-Verteilungshistogramme von verschiedenen Ansätzen gezeigt.

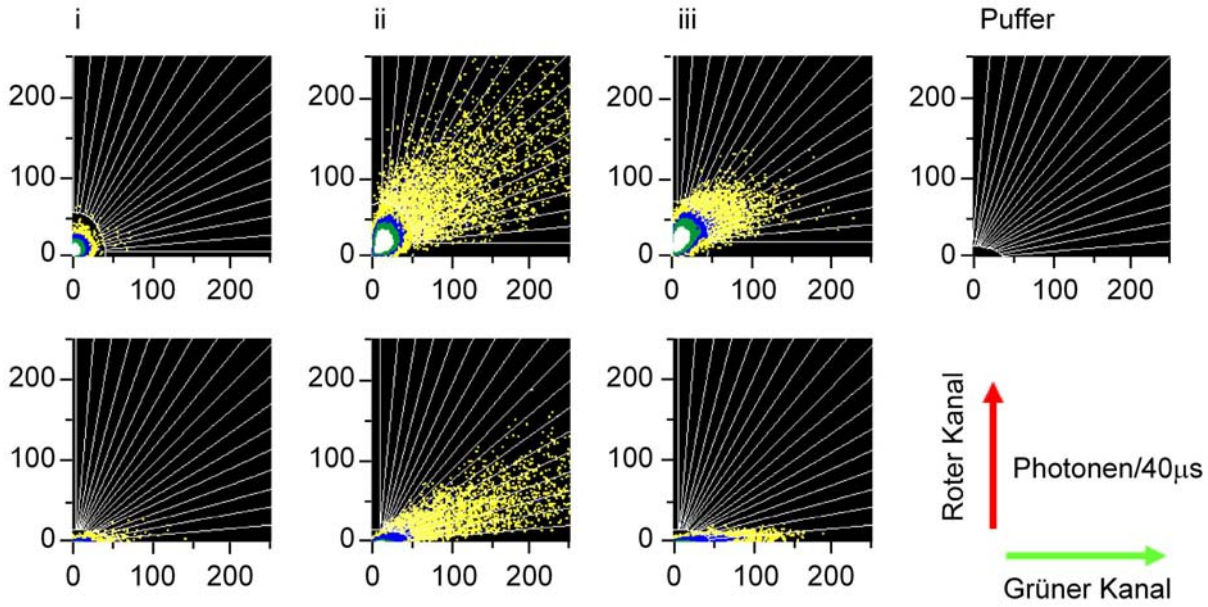

Abb. 3-10: Einzelmolekül-Analyse von Htt53Q-Aggregaten. Für die Aggregationsreaktion wurden unterschiedliche Konzentrationen an markiertem Protein eingesetzt: (i) 25 nM Htt53Q-Alexa488 + 25 nM Htt53Q-Alexa633, (ii) 500 nM Htt53Q-Alexa488 + 500 nM Htt53Q-Alexa633, zur Analyse 1:200 verdünnt, (iii) 25 nM Htt53Q-Alexa488 + 25 nM Htt53Q-Alexa633 + 950 nM unmarkiertes Htt53Q. Nach 16h Aggregation wurden die Proben durch SIFT-Analyse analysiert. Nach rechts aufgetragen sind Photonen/40µs im grünen Kanal, nach oben Photonen/40µs im roten Kanal. In der oberen Reihe wurden sowohl Alexa488 als auch Alexa633 angeregt, in der unteren Reihe wurde nur Alexa488 angeregt.

In der oberen Reihe wurde sowohl AlexaFluor488 als auch AlexaFluor633 angeregt. In (i) wurde 25 nM Htt53Q-AlexaFluor488 zusammen mit 25 nM Htt53Q-AlexaFluor633 aggregiert und direkt in dieser Konzentration gemessen. Unter diesen Bedingungen ließen sich praktisch keine Aggregate detektieren, d.h. die Huntingtin-Konzentration lag unter dem Schwellenwert für die Aggregation. In (ii) wurde 500 nM Htt53Q-AlexaFluor488 mit 500 nM Htt53Q-AlexaFluor633 aggregiert, was ungefähr den für Filter-Retardations-Assays eingesetzten Mengen entspricht. Für die Messung wurde die Probe 1:200 verdünnt, so dass die gleiche Menge Farbstoff wie in (i) gemessen wurde. In diesem Ansatz waren deutlich zweifarbige Komplexe zu sehen. In (iii) wurde 25 nM Htt53Q-AlexaFluor488, 25 nM Htt53Q-AlexaFluor633 und 950 nM unmarkiertes Htt53Q verwendet und die entstandenen Aggregate unverdünnt gemessen. In diesem Fall war ebenfalls deutliche Komplexbildung zu beobachten, allerdings waren die Partikel weniger hell, da der Großteil der zur Verfügung stehenden Moleküle unmarkiert war. In der zweiten Reihe wurde bei

denselben Ansätzen nur der Donor angeregt. In (i) konnten wieder keine Aggregate detektiert werden. In (ii) wurden Komplexe beobachtet, die sowohl im roten als auch im grünen Kanal leuchten. Das im roten Kanal detektierte Signal ist demnach durch FRET entstanden. In (iii) waren keine FRET-positiven Partikel detektierbar, obwohl Komplexe vorhanden waren, da die markierten Moleküle innerhalb des Komplexes zu verdünnt waren und daher die Abstände zu groß für FRET. Für weitere Analysen wurde also ein Ansatz ähnlich wie in (ii) verwendet.

Zur Analyse des Signals bestehen mehrere Möglichkeiten (siehe oben). In Abbildung 3-11A wurde die Aggregationsreaktion mit Hilfe der Kreuzkorrelationsanalyse ausgewertet. Die Kreuzkorrelationsamplitude stieg während der Aggregation deutlich an, während in einer Kontrollreaktion ohne PreScission™Protease keine Änderung zu beobachten war.

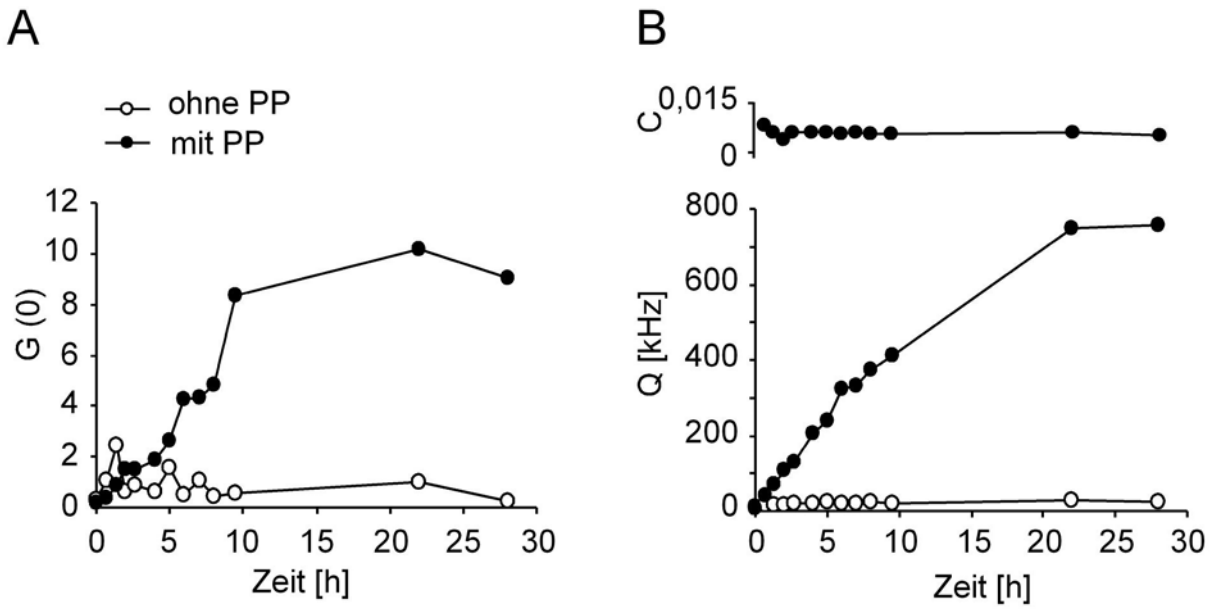

Abb. 3-11: Einzelmolekül-Analyse von Htt53Q. (A) Kreuzkorrelationsanalyse. Aggregationsreaktionen wurden mit 1 µM Htt53Q-Alexa488 + 1 µM Htt53Q-Alexa633 mit 2 U PreScission™Protease angesetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Aliquot entnommen, 1:100 verdünnt und durch Kreuzkorrelationsanalyse analysiert. Anregungswellenlängen waren 488 nm und 633 nm. Gezeigt ist die Kreuzkorrelationsamplitude G (0) einer repräsentativen Messung. (B) FIDA-Analyse aus denselben Aggregationsansätzen wie in (A). Die Proben wurden nur bei 488 nm angeregt. Die mittlere Partikel-Konzentration pro konfokales Volumen (C) und die molekulare Helligkeit (Q) der FRET-positiven Aggregate wurden durch einen Ein-Komponenten 1D-FIDA-Fit bestimmt.

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse des FRET-Signals ist die Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (FIDA). Mit ihrer Hilfe kann die molekulare Helligkeit der Teilchen bestimmt werden, gleichzeitig wird die Konzentration der entsprechenden Teilchen ermittelt. In Abbildung 3-11B ist eine solche FIDA-Analyse gezeigt. Während der Aggregation war ein deutlicher Anstieg der molekularen Helligkeit der Teilchen zu verzeichnen, die der Größe der

Teilchen entspricht, während in einer Kontrollreaktion ohne PreScission™Protease die Teilchenhelligkeit konstant blieb. Die Oligomere waren nach Abschluss der Aggregation rund 40-80mal so groß wie zu Beginn der Aggregation, d.h. die beobachteten Oligomere bestehen aus ca. 40 bis 80 Monomeren. Große fibrilläre Aggregate konnten wegen ihrer langsamen Diffusionszeiten jedoch nicht detektiert werden. Die Analyse der Teilchenkonzentration zeigte, dass nach der anfänglichen Spaltung die Konzentration über lange Zeit konstant blieb. Dies könnte erklärt werden durch einen Aggregationsmechanismus, in dem sich zu Beginn mehrere Nuklei bilden, die durch Anlagerung von Monomeren, die in dieser Analyse unsichtbar bleiben, wachsen.

Im Allgemeinen lassen sich amyloide Aggregate durch Sonifizieren fragmentieren. Auch für Htt53Q-Aggregate wurde dies mit Hilfe der FIDA-Analyse gezeigt (Abb. 3-12). Die Partikelgröße verringerte sich abhängig von der Beschallungsdauer, gleichzeitig stieg die Teilchenkonzentration an. Dies bestätigt auch, dass die molekulare Helligkeit tatsächlich der Partikelgröße entspricht.

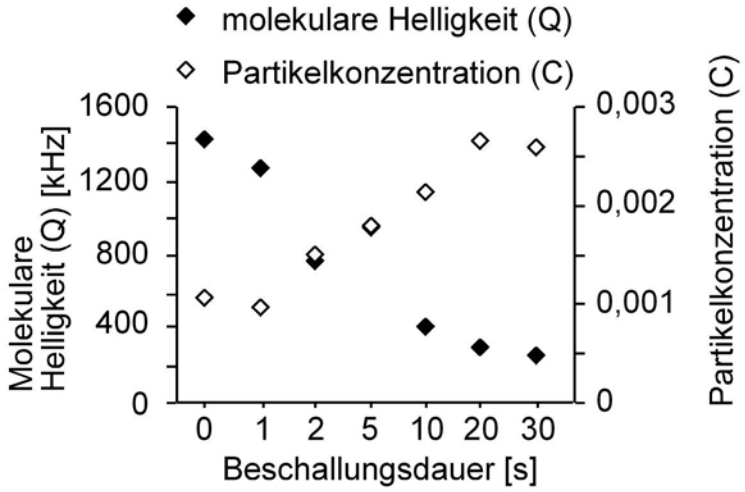

Abb. 3-12: Fragmentierung von Aggregaten durch Sonifizieren. FIDA-Analyse von sonifizierten Aggregaten aus Htt53Q-Alexa488 und Htt53Q-Alexa633. Beschallungsdauer war 0-30 s. Anschließend wurden die Proben wie vorher verdünnt und durch FIDA analysiert. Die Proben wurden bei 488 nm angeregt. Die mittlere Partikelkonzentration pro konfokales Volumen (C) und die molekulare Helligkeit (Q) der FRET-positiven Aggregate wurden durch einen Ein-Komponenten 1D-FIDA-Fit bestimmt.

Die hier verwendeten Sonifizierungsbedingungen sind geeignet, Nukleationskeime für die PrP-Aggregation zu generieren (Sarafoff et al., 2005). Inwieweit die hier erhaltenen Htt53Q-Aggregat-Fragmente als Aggregationskeime dienen können, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, wäre aber ein interessanter weiterer Aspekt.

3.2. Struktur der Aggregate und Intermediate

Für die Struktur der amyloiden Fibrillen gibt es mehrere Modelle (siehe Kapitel 1.3.). Ein wichtiges Modell wurde von Max Perutz, basierend auf Röntgenstrukturanalyse, vorgeschlagen. Das Modell sieht eine wassergefüllte β-Helix aus einem β-Faltblatt vor, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Haupt- und Seitenkettenamiden stabilisiert wird. Jeweils 20 Glutamine würden dabei eine Umdrehung bilden, wobei die zweite Umdrehung die erste Umdrehung stabilisieren würde (Perutz et al., 2002). Ein anderes Modell postuliert eine trianguläre Helix mit 18 Glutaminen pro Umdrehung (Stork et al., 2005). In einem weiteren Modell wurde ein antiparalleles β-Faltblatt aus β-Strängen mit je sieben Glutaminen vorgeschlagen (Thakur and Wetzel, 2002).

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe von Fluoreszenzmethoden eine Verifizierung eines dieser Modelle versucht werden. Ferner sollte untersucht werden, inwieweit sich im Verlauf der Aggregation Unterschiede in der Struktur ergeben.

3.2.1. Distanzmessung durch FRET in reifen Aggregaten

FRET kann als spektroskopisches Lineal dienen (Stryer, 1978) und wurde zur Abstandsmessung bereits erfolgreich eingesetzt (Woolhead et al., 2004). Aus der FRET-Effizienz kann für ein gegebenes Donor-Akzeptor-Paar die Distanz zwischen den beiden Fluorophoren errechnet werden (siehe Material und Methoden).

Für die folgenden Messungen wurde ein Konstrukt (GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His) hergestellt, in dem sich jeweils ein Cystein direkt vor der Polyglutaminregion und ein Cystein direkt nach der Polyglutaminregion befindet. Da in diesen Experimenten das Hauptinteresse auf der Struktur der Polyglutaminregion lag und nicht auf Einflüssen des restlichen Proteins, wurde ein Protein mit deletierter prolinreicher Region ausgewählt. Es existiert nur noch ein Prolin, direkt darauf folgt das Cystein. Zur Verhinderung des C-terminalen Abbaus wurde ein Hexahistidin-*tag* eingeführt. Außerdem beinhaltet das Konstrukt einen HA-*tag* zur Detektion. Als Fusionspartner wurde GST-C4S gewählt (siehe Abb. 3-13A). GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His konnte durch Affinitätsreinigung mit Glutathion-Sepharose gewonnen werden (Abb. 3-13B). Eine Aggregationsreaktion nach Zugabe von PreScission^{TM}Protease, detektiert mit dem Filter-Retardations-Assay, ist in Abbildung 3-13C gezeigt.

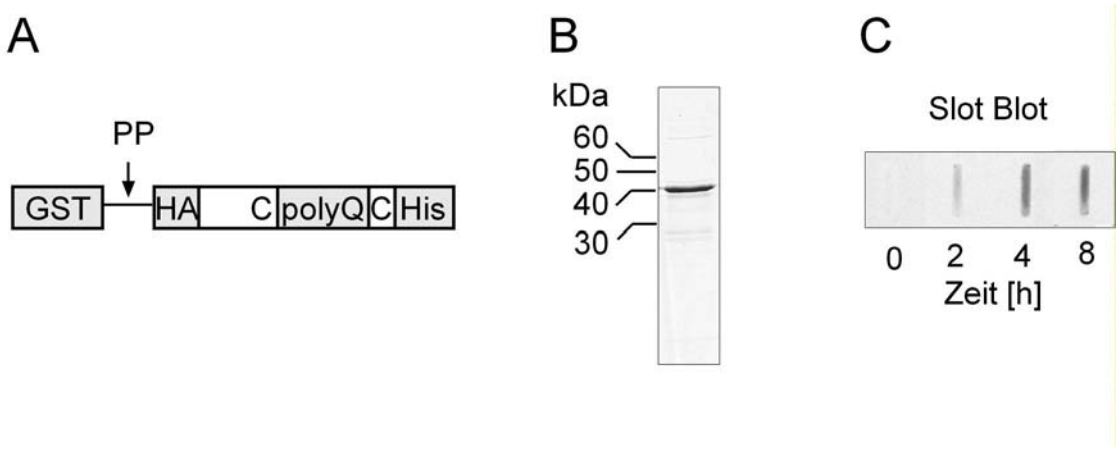

Abb. 3-13: Eigenschaften von GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His. (A) Schematische Darstellung des Fusionsproteins. (B) Coomassie-gefärbtes 12%-Polyacrylamidgel mit dem gereinigten Protein. (C) Filter-Retardations-Assay einer Aggregationsreaktion von GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His. Aggregations-reaktionen wurden mit 3 µM Protein + 2,5 U PreScission™Protease angesetzt, nach 8 h gestoppt und durch einen Filter-Retardations-Assay analysiert. Die Aggregate wurden immunologisch mit einem anti-HA-Antikörper detektiert.

Als Donor-Akzeptor-Paar wurde IAEDANS-Fluorescein verwendet. Zur Messung der Abstände innerhalb des Proteins mit Hilfe des intramolekularen FRET war eine Doppelmarkierung nötig. Da hier absolute Abstände gemessen werden sollten, war es wichtig, dass je ein Molekül GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His mit jeweils einem Molekül Donor und einem Molekül Akzeptor markiert wurde. Dies wurde durch eine differentielle Markierungsreaktion erreicht (siehe Material und Methoden). Es konnte eine Markierungseffizienz Protein:Donor:Akzeptor von 1:1:1 erreicht werden (Abb. 3-14C). Bei der Distanzmessung spielt es keine Rolle, welches Cystein mit Donor und welches mit Akzeptor markiert wird, da in beiden Fällen derselbe Abstand gemessen wird. Als Kontrolle wurde das Protein entweder nur mit Donor oder nur mit Akzeptor markiert (Abb. 3-14A, 3-14B). Bei der Markierung mit Akzeptor wurde das erste reaktive Cystein unter den gleichen Bedingungen wie bei der Donor-Markierung mit Biotin blockiert, anschließend wurde die Akzeptor-Markierungsreaktion wie üblich durchgeführt. Im Ansatz mit der Biotin-Blockierung war die gleiche Fluorescein-Markierungseffizienz zu beobachten wie in der Doppelmarkierungsreaktion (Abb. 3-14B, 3-14C), d.h. Biotin reagierte genauso effizient wie IAEDANS. Die Fluoreszenzmarkierung störte die Aggregation, detektiert mittels Filter-Retardations-Assay, nicht (Abb. 3-14D).

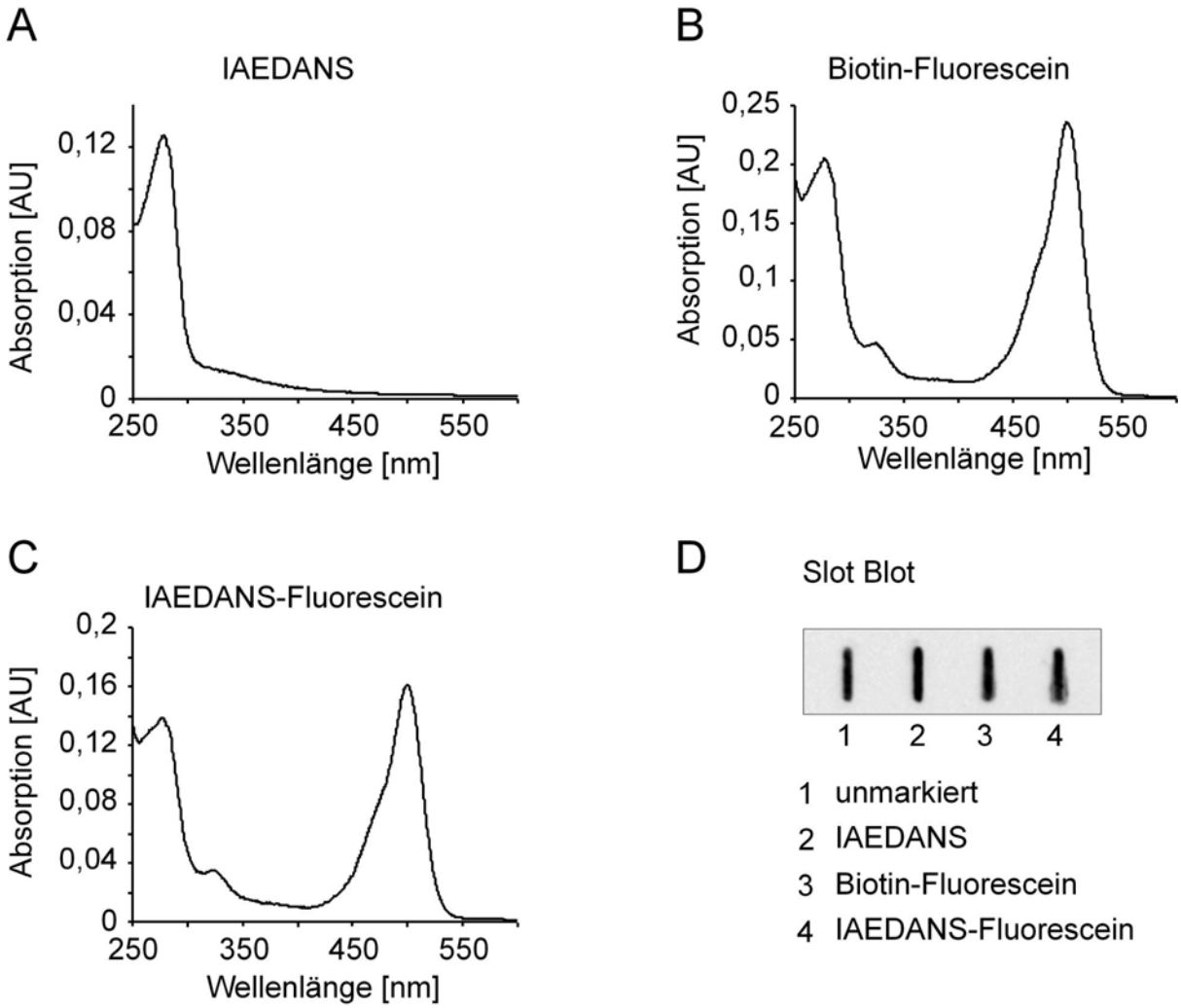

Abb. 3-14: Markierung von GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His mit IAEDANS und/oder Fluorescein. (A) Absorptionsspektrum von GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His-IAEDANS. (B) Absorptionsspektrum von GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His-Biotin-Fluorescein. (C) Absorptionsspektrum von GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His-IAEDANS-Fluorescein. (D) Filter-Retardations-Assay von Aggregationsreaktionen mit 3 µM markiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His + 2,5 U PreScission™Protease. Immunologische Detektion erfolgte mit Hilfe eines anti-HA-Antikörpers.

Aufgrund der Umgebungssensitivität können sich je nach Protein Unterschiede in Quantenausbeute und Überlapp-Integral ergeben. Deshalb müssen beide für jedes Protein neu bestimmt und der entsprechende Förster-Radius berechnet werden. Im Falle von GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His betrug die Quantenausbeute von IAEDANS 0,02. Das Überlapp-Integral für IAEDANS-Fluorescein war 2,019 x 10^{-13} $M^{-1}cm^3$. Daraus ergibt sich ein Förster-Radius von 30,2 Å. Dies entspricht in etwa den Abständen, die für die oben genannten Modelle erwartet werden.

Zur Abstandsmessung wurde eine Aggregationsreaktion mit markiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His wie vorher beschrieben angesetzt und mindestens 16 h bei 30 °C inkubiert. Unlösliche Aggregate wurden pelletiert, in Puffer resuspendiert und anschließend

die Fluoreszenz gemessen. Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Molekülen, wie sie bei der Aggregatbildung auftreten, können die intramolekulare Distanzmessung durch FRET stören, da intermolekularer FRET auftreten kann. In einer Kontrollreaktion mit je einer Population Donor-markierten Proteins und einer Population Akzeptor-markierten Proteins wurde in den pelletierten Aggregaten intermolekularer FRET mit einer Effizienz von 80% beobachtet (Abb. 3-15A). Um diesen intermolekularen Effekt zu minimieren, wurden die Ansätze mit unmarkiertem Protein verdünnt. Bei einer 1:10-Verdünnung ist in den Aggregaten kein intermolekularer FRET mehr detektierbar (Abb. 3-15B). Eine 1:10-Verdünnung stellt die optimale Bedingung für diese Art Messung dar. Aufgrund der hohen Lichtstreuung, die bei einer derart optisch dichten Lösung zwangsläufig auftritt, verschlechtert eine weitere Verdünnung das Verhältnis von Signal zu Hintergrund derart, dass keine sinnvollen Werte mehr gewonnen werden können.

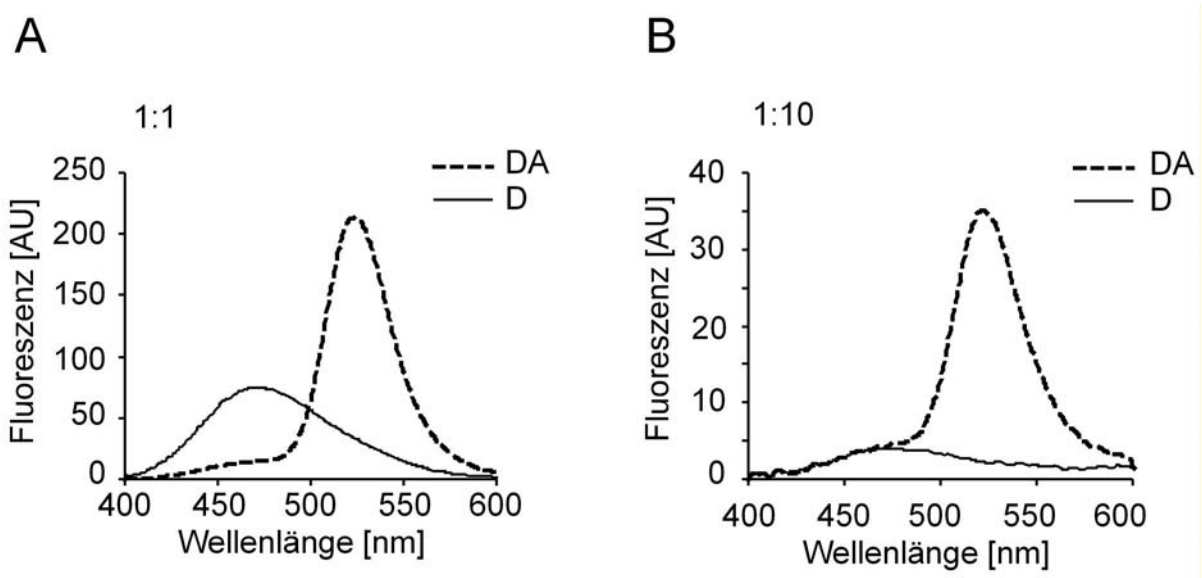

Abb. 3-15: Intermolekularer FRET in Aggregaten. (A) Emissionsspektrum von resuspendierten Aggregaten. 2 µM Donor (IAEDANS)- + 2 µM Akzeptor (Fluorescein)-markiertes GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His bzw. 2 µM Donor-markiertes GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His wurden zusammen inkubiert und mit 3 U bzw. 1,5 U PreScission Protease versetzt. Die Ansätze wurden 16 h bei 30 °C, 300 Upm inkubiert. Die Aggregate wurden bei 20 000 x g, 15 min pelletiert und in Puffer (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM KCl) resuspendiert. Ein Emissionsspektrum von Aggregaten aus Donor-markiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His + Akzeptor-markiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His und ein Emissionsspektrum aus Donor-markiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His wurde aufgenommen. Anregungswellenlänge war hierbei 360 nm. (B) Emissionsspektrum von resuspendierten Aggregaten, die aus 3,6 µM unmarkiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His und 0,2 µM Donor-markiertem + 0,2 µM Akzeptor-markiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His bzw. 3,8 µM unmarkiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His + 0,2 µM Donor-markiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His gewonnen wurden. Aggregationsreaktion wie in (A). Anregunswellenlänge war 360 nm.

Für die Bestimmung der intramolekularen FRET-Effizienz wurde doppelmarkiertes GST-C4S-Htt53QΔP1P-CQC-His verwendet.

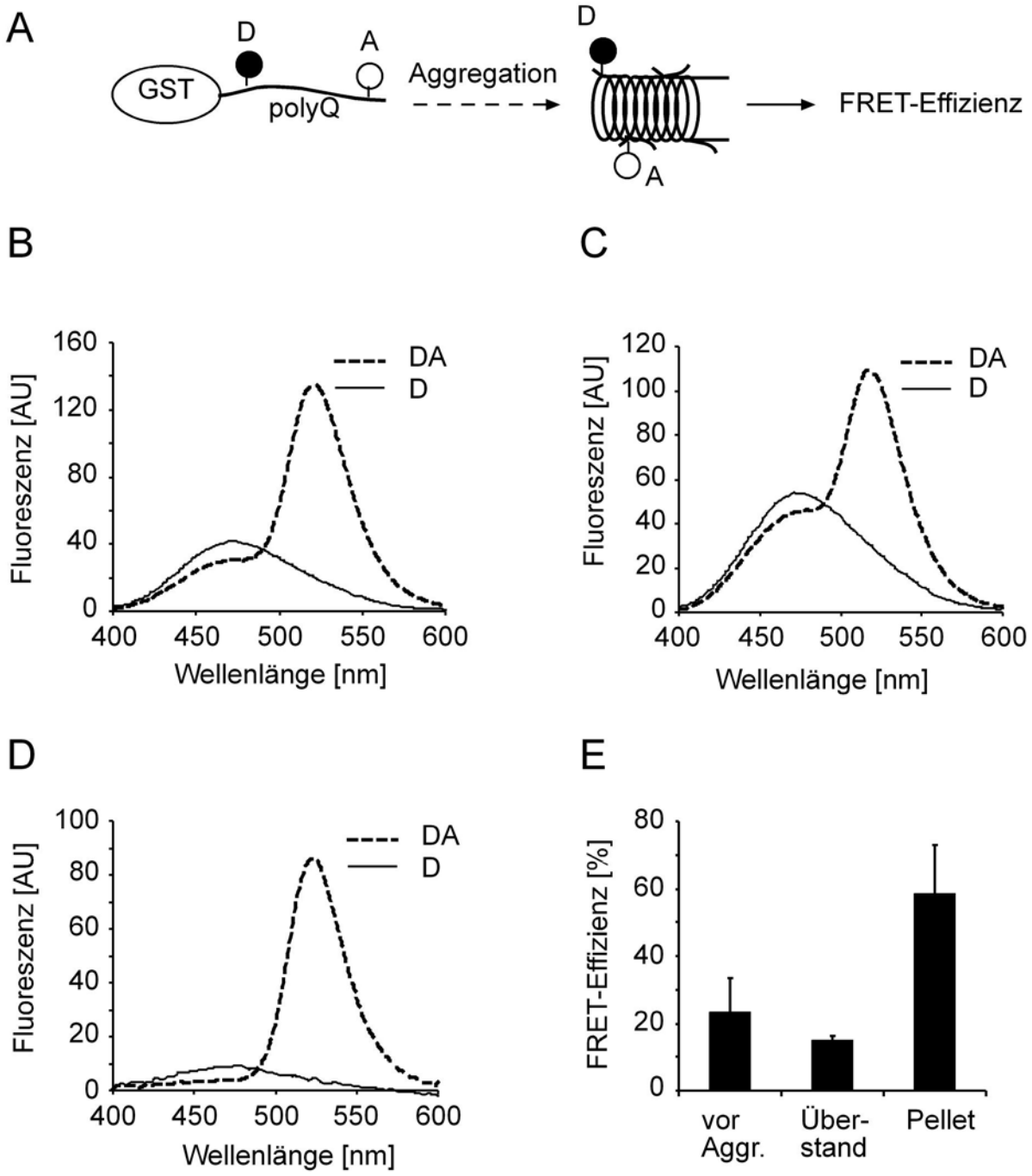

Abb. 3-16: Distanzmessung durch intramolekularen FRET. (A) Schematische Darstellung der Distanzmessung mit Hilfe von FRET. (B) Emissionsspektrum von doppelmarkiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His vor der Aggregation. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt: 3,6 µM unmarkiertes Protein + 0,4 µM doppelmarkiertes (IAEDANS-Fluorescein) Protein wurden zusammengegeben und das Emissionsspektrum gemessen. Anregungswellenlänge war dabei 360 nm. (C) Emissionsspektrum des Überstandes einer Aggregationsreaktion. 3,6 µM unmarkiertes Protein + 0,4 µM doppelmarkiertes Protein wurden zusammen mit 3 U PreScission™Protease 16 h bei 30 °C, 300 Upm inkubiert. Das Emissionsspektrum des Überstandes nach 20 000 x g-Zentrifugation für 15 min. wurde bei 360 nm Anregungswellenlänge gemessen. (D) Emissionsspektrum des Pellets nach 20 000 x g Zentrifugation für 15 min. Die Aggregationsreaktion wurde wie in (C) durchgeführt. Das Emissionsspektrum wurde bei 360 nm Anregungswellenlänge gemessen. (E) Quantifizierung der FRET-Effizienzen aus (B), (C) und (D). Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 5 unabhängigen Experimenten.

Wie vorher wurde der Ansatz 1:10 mit unmarkiertem Protein verdünnt. Wieder wurde eine Aggregationsreaktion über mindestens 16 h angesetzt, die Aggregate wurden pelletiert und in Puffer aufgenommen. Gemessen wurde der Ansatz vor der Aggregation, die pelletierten Aggregate und der Überstand nach 20 000 x g- Zentrifugation (Abb. 3-16B, 3-16C, 3-16D). Die Mittelwerte mehrerer Reaktionen sind in Abbildung 3-16E gezeigt. Vor der Aggregation betrug die FRET-Effizienz 23% ± 10,1%, im Überstand 15% ± 1,4%, im Pellet 58,3% ± 14,6%. Dies entspricht einer Distanz zwischen den beiden Fluorophoren von 34,0 – 41,5 Å (Mittelwert 36,9 Å) im ungeschnittenen Protein, von 25,6 – 31,5 Å (Mittelwert 28,6 Å) im Aggregat und von 39,6 – 41,1 Å (Mittelwert 40,3 Å) in löslichen, nicht pelletierbaren Spezies. Dabei geben die Werte durchschnittliche Distanzen an, in der Lösung können verschiedene Spezies mit unterschiedlichen Konformationen vorhanden sein.

3.2.2. Distanzmessung durch FRET in frühen Aggregaten

Um Hinweise auf die Struktur früher Spezies zu gewinnen, wurde die Reaktion nach zwei Stunden beendet, wiederum die löslichen Spezies von den unlöslichen Spezies getrennt und die Fluoreszenz gemessen (Abb. 3-17A).

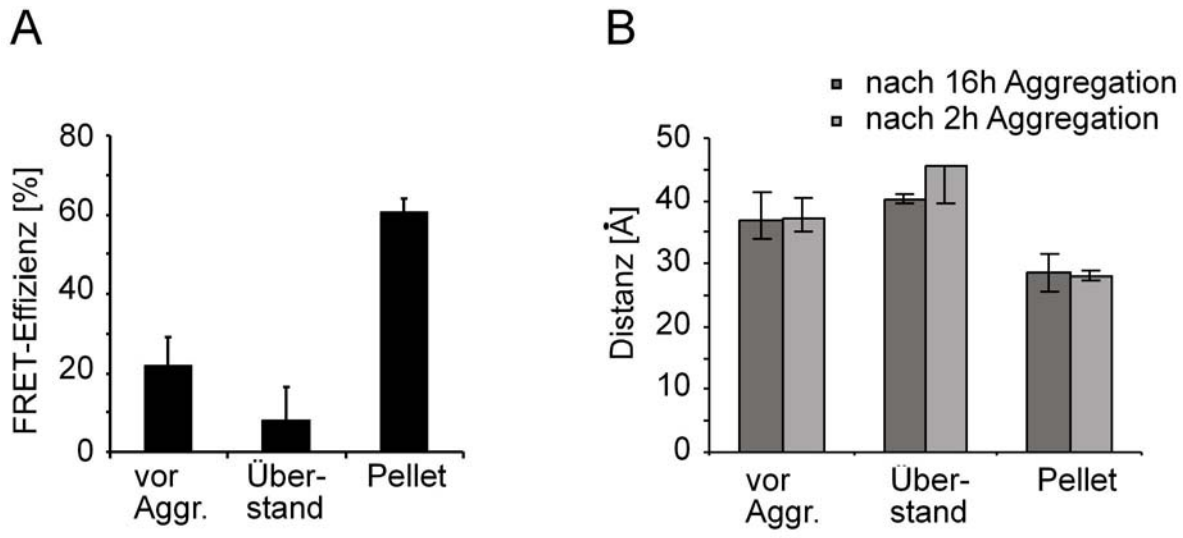

Abb. 3-17: FRET-Effizienz und Distanzen für frühe Aggregate. (A) Quantifizierung der FRET-Effizienz. Aggregationsreaktionen wurden wie vorher angesetzt, nach 2 h wurde das unlösliche Material durch 20 000 x g-Zentrifugation für 15 min pelletiert und in Puffer resuspendiert. Emissionsspektren für Protein vor der Aggregation, für Überstand und Pellet wurden jeweils von doppelmarkiertem (IAEDANS-Fluorescein) Protein und Donor (IAEDANS)-markiertem Protein in mehreren unabhängigen Experimenten aufgenommen und daraus die FRET-Effizienz berechnet. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. (B) Berechnung der Distanzen für lösliche und unlösliche Spezies nach 2 h bzw. 16 h Aggregation (siehe Material und Methoden).

Hier lag die FRET-Effizienz im ungeschnittenen Protein bei 22% ± 7,1%, was einer Distanz von 35,0 – 40,4 Å (Mittelwert 37,3 Å) entspricht, in der löslichen Fraktion bei 8% ± 8,5%, was einer Distanz von 45,4 Å (Mittelwert, aufgrund der kleinen FRET-Effizienz ist der Maximalwert nicht bestimmbar) entspricht und in der unlöslichen Fraktion bei 60,5% ± 3,5%, was einer Distanz von 27,4 - 28,8 Å (Mittelwert 28,1 Å) entspricht (Abb. 3-17A, 3-17B). Im Vergleich zu den Werten, die bei vollständiger Aggregation gewonnen wurden, sind weder bei den löslichen noch bei den unlöslichen Spezies gravierende Unterschiede zu beobachten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Unlöslichkeit mit einer bestimmten Konformation einhergeht, die nicht erst im weiteren Verlauf der Aggregation entsteht.

3.2.3. Distanzmessungen bei verschiedenen Polyglutaminlängen

Um weitere Informationen über die Struktur von Polyglutaminaggregaten zu erhalten, wurden verschiedene Polyglutaminlängen eingesetzt. Je nach Modell wird ein bestimmtes Muster an Distanzen erwartet, aus dem eventuell eines der Modelle verifiziert werden könnte.

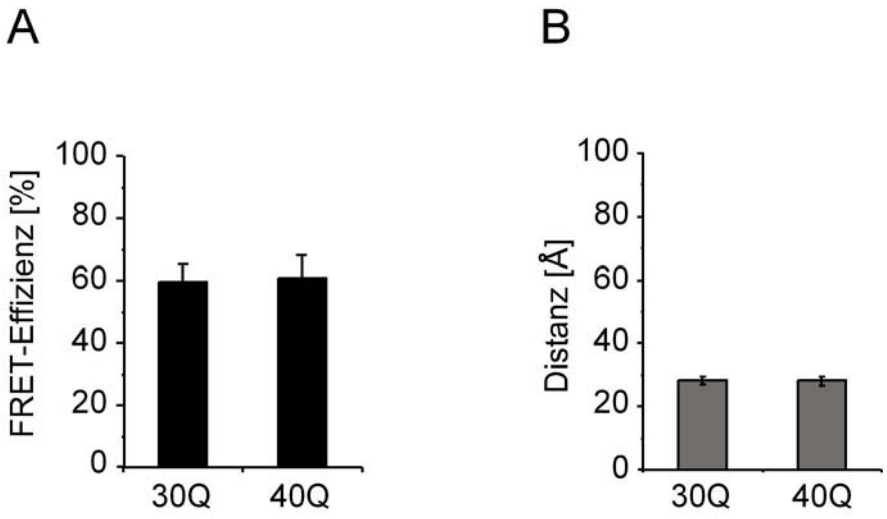

Abb. 3-18: FRET-Effizienzen und Distanzen für polyQ-Aggregate mit verschiedener polyQ-Länge. (A) Quantifizierung der FRET-Effizienz. Aggregationsreaktionen wurden mit markiertem GST-C4S-HA-Htt40QΔP0P-CQC-His wie vorher angesetzt. Markiertes GST-C4S-HA-Htt30QΔP1P-CQC-His wurde mit unmarkiertem GST-C4S-HA-Htt53QΔP1P-CQC-His koaggregiert. Nach 16 h wurde das unlösliche Material durch 20 000 x g-Zentrifugation für 15 min pelletiert und in Puffer resuspendiert. Emissionsspektren der resuspendierten Pellets wurden jeweils von doppelmarkiertem und Donor-markiertem Protein aufgenommen und daraus die FRET-Effizienz berechnet. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. (B) Berechnung der Distanzen für 30Q bzw. 40Q enthaltende Aggregate.

Für 30Q-enthaltende Aggregate wurde eine FRET-Effizienz von 59,5% ± 5,6% gemessen, was einer Distanz von 27,1 - 29,4 Å (Mittelwert 28,3 Å) entspricht, für

40Q-enthaltende Aggregate wurde eine FRET-Effizienz von 60,9% ± 7,1% ermittelt, was einer Distanz von 26,6 - 29,5 Å (Mittelwert 28,1 Å) entspricht (Abb. 3-18A, 3-18B). Damit liegen die Distanzen im selben Bereich wie die der 53Q-enthaltenden Aggregate. Sowohl für helikale Anordnungen als auch für antiparallele β-Faltblatt-Anordnungen erwartet man jedoch unterschiedliche Distanzen je nach Polyglutaminlänge. Möglicherweise kann durch intramolekulare FRET-Messungen innerhalb von Aggregaten nicht die nötige Genauigkeit erreicht werden, um kleinere Unterschiede, die für eine Verifizierung eines Modelles nötig wären, zu detektieren. Fest steht jedoch, dass sich die Konformation der unlöslichen Spezies deutlich von der Konformation der löslichen Spezies unterscheidet und dass diese bereits in frühen pelletierbaren Aggregaten auftritt.

3.3. Einfluss von TRiC auf die Aggregation von Huntingtin

Sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Zellen existiert ein Netzwerk von Chaperonen, die die Faltung von Proteinen unterstützen und Fehlfaltung der Proteine und damit deren Aggregation verhindern (siehe Kapitel 1.1.). Einige dieser Chaperone sind in der Lage, die polyglutaminabhängige Aggregation zu modulieren. Eingehend untersucht wurde in dieser Hinsicht das Hsp70/40-System. Das bakterielle Hsp70-Chaperon DnaK und das Hsp40-Cochaperon DnaJ, das eine eigene ATP-unabhängige Chaperonaktivität besitzt, können jeweils die SDS-resistente Aggregation unterdrücken. Das eukaryontische Hsp70/40-System Hsc70/Hdj-1, wobei Hdj-1 keine eigene Chaperonaktivität besitzt, können die Htt53Q-Aggregation in ATP-abhängiger Weise modulieren. Dabei wird nicht die Aggregation *per se* verhindert, vielmehr wird die Bildung nicht-amyloider amorpher Aggregate favorisiert (Muchowski et al., 2000; Schaffar, 2004).

Ein RNA-*interference screen* in *C. elegans* stellte außerdem einen Zusammenhang zwischen der Htt-Aggregation und dem eukaryontischen Chaperonin TRiC her (Nollen et al., 2004). TRiC ist ein ~900 kDa Komplex bestehend aus zwei oktameren Ringen. Proteinfaltung findet in einem abgeschlossenen Hohlraum statt, der eine hydrophobe Umgebung für die Faltung des Proteins bildet. Hauptsubstrate sind Aktin, Tubulin und eine Reihe von WD40-Proteinen. Es wird eine präferentielle Faltung von Proteinen mit β-Faltblattstrukturen diskutiert, was auch eine Rolle bei der Faltung von amyloiden β-Strukturen enthaltenden Fibrillen spielen könnte (siehe Kapitel 1.1.3.). Eine Herunterregulierung verschiedener TRiC-Untereinheiten durch RNA-*interference* bewirkte verstärkte Aggregat-Bildung in *C.elegans*,

was auf eine mögliche Rolle von TRiC in der Prävention der Aggregation hindeutet (Nollen et al., 2004). Die zugrunde liegenden Mechanismen des TRiC-vermittelten Effekts auf die Aggregatbildung wurden in dieser Arbeit eingehend untersucht.

3.3.1. Direkte Rolle von TRiC in der Modulation der Htt-Aggregation

Für die folgenden *in vitro*-Experimente wurde GST-myc-Htt53Q bzw. für die fluoreszenzbasierten Experimente GST-C4S-myc-Htt53Q (siehe Abschnitt 3.1) verwendet. Humanes Hdj-1 wurde in *E. coli* exprimiert (N.Tzvetkov), Hsc70 wurde aus Rinderhirn bzw. Schweinehirn gereinigt (N. Tzvetkov). TRiC wurde aus Rinderhoden gereinigt (siehe Material und Methoden). Abb. 3-19A zeigt ein 12%-SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigtem TRiC. Gelfiltrationsanalyse (Abb.3-19B) bestätigte zudem, dass TRiC als vollständiger Komplex vorlag. Die Aktivität von TRiC wurde durch einen Aktin-Faltungsassay kontrolliert (M.Stemp).

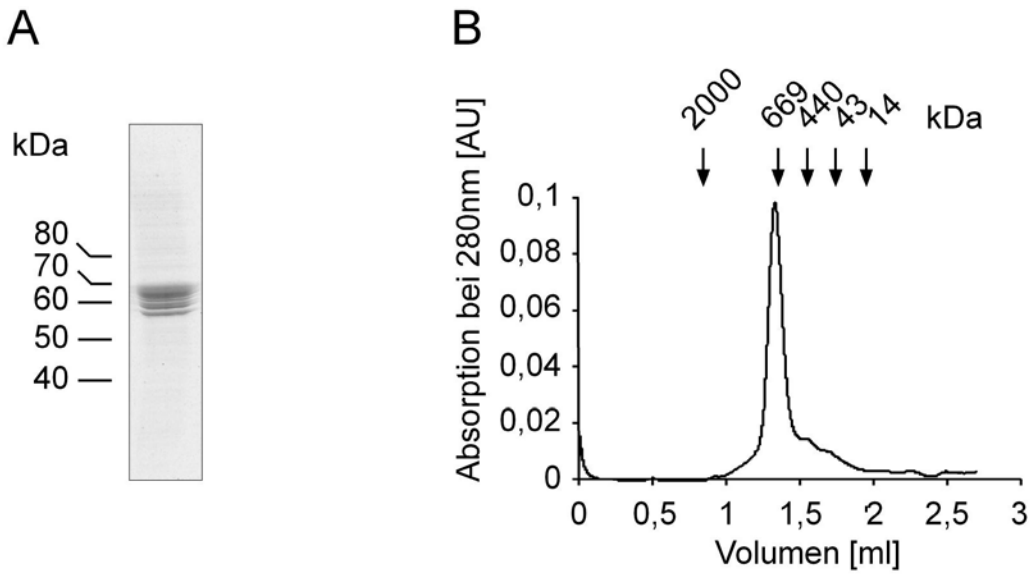

Abb. 3-19: Eigenschaften von gereinigtem TRiC. (A) Coomassie-gefärbtes 12%-SDS-Polyacrylamidgel, aufgetragen ist gereinigtes TRiC. (B) Gelfiltrationschromatographie von gereinigtem TRiC. Gereinigtes TRiC wurde auf eine Superose6-Säule aufgetragen. Das Elutionsprofil zeigt einen scharfen Peak, TRiC liegt also als Komplex vor.

3.3.1.1. Effekt von TRiC auf die Bildung SDS-unlöslicher Aggregate

Zunächst wurde der Effekt von TRiC auf die Htt53Q-Aggregation mit Hilfe des Filter-Retardations-Assays analysiert. Die Aggregationsreaktionen wurden wie üblich durchgeführt, wenn nicht anders beschrieben fanden die Reaktionen in Anwesenheit von ATP und eines

ATP-regenerierenden Systems statt. Es wurde eine konzentrationsabhängige Inhibition der SDS-resistenten Aggregation beobachtet. In äquimolaren Mengen eingesetzt zeigte TRiC eine drastische Verringerung der SDS-unlöslichen großen Aggregate auf der Filtermembran, auch in substöchiometrischen Mengen war eine deutliche Reduktion zu sehen (Abb. 3-20A). Im Gegensatz dazu konnte beim Hsp70/40-System in substöchiometrischen Mengen kein inhibierender Effekt mehr beobachtet werden (Abb. 3-20B).

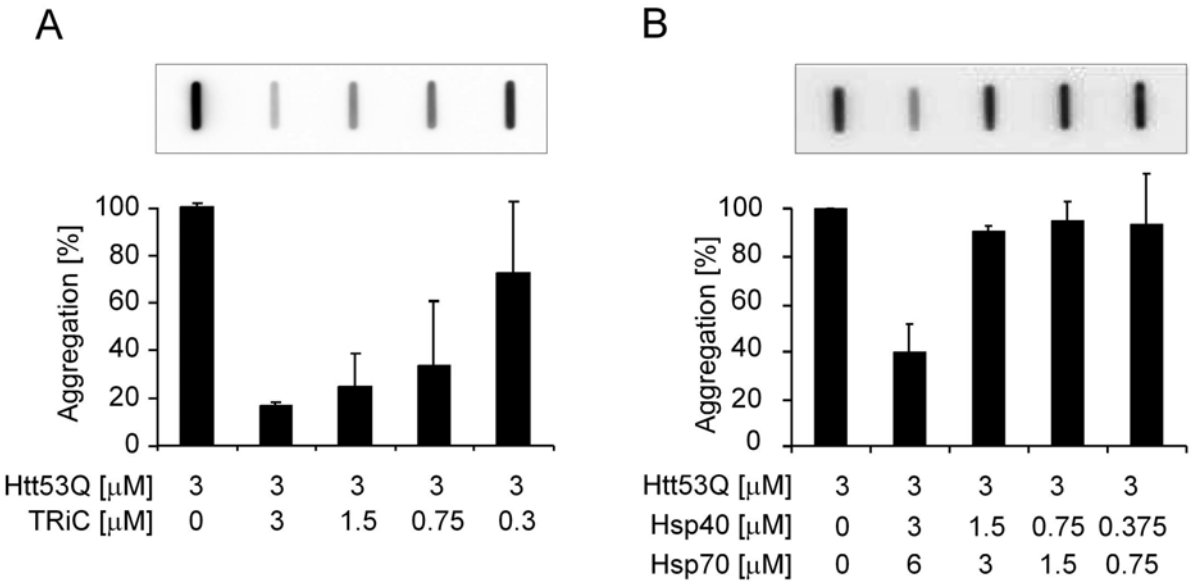

Abb. 3-20: Effekt von Chaperonen auf die Bildung SDS-unlöslicher Htt53Q-Aggregate. (A) Effekt von TRiC auf die Bildung SDS-unlöslicher Htt53Q-Aggregate, analysiert durch Filter-Retardations-Assay. Aggregationsreaktionen wurden mit 3 µM GST-myc-Htt53Q + 0-3 µM TRiC. In allen Ansätzen war 2 mM ATP und ein ATP-regenerierendes System vorhanden. Aggregation wurde durch Spaltung mit je 2,5 U PreScission™Protease gestartet und bei 30 °C, 300 Upm für 8 h inkubiert. Durch Kochen in 2% SDS, 50 mM DTT wurde die Aggregation gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze durch Filter-Retardations-Assay analysiert. Aggregate wurden durch einen anti-c-myc-Antikörper detektiert. Quantifizierung wurde durch Densitometrie durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten (B) Effekt von Hsp70 und Hsp40 auf die Bildung SDS-unlöslicher Huntingtin-Aggregate. Aggregationsreaktionen wurden mit 3 µM GST-myc-Htt53Q + 0-3 µM Hsp40 + 0-6 µM Hsp70 angesetzt, wobei das Hsp40:Hsp70-Verhältnis 1:2 betrug. Die Aggregationsreaktion und Analyse wurde durchgeführt wie in (A). Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

Für Hsp70 und Hsp40, die in der Modulation der Aggregation von Htt53Q kooperieren, wurde ein ATP-abhängiger Mechanismus gezeigt (Muchowski et al., 2000). Im Gegensatz dazu war der inhibierende Effekt auf die Htt53Q-Aggregation von TRiC in Abwesenheit von ATP genauso ausgeprägt wie in Anwesenheit von ATP (Abb. 3-21). ADP und das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PNP verstärkten den Effekt sogar leicht (Abb. 3-21).

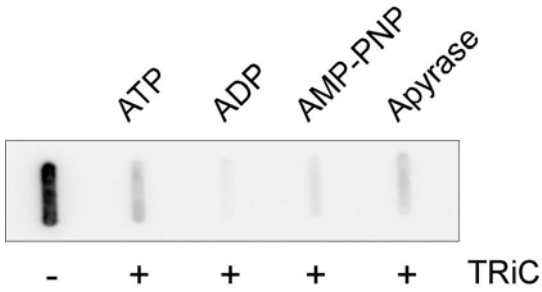

Abb. 3-21: Effekt verschiedener Nukleotide auf die TRiC-vermittelte Inhibition der Htt53Q-Aggregation. Aggregationsansätze wurden wie oben angesetzt. Die Reaktion fand entweder in Anwesenheit von 2 mM ATP und ATP-regenerierendem System, 2 mM ADP, 2 mM AMP-PNP oder in nukleotidfreiem Puffer mit 10 U/ml Apyrase statt. Analyse der Aggregation durch Filter-Retardations-Assay und anschließender Immundetektion mit einem anti-c-myc-Antikörper.

Dies ist konsistent mit dem für TRiC vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus, bei dem ATP-Hydrolyse das Schließen der Kammer bewirkt. ADP und AMP-PNP würden damit den Akzeptor-Status von TRiC stabilisieren, während TRiC, wenn ATP vorhanden ist, zwischen offener und geschlossener Konformation wechselt. Nach diesen Daten erwartet man einen Mechanismus, bei dem TRiC transient mit Huntingtin interagiert, dieses jedoch nicht aktiv einschließt und faltet.

Denaturiertes Aktin, ein wohlbekanntes TRiC-Substrat, konnte den aggregationsinhibierenden Effekt teilweise wieder aufheben (Abb. 3-22). Dies deutet auf eine Beteiligung der Substratbindestelle von TRiC hin.

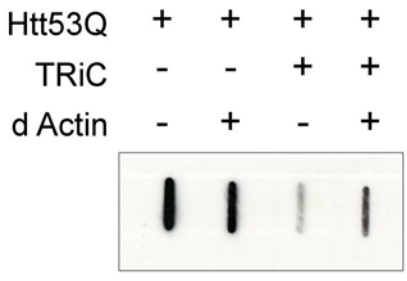

Abb. 3-22: Hemmung der TRiC-vermittelten Inhibition der Htt53Q-Aggregation durch denaturiertes Aktin. Denaturiertes Aktin war in 6 M Guanidinhydrochlorid gelagert. TRiC wurde in Abwesenheit von Nukleotid mit 10fachem Überschuß an denaturiertem Aktin 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dies entspricht 0,06 M Guanidinhydrochlorid. Präzipitiertes Aktin wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 20 000 x g entfernt. So behandeltes TRiC wurde in Aggregationsreaktionen eingesetzt. Aggregationsreaktionen wurden mit 1,5 µM GST-myc-Htt53Q und 0,375 µM TRiC angesetzt und mit 1,25 U PreScission™Protease gestartet. In den Kontrollreaktionen war jeweils 0,06 M Guanidinhydrochlorid vorhanden, in der Kontrollreaktion mit TRiC ohne denaturiertes Aktin wurde TRiC mit Guanidinhydrochlorid behandelt anstelle von denaturiertem Aktin.

3.3.1.2. Charakterisierung der durch TRiC generierten Spezies

Da bereits bekannt war, das Chaperone oftmals nicht die Aggregation *per se* unterdrücken, sondern vielmehr zugunsten von anderen Spezies modulieren (Muchowski et al., 2000; Schaffar et al., 2004), wurde die Natur der durch TRiC generierten Spezies näher untersucht. Im Folgenden wird unterschieden zwischen SDS-resistenten großen Aggregaten, pelletierbaren Aggregaten (unabhängig vom Kriterium der SDS-Löslichkeit), SDS-unlöslichen kleineren Aggregaten oder Oligomeren und SDS-löslichen Spezies. Western Blot-Analyse zeigte, dass durch TRiC keine SDS-lösliche Spezies gebildet wurde, die sich durch SDS-PAGE analysieren ließe (Abb. 3-23). Zentrifugationsexperimente zeigten jedoch, dass die Gesamtmenge an pelletierbarem Material durch TRiC nicht verändert wurde. Dieses pelletierbare Material ließ sich allerdings nicht im Filter-Retardations-Assay registrieren.

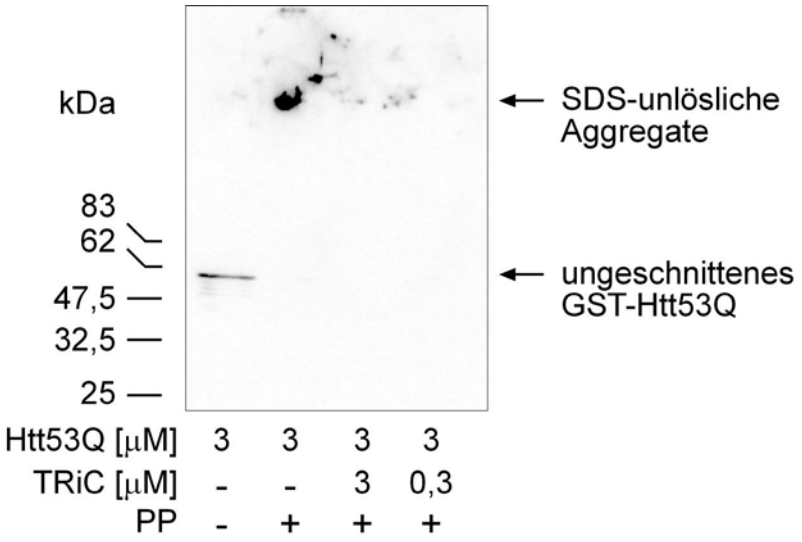

Abb. 3-23: SDS-Unlöslichkeit der durch TRiC generierten Htt53Q-Spezies. Aggregationsreaktionen wurden mit 3 µM GST-myc-Htt53Q und 0-3 µM TRiC angesetzt. Die Aggregation wurde durch 2,5 U PreScission™Protease gestartet und bei 30 °C, 300 Upm für 8 h inkubiert. Die Aggregation wurde durch Kochen in 2% SDS, 50 mM DTT gestoppt. Analyse der Löslichkeit erfolgte durch 12%-SDS-PAGE, Western Blot und anschließende Immundetektion mit einem anti-HA-Antikörper.

Elektronenmikroskopische Analyse der Pellet-Fraktion zeigte, dass zwar nicht die Menge an pelletierbarem Material verändert wurde, dafür aber die Morphologie des Materials. Während Htt53Q ohne Einwirkung von Chaperonen lange Fibrillen von mehr als 200 nm bildete, bewirkte die Einwirkung von TRiC die Generierung von kürzeren fibrillären Strukturen, die je nach TRiC-Konzentration unterschiedliche Längen aufwiesen. Bei äquimolarer Konzentration waren diese ungefähr 10-15 nm lang. Doch auch bei einem Htt53Q:TRiC-Verhältnis von 10:1 waren deutlich verkürzte Fibrillen von ungefähr 70-80 nm Länge zu beobachten (Abb. 3-24). Die Einwirkung von TRiC bewirkt also nicht eine

komplette Inhibition der Aggregation, vielmehr wird die Bildung langer Fibrillen auf einer Zwischenstufe blockiert. Die entstehenden Aggregate sind pelletierbar, SDS-resistent, aber doch so dünn, dass sie durch die Nitrocellulose-Acetat-Membran zum Teil nicht zurückgehalten werden können.

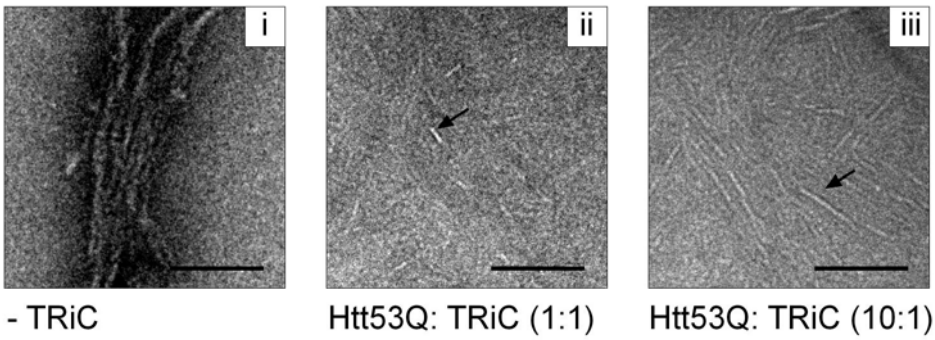

Abb. 3-24: Elektronenmikroskopische Analyse. Aggregationsreaktionen mit 1,5 µM GST-myc-Htt53Q und 0, 0,15 und 1,5 µM TRiC wurden mit 1,25 U PreScission™Protease gestartet und bei 30 °C, 300 Upm inkubiert. Nach 5 h wurden die Fibrillen durch Zentrifugation bei 20 000 x g, 15 min pelletiert und in Puffer aufgenommen. Anschließend Färbung durch negative-Stain und Analyse im Elektronenmikroskop. Der Maßstab entspricht 100 nm

3.3.1.3. Konfokale Einzelmolekülanalyse

Um genaueren Einblick in den Mechanismus der TRiC-vermittelten Modulation der Aggregation zu erhalten, wurden konfokale Einzelmolekülmessungen durchgeführt. Die Messungen wurden wie in Kapitel 3.1. durchgeführt. Als Fluorophore wurden AlexaFluor488 und AlexaFluor633 verwendet, wobei nur AlexaFluor488 angeregt wurde und die durch FRET erzeugten Signale analysiert wurden. Durch Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (FIDA) wurde die molekulare Helligkeit der Teilchen erhalten, die der Größe entspricht, sowie die jeweilige Teilchenkonzentration. TRiC hatte keinen Einfluss auf die frühe Phase der Aggregation, ab einer bestimmten kritischen Größe wurde jedoch das weitere Wachstum blockiert und die Oligomere in ihrer Größe arretiert. Die erreichte Größe der Oligomere war dabei abhängig von der TRiC-Konzentration (Abb. 3-25A). Dies reflektiert das Ergebnis der elektronenmikroskopischen Analyse, bei der ebenfalls unterschiedlich lange Fibrillen, abhängig von der TRiC-Konzentration, beobachtet wurden. Da TRiC das Größenwachstum hemmt, dabei die Partikelkonzentration aber konstant bleibt, kann man folgern, dass TRiC die Elongation der Fibrillen verhindert (Abb. 3-25A).

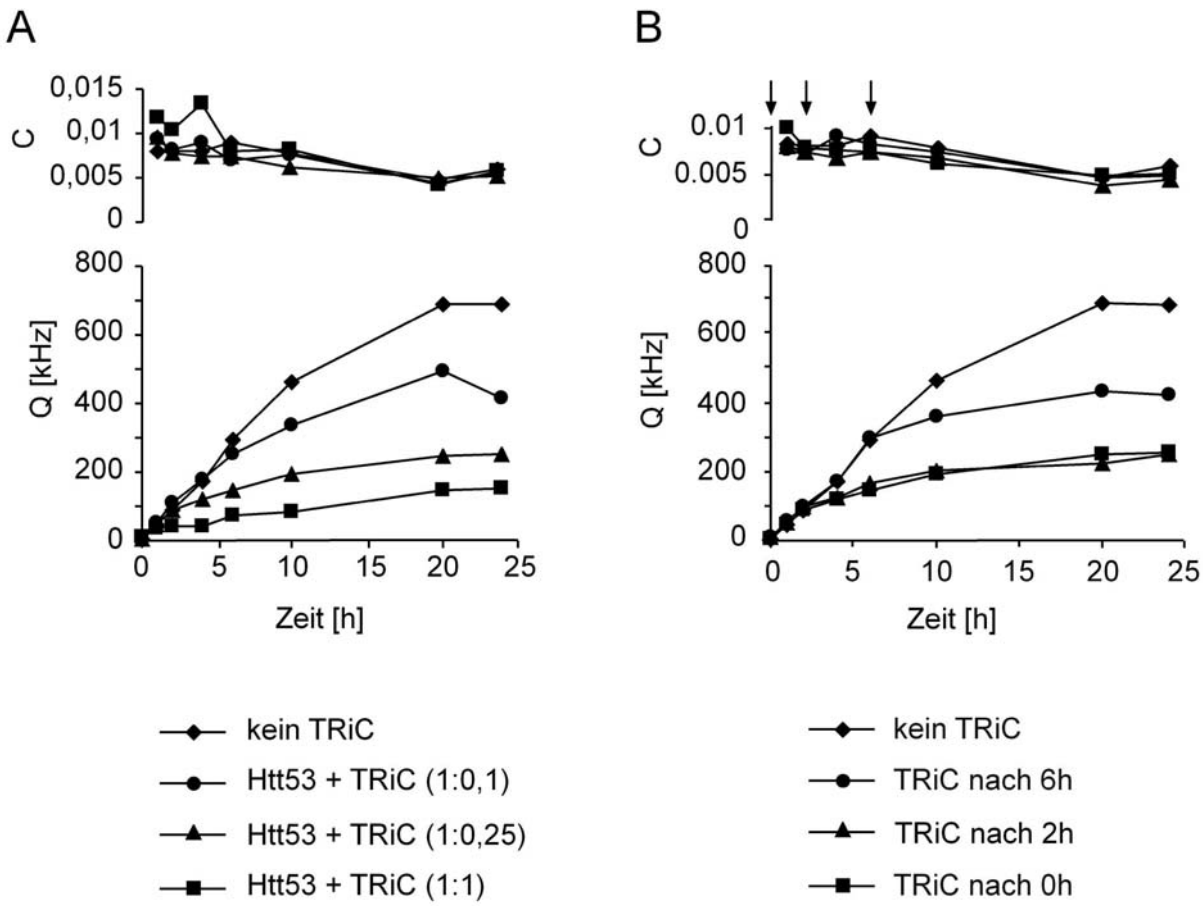

Abb. 3-25: Konfokale Einzelmolekül-Analyse des Effekts von TRiC auf die Htt53Q-Aggregation. (A) Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition. Aggregationsreaktionen wurden mit 1 µM Htt53Q-Alexa488 + 1 µM Htt53Q-Alexa633 + 2 µM, 0,5 µM oder 0,2 µM TRiC angesetzt und mit 2 U PreScission™Protease gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Aliquot entnommen, 1:100 verdünnt und durch FIDA analysiert. Anregungswellenlänge war 488 nm. Die mittlere Partikel-Konzentration pro konfokales Volumen (C) und die molekulare Helligkeit (Q) der FRET-positiven Aggregate wurden durch einen Ein-Komponenten 1D-FIDA-Fit bestimmt. (B) Zeitabhängigkeit der Inhibition. Aggregationsreaktionen wurden mit 1 µM Htt53Q-Alexa488 + 1 µM Htt53Q-Alexa633 angesetzt und mit 2 U PreScission™Protease gestartet. Nach 0 h, 2 h oder 6 h wurden jeweils 0,5 µM TRiC zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Aliquot entnommen, 1:100 verdünnt und wie in (A) analysiert.

TRiC war auch effektiv, wenn es zu späteren Zeitpunkten während des Fibrillenwachstums eingesetzt wurde. Bei Zugabe von TRiC nach 2 h bzw. 6 h wurde das weitere Wachstum direkt nach Zugabe blockiert (Abb. 3-25B) und die Fibrillen bei der Größe, die sie zu diesem Zeitpunkt hatten, arretiert. Daraus kann man einen Mechanismus folgern, bei dem die Nukleationsphase der Aggregation durch TRiC nicht beeinflusst wird, die Elongation der Fibrillen aber effektiv verhindert wird. Dies unterscheidet sich vom Wirkungsmechanismus von Hsp70/40, die hauptsächlich während der Nukleationsphase mit Htt53Q interagieren, während später Phasen der Aggregation aber keinen Effekt haben (Muchowski et al., 2000).

3.3.1.4.Interaktion von TRiC mit Aggregaten

Interessant in diesem Zusammenhang ist nun, mit welcher Spezies TRiC interagiert. Anders als Hsp70/40, die sich zum Teil in der unlöslichen Fraktion befanden, blieb TRiC komplett löslich (Abb. 3-26). Auch im Filter-Retardations-Assay wurde in den SDS-resistenten Aggregaten kein TRiC detektiert. TRiC wurde also nicht in Aggregate rekrutiert, wie das für Hsp70 gezeigt wurde, vielmehr scheint es sich um eine transiente Interaktion zu handeln. Dafür spricht auch, dass *in vitro* keine TRiC-Htt53Q-Komplexe coimmunpräzipitiert werden konnten.

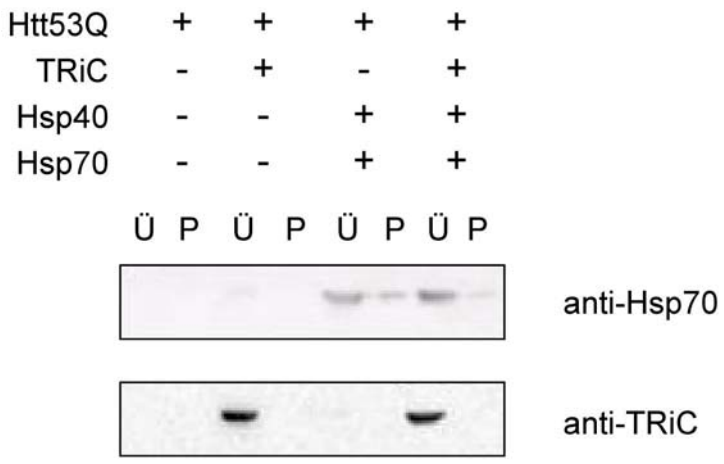

Abb. 3-26: Verteilung der Chaperone. Aggregationsreaktionen wurden mit 1,5 µM GST-myc-Htt53Q und 0,375 µM TRiC, 1,5 µM Hsp40 + 3 µM Hsp70, oder 0,375 µM TRiC + 1,5 µM Hsp40 + 3 µM Hsp70 angesetzt und die Aggregation mit je 1,25 U PreScission™Protease gestartet. Die Reaktion wurde durch Kochen in 2% SDS, 50 mM DTT gestoppt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und durch ein 2,5%-15% Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt. Analyse durch Western Blot und anschließende Immundetektion mit einem anti-Hsp70-Antikörper bzw. einem anti-TRiC-Antikörper.

Die Möglichkeit für TRiC, auch noch zu relativ späten Zeitpunkten wirksam die Aggregation zu unterbrechen, auch noch zu Zeitpunkten, bei denen keine Monomere im Western Blot mehr nachgewiesen werden können, impliziert eine Interaktion von TRiC mit den fibrillären Oligomeren. Um diese Hypothese zu testen, wurde die transiente Interaktion von TRiC und Htt53Q mit Hilfe von konfokalen Einzelmolekülmessungen analysiert. Hierfür wurde AlexaFluor488-markiertes Htt53Q verwendet, außerdem wurde TRiC mit lysin-reaktivem AlexaFluor647 markiert. Für Htt53Q-AlexaFluor488 konnte wie vorher eine Markierungseffizienz von 1:2 erreicht werden. Für TRiC-AlexaFluor647 wurde eine Markierungseffizienz von 2 Molekülen Farbstoff pro TRiC-Komplex erreicht (Abb. 3-27A). Markiertes TRiC war noch in der Lage, die Aggregation von Htt53Q im Filter-Retardations-Assay zu unterdrücken (Abb. 3-27B).

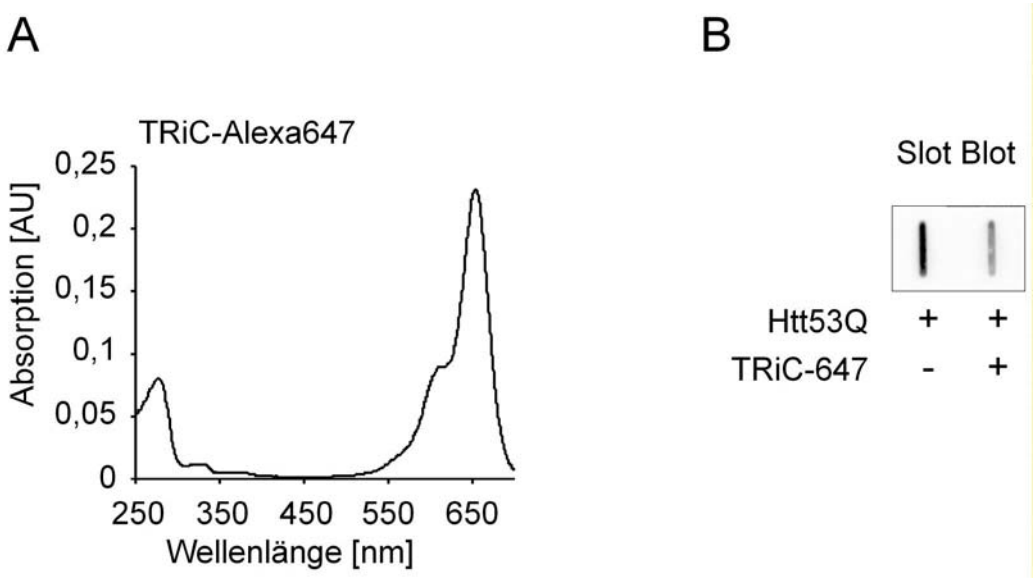

Abb. 3-27: Markierung von TRiC durch AlexaFluor647-Succinimidyl-Ester. (A) Absorptionsspektrum von TRiC-Alexa647. (B) Inhibition der Aggregation durch markiertes TRiC. Die Aggregationsreaktion wurde mit 2 µM GST-myc-Htt53Q mit 0 µM oder 1 µM TRiC-Alexa647 + 2 U PreScission™Protease angesetzt und durch einen Filter-Retardations-Assay und anschließender Immundetektion mit anti-c-myc-Antikörper analysiert.

Durch konfokale Einzelmolekülmessungen im Zwei-Farben-Setup konnten Komplexe aus Htt53Q-Oligomeren mit TRiC nachgewiesen werden. Hierbei wurde ein FRET-basierter Ansatz verwendet. Komplexe zwischen Donor-markiertem Htt53Q und Akzeptor-markiertem TRiC können als FRET-positive Partikel registriert werden. In Abbildung 3-28A,B ist das zweidimensionale Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungshistogramm der beobachteten Komplexe zu sehen. Abbildung 3-28A zeigt die Kontrollreaktion, in der nur einfarbig grün markierte Htt53Q-Komplexe vorhanden waren. Entsprechend sind die resultierenden Partikel dicht an der Achse lokalisiert. In Abbildung 3-28B ist eine Reaktion von Htt53Q-AlexaFluor488 mit TRiC-AlexaFluor647 nach 10 h Aggregation gezeigt. FRET-positive Partikel sind in den Segmenten zwischen den beiden Achsen lokalisiert. Aufgrund ihrer Größe (molekularer Helligkeit) können diese Komplexe Htt53Q-Oligomeren, die an TRiC gebunden sind, zugeordnet werden. Eine Quantifizierung der FRET-positiven Signale nach 10 h Aggregation durch SIFT-Analyse ist in Abbildung 3-28C gezeigt. Hierbei wurden nur Signale, die eine bestimmte Schwellenhelligkeit überschreiten (hier 50 Photonen/ 40 µs im grünen Kanal, 20 Photonen/ 40 µs im roten Kanal), gezählt. FRET-positive Partikel entstanden nach TRiC-Zugabe zu Beginn der Reaktion, aber auch wenn TRiC später zugegeben wurde (hier 6 h). Somit konnte eine direkte Interaktion von TRiC mit Htt53Q-Oligomeren nachgewiesen werden.

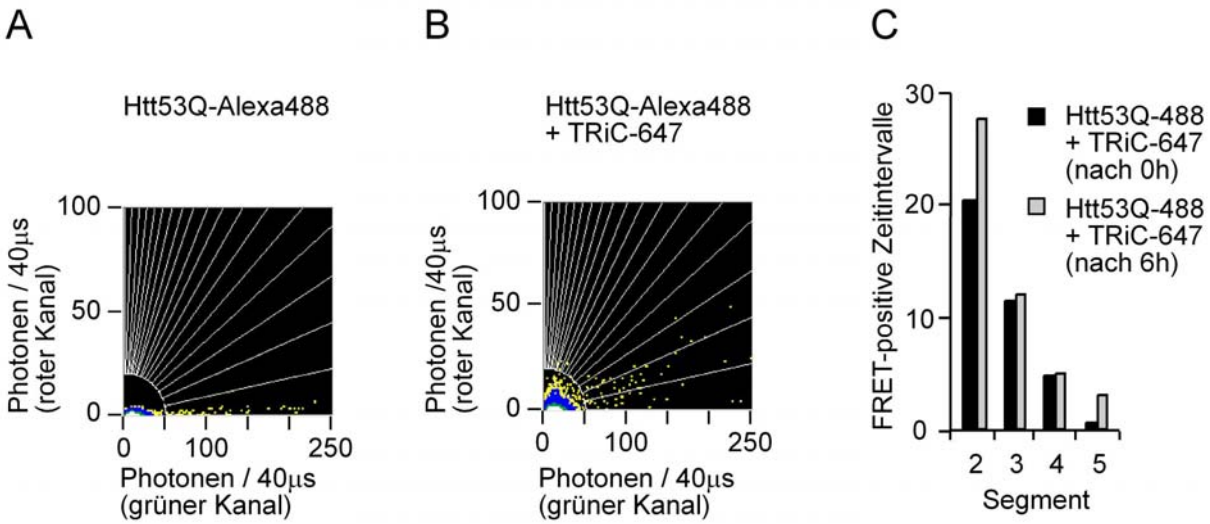

Abb. 3-28: Einzelmolekül-Analyse von gemischten Htt53Q-TRiC-Komplexen. (A) Einzelmolekülanalyse von Huntingtin-Aggregaten. 2 µM Htt53Q-Alexa488 + 2 U PreScission™Protease ohne TRiC wurde für 10 h inkubiert, 1:200 verdünnt und durch SIFT-Analyse analysiert. Anregungswellenlänge war 488 nm. (B) Einzelmolekül-Analyse gemischter Huntingtin-TRiC-Komplexe. 2 µM Htt53Q-Alexa488 + 1 µM TRiC-Alexa647 wurden zusammen mit 2 U PreScission™Protease für 10 h inkubiert, 1:200 verdünnt und durch SIFT-Analyse analysiert. Anregungswellenlänge war 488 nm (C) Quantifizierung der FRET-positiven Partikel, basierend auf SIFT-Analyse. TRiC-Alexa647 wurde entweder zu Beginn oder nach 6h in die Aggregationsreaktion gegeben. Auch bei später Zugabe von TRiC-Alexa647 bilden sich FRET-positive Partikel.

Kreuzkorrelationsanalyse in einem Zwei-Farben-Setup mit beiden anregenden Lasern zeigte zudem, dass zu Beginn der Reaktion keine Kreuzkorrelation zu detektieren war, was jedoch der Fall wäre, wenn TRiC mit Monomeren interagieren würde. Auch zu späteren Zeitpunkten war nur in den gescannten Messungen, bei denen hauptsächlich Oligomere detektiert wurden, nennenswerte Kreuzkorrelation nachweisbar, nicht in den ungescannten Messungen, wie es bei einer Interaktion mit Htt53Q-Monomeren erwartet würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass gereinigtes TRiC direkt mit Htt53Q-Oligomeren interagiert und dabei das Wachstum der Fibrillen inhibiert.

3.3.2. Kooperativer Effekt von TRiC und Hsp70/40

In der *de novo*-Proteinfaltung in der Zelle kooperieren verschiedene Chaperonsysteme. Hsp70-Chaperone binden cotranslational an die naszierende Kette und verhindern zusammen mit den Hsp40-Cochaperonen effizient die Fehlfaltung der Polypeptidkette. Hsp70 und/oder Prefoldin können das stabilisierte Polypeptid an TRiC weiterleiten, das für die komplette Faltung bestimmter Proteine nötig ist. Kooperation ermöglicht optimale Faltung (siehe

Kapitel 1.1.). Ob diese Chaperone auch bei der Prävention der Htt53Q-Aggregation kooperieren, soll nun eingehend untersucht werden.

3.3.2.1. Kooperativer Effekt auf die Löslichkeit von Htt53Q

Interessanterweise konnten Hsp70/40 und TRiC zusammen, aber nicht die einzelnen Chaperone alleine, die Bildung unlöslichen, pelletierbaren Materials in einer Htt53Q-Aggregationsreaktion vermindern (Abb. 3-29).

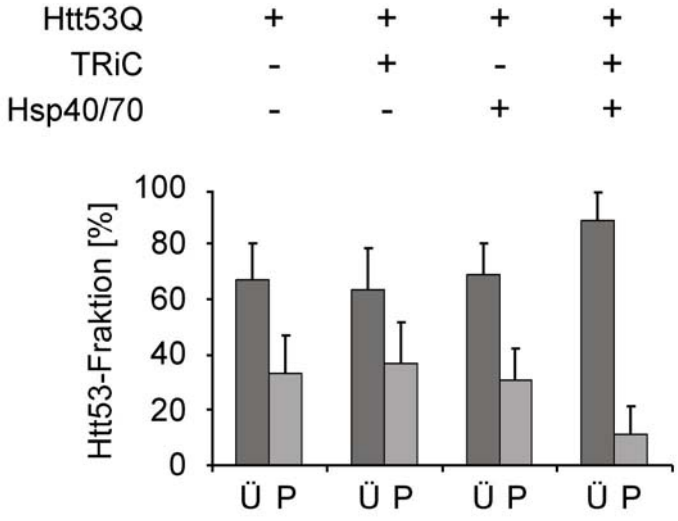

Abb. 3-29: Löslichkeitsanalyse von Htt53Q-Oligomeren generiert durch Einwirkungen verschiedener Chaperon-Kombinationen. (A) Aggregationsansätze wurden mit 1,5 µM GST-myc-Htt53Q entweder mit 0,375 µM TRiC, 1,5 µM Hsp40 + 3 µM Hsp70 oder 0,375 µM TRiC + 1,5 µM Hsp40 + 3 µM Hsp70 angesetzt. Start der Aggregation durch 1,25 U PreScission™Protease. Nach 8 h Aggregation wurde das unlösliche Material durch 20 000 x g-Zentrifugation für 15 min. pelletiert und in Puffer resuspendiert. Analyse der löslichen bzw. unlöslichen Fraktion fand durch Dot-Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion mit Hilfe des anti-HA-Antikörpers statt. Quantifizierung erfolgte durch Densitometrie. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus 6 unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich erhöhte das Zusammenwirken von TRiC und Hsp70/Hsp40 die SDS-Löslichkeit des Materials. Im Western Blot konnte deutlich mehr SDS-lösliches Material detektiert werden. Ein großer Teil der SDS-löslichen Spezies war oligomer und lief im Gel bei ca. 60-90 kDa. Zusätzlich konnte im Western Blot bei Einwirkung von Hsp70/40 und TRiC auf die Htt53Q-Aggregation eine Bande detektiert werden, die Monomeren oder Dimeren entspricht. Diese Bande war in Aggregationsreaktionen mit den einzelnen Chaperonen nicht zu beobachten (Abb. 3-30).

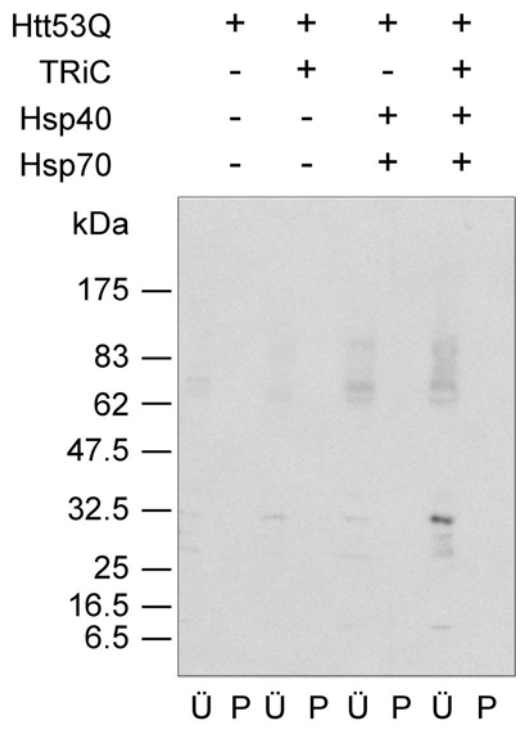

Abb. 3-30: SDS-Löslichkeit der verschiedenen durch Chaperon-Einwirkung generierten Htt53Q-Spezies. Aggregationsansätze wurden mit 1,5 µM GST-myc-Htt53Q und entweder 0,375 µM TRiC, 1,5 µM Hsp40 + 3 µM Hsp70 oder 0,375 µM TRiC + 1,5 µM Hsp40 + 3 µM Hsp70 angesetzt. Start der Aggregation erfolgte durch Zugabe von 1,25 U PreScission™Protease. Nach 8 h Aggregation wurden die Ansätze mit jeweils 2% SDS, 50 mM DTT aufgekocht, danach mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein 2,5%-15%-Gradientengel aufgetragen. Analyse durch Western Blot und Immundetektion mit anti-HA-Antikörper.

3.3.2.2. Charakterisierung der durch TRiC, Hsp40/70-generierten Spezies

Gelfiltrationsanalyse der löslichen Fraktion nach Zentrifugation bei 20 000 x g zeigte, dass durch die Einwirkung von Hsp70/40 und TRiC eine lösliche Htt53Q-Spezies gebildet wurde, die bei ~500 kDa fraktionierte und nicht mit Hsp70 und nur teilweise mit TRiC überlappte (Abb. 3-31A (i)). Diese Spezies war also nicht an ein Chaperon gebunden, sondern stellte vielmehr das stabile Endprodukt einer Reaktion dar. Dass das Produkt SDS-löslich und nicht pelletierbar war, deutet darauf hin, dass es sich nicht um ein intermediäres fibrilläres Aggregat handelte, sondern um eine Spezies mit anderer Konformation. Auch nach einer 100 000 x g-Zentrifugation befand sich das Produkt in der löslichen Fraktion (Abb. 3-31B). Bei Einwirkung von Hsp70/40 ohne TRiC cofraktionierte Htt53Q mit Hsp70 bei einer Größe von ~200 kDa, ein großer Teil der löslichen Htt53Q-Spezies war also an Hsp70 gebunden (Abb. 3-31A (ii)). War in der Reaktion nur TRiC vorhanden, wurde nur sehr wenig lösliches Material gebildet, das bei ~500 kDa fraktionierte (Abb.3-31A (iii)). Die Generierung des ~500 kDa-Produkts durch Hsp70/40 und TRiC war ATP-abhängig (Abb. 3-31A (iv)). Ohne ATP-Zugabe cofraktionierte Htt53Q mit TRiC, die Kooperation mit dem Hsp70/40-System

war also aufgehoben. TRiC konnte zwar Htt53Q binden, aber nicht mehr effizient falten. Diese Cofraktionierung repräsentiert also eine unproduktive Interaktion zwischen TRiC und Htt53Q.

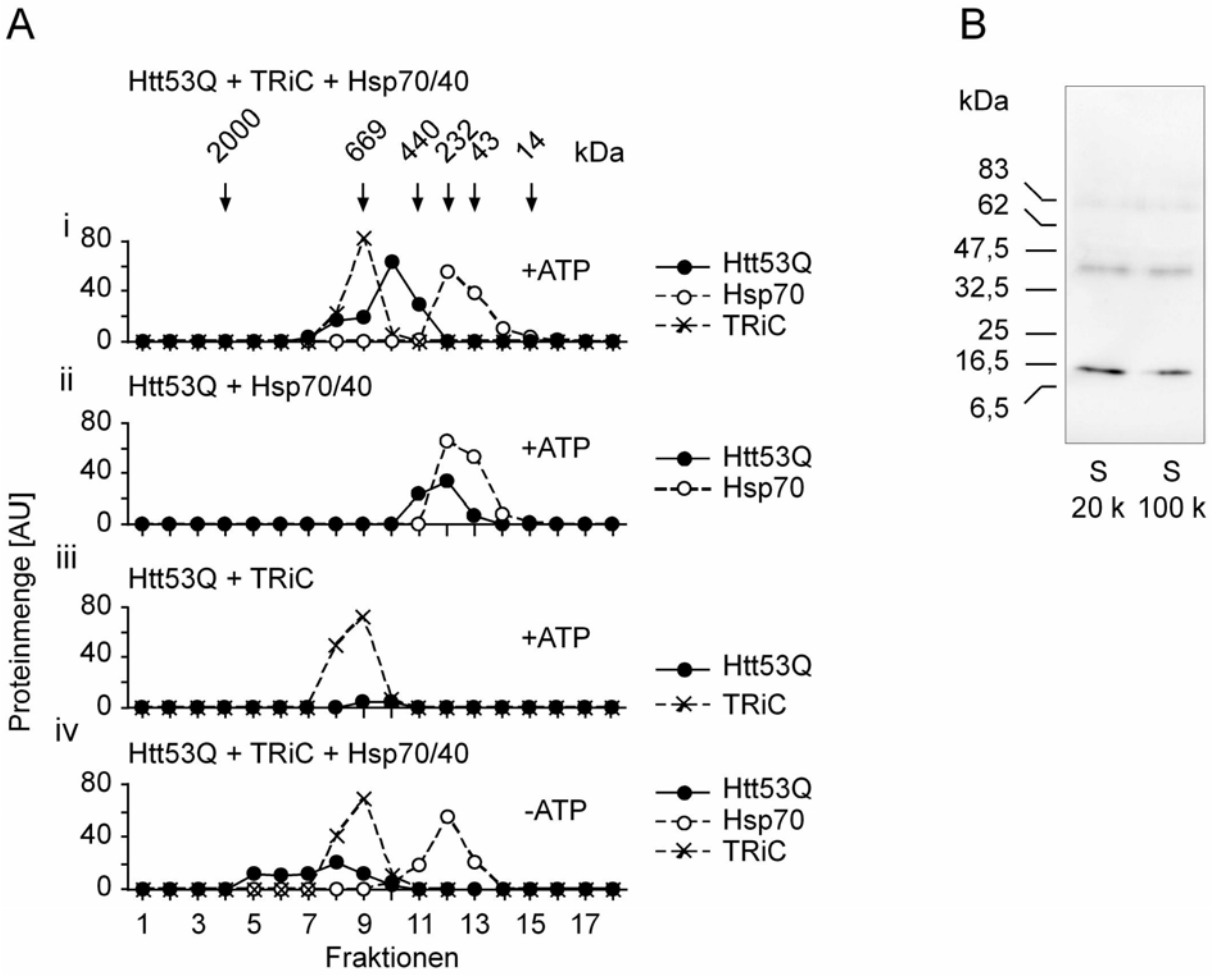

Abb. 3-31: Gelfiltrationschromatographie der löslichen Htt53Q-Spezies. (A) Gelfiltrations-Chromatographie der löslichen Htt53Q-Spezies, die durch Einwirkung von (i) TRiC (6 µM) + Hsp70 (12 µM) + Hsp40 (6 µM), (ii) Hsp70 (12 µM) + Hsp40 (6 µM) oder (iii) TRiC (6 µM) in Anwesenheit von ATP (i-iii) oder durch Einwirkung von (iv) TRiC (6 µM) + Hsp70 (12 µM) + Hsp40 (6 µM) in Abwesenheit von ATP generiert wurde. Die Reaktionen wurden mit 6 µM GST-myc-Htt53Q angesetzt und Aggregation durch Zugabe von 4 U PreScission™Protease gestartet. Nach 8 h Aggregation wurde bei 20 000 x g für 15 min unlösliches Material pelletiert, der Überstand wurde durch Gelfiltrationschromatographie auf einer Superose6-Säule analysiert. Die Fraktionen wurden durch Immunoblot mit Hilfe des anti-c-myc-Antikörpers, des anti-Hsp70-Antikörpers und des anti-TRiC-Antikörpers analysiert. (B) Löslichkeit des ~500 kDa-Fragments. Nach Auftrennung durch die Gelfiltrationssäule wurden die TRiC-enthaltenden Fraktionen gepoolt und bei 100 000 x g für 1 h zentrifugiert. Das ~500 kDa-Fragment befindet sich in der löslichen Fraktion.

Sequentielle Zugabe der Chaperone erzielte unterschiedliche Resultate. Wurde aggregierendes Htt53Q zuerst mit Hsp70/40 inkubiert und TRiC erst später (nach 3 h) zur Aggregationsreaktion zugegeben, wurde das lösliche ~500 kDa-Produkt generiert, wurde die Reihenfolge jedoch getauscht, konnte das lösliche Produkt nicht detektiert werden (Abb. 3-32).

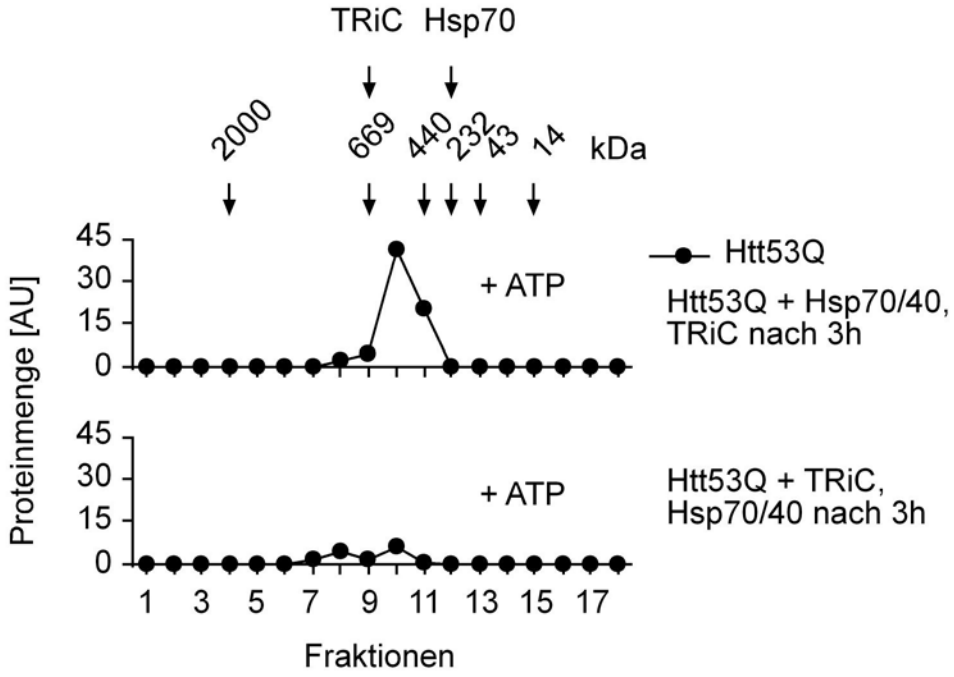

Abb. 3-32: Gelfiltrationsanalyse des löslichen Htt53Q-Produkts bei sequentieller Zugabe der verschiedenen Chaperone. Die Aggregationsreaktionen und Gelfiltrationschromatographie wurden durchgeführt wie oben. Dabei wurde entweder TRiC oder Hsp70/40 erst nach 3 h zugegeben, Aggregation fand für weitere 5 h statt.

Daraus lässt sich schließen, dass das durch Hsp70/40 generierte Produkt Substrat für TRiC ist, die beiden Chaperonsysteme also funktionell kooperieren, nicht additiv. Die Kooperation ähnelt der *de novo*-Faltung von Proteinen, diese Art der Interaktion scheint also physiologische Relevanz zu besitzen.

3.3.2.3. Fluoreszenz-Analyse des kooperativen Effekts auf die Huntingtin-Aggregation

Um genaueren Einblick in die konformationellen Eigenschaften zu erhalten, wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Raina Boteva Fluoreszenzexperimente durchgeführt. Um den Einfluss der Chaperone auf die konformationelle Umlagerung, die der Aggregation vorausgeht, zu untersuchen, wurde intramolekularer FRET eingesetzt (siehe 3.1.1.). Hierbei wurde NCD-4 und IANBD als Donor-Akzeptor-Paar verwendet. NCD-IANBD ist geeignet als Donor-Akzeptor-Paar für kurze Distanzen. Der intramolekulare FRET repräsentiert die Kompaktion des Htt53Q-Moleküls aufgrund der Konformationsänderung im Monomer direkt nach Spaltung mit PreScission^{TM}Protease. Bei einer Kontrollreaktion ohne Chaperone nahm die Donorfluoreszenz aufgrund von FRET um ca. 30% ab (Abb. 3-33). TRiC alleine hatte keinen Einfluss auf den intramolekularen FRET (Abb. 3-33). Dies ist konsistent mit der in 3.3.1 getroffenen Folgerung, dass TRiC auf Oligomere während des Aggregationsprozesses

wirkt, die Nukleationsphase jedoch nicht beeinflusst. Hsp70 und Hsp40 ohne TRiC dagegen beeinflussten die konformationelle Umlagerung, die FRET-Effizienz wurde um 50% verringert (Abb. 3-33). Da der durchschnittliche Wert der FRET-Effizienz gemessen wurde, lässt sich jedoch nicht bestimmen, ob der geringere Wert einer anderen Distanz zwischen den Fluorophoren entspricht, oder einer Mischung verschiedener Konformere, wobei Hsp70/40 teilweise die Umlagerung inhibieren, jedoch nicht zu 100% effektiv sind. Bei Zugabe von TRiC zusammen mit Hsp70/40 wurde die Umlagerung komplett inhibiert, es war keine Änderung der Donor-Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 3-33). Die Chaperone kooperieren also funktionell in der Prävention der konformationellen Umlagerung. Das gebildete Produkt besitzt eine gestreckte Konformation, die möglicherweise der Ausgangskonformation entspricht.

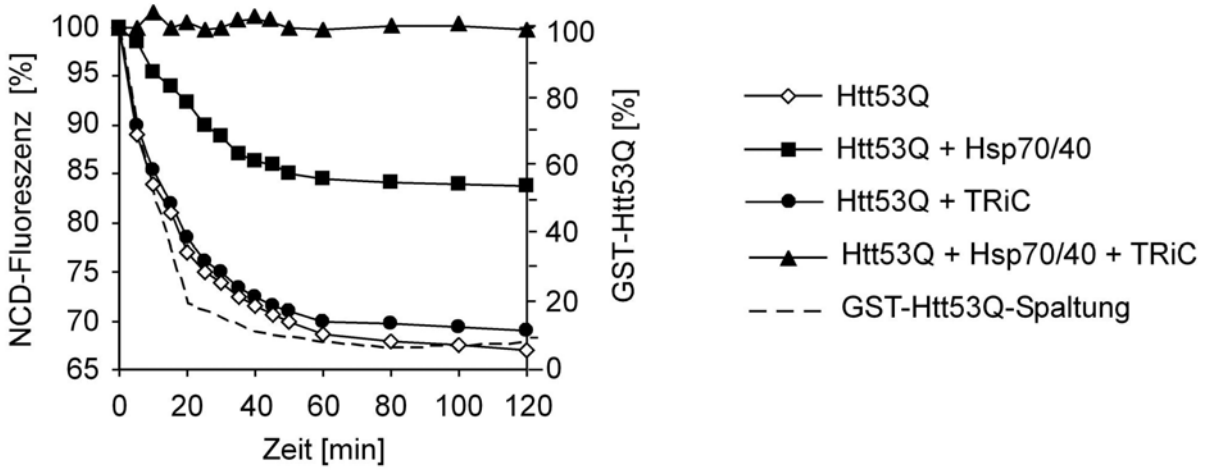

Abb. 3-33: Effekt von Chaperonen auf die Konformationsänderung in Htt53Q. Die Konformationsänderung im Htt53Q-Monomer wurde mit Hilfe von intramolekularem FRET gemessen. Hierfür wurde eine Aggregationsreaktion mit 1 µM GST-C4S-myc-Htt53Q-NCD-IANBD angesetzt und FRET anhand der Abnahme der Donor-Fluoreszenz gemessen. Anregungswellenlänge war 340 nm, Fluoreszenz wurde bei 425 nm gemessen. Reaktionen ohne Chaperone, + TRiC (1 µM), + Hsp70 (1 µM)+ Hsp40 (0,5 µM) oder + TRiC (0,5 µM) + Hsp70 (1 µM) + Hsp40 (0,5 µM) wurden analysiert. Spaltung des GST-C4S-myc-Htt53Q-Konstrukts wurde durch Western Blot analysiert, Immundetektion durch einen anti-c-myc-Antikörper.

Weitere Erkenntnisse über die konformationellen Eigenschaften der Spezies, die unter den verschiedenen Bedingungen generiert wurden, lassen sich durch den Einsatz konformationssensitiver Farbstoffe gewinnen. Wie zuvor wurde IAEDANS als Farbstoff verwendet. Wie schon vorher gezeigt, wurde nach GST-Abspaltung eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet, die von einer spektralen Rotverschiebung begleitet wurde (Abb. 3-3, Abb. 3-34). Diese Abnahme reflektiert die Bildung von Dimeren oder Oligomeren. TRiC alleine hatte keinen Einfluss auf die Konformation (Abb. 3-34), was wiederum konsistent mit der Aussage ist, dass TRiC die Nukleationsphase nicht beeinflusst. Hsp70/40

inhibierten teilweise die Intensitätsabnahme der Fluoreszenz und die spektrale Verschiebung (Abb. 3-34). Die Kombination von TRiC mit Hsp70/40 hatte jedoch den gegenteiligen Effekt. Nun konnte eine stärkere Abnahme der Fluoreszenz (um 30%) und eine verstärkte Rotverschiebung von 16 nm beobachtet werden, d.h der Farbstoff war nun stärker exponiert (Abb. 3-34). Die Konformation der neuen, durch Einwirkung der Chaperone generierten Spezies ist also verschieden von der Konformation des ungeschnittenen Proteins, d.h. der Einfluss der Chaperone inhibiert nicht nur die Aggregation, sondern produziert eine völlig neue Spezies mit spezifischen Eigenschaften.

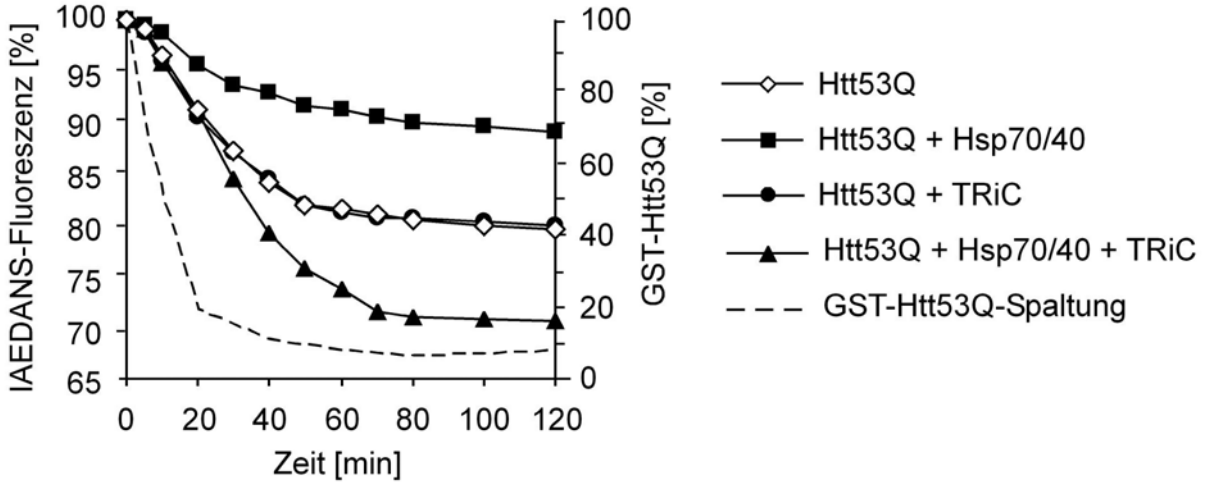

Abb. 3-34: Effekt von Chaperonen auf die Konformation von Htt53Q. Änderungen in der Konformation wurden als Änderungen in der IAEDANS-Fluoreszenz registriert. Aggregationsreaktionen wurden mit 1 μM GST-C4S-myc-Htt53Q-IAEDANS angesetzt entweder ohne Chaperone, + TRiC (1 μM), + Hsp70 (1 μM) + Hsp40 (0,5 μM) oder +TRiC (0,2 μM) + Hsp70 (1 μM) + Hsp40 (0,5 μM). Anregungswellenlänge war 360 nm, Änderungen in der IAEDANS-Fluoreszenz wurden bei 475 nm gemessen. Spaltung von GST-C4S-myc-Htt53Q wurde durch Western Blot analysiert, Immundetektion durch einen anti-c-myc-Antikörper.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass TRiC mit Hsp70/40 synergistisch kooperiert, wobei das durch Hsp70/40 generierte Produkt Substrat für TRiC ist. Durch die Einwirkung dieser Chaperonsysteme wird eine wohldefinierte Spezies von ~500 kDa erzeugt, die nicht-pelletierbar und SDS-löslich ist und dabei andere konformationelle Eigenschaften aufweist als das ursprüngliche ungeschnittene Fusionsprotein. Man kann also davon ausgehen, dass die Chaperone nicht nur die Aggregation verzögern, sondern durch die Bereitstellung einer neuen löslichen Spezies einen anderen Faltungsweg ermöglichen, der möglicherweise gutartige Spezies hervorbringt statt amyloider Aggregate mit toxischen Intermediaten.

3.3.2.4. Förderung der Htt-Aggregation und Toxizität durch defizientes TRiC

Diese *in vitro*-Befunde wurden durch *in vivo*-Experimente, die von Christian Behrends durchgeführt wurden, bestätigt (Behrends et al., 2006). Als Modellorganismus diente *S. cerevisiae*, ein bereits etabliertes Modellsystem zur Analyse der Htt-Aggregation. In Wildtyp-Hefezellen zeigt Htt20Q keine im Filter-Retardations-Assay detektierbaren Aggregate, Htt45Q kleine Mengen an Aggregaten und Htt96Q große Mengen an Aggregaten. Diese können auch durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie als große cytoplasmatische Einschlüsse nachgewiesen werden.

Wurden die verschiedenen Htt-Konstrukte in konditionalen TRiC-defizienten tcp1-2-Zellen bei einer semi-permissiven Temperatur (30 °C) exprimiert, wurde die doppelte Menge an SDS-unlöslichen Aggregaten wie in Wildtyp-Zellen erhalten. Auch in der Immunfluoreszenz konnte dieser Effekt beobachtet werden: In Wildtyp-Hefezellen erhielt man bei Expression von Htt45Q eine diffuse Verteilung, in tcp1-2-Zellen dagegen große wohldefinierte Einschlüsse. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse in *C. elegans* (Nollen et al., 2004); hier verstärkte eine Herunterregulierung von TRiC-Untereinheiten ebenfalls die Aggregation.

Teilweise konnte Colokalisation von TRiC mit Htt96Q-Aggregaten und stabile Inkorporation in Aggregate nachgewiesen werden, wobei jedoch ca. 75% von TRiC löslich blieben. *In vitro* befand sich TRiC ausschließlich in der löslichen Fraktion. So spielt die Depletion von TRiC durch Aggregate wahrscheinlich keine große Rolle, wie das z.B. für Hsp70 der Fall wäre. Andererseits verstärkte die Expression von Htt96Q den Wachstumsdefekt von tcp1-2-Zellen, ein Effekt, der durch Expression von Wildtyp-TRiC aufgehoben werden konnte. Dies spricht für einen Toxizitätsmechanismus, bei dem aktives TRiC durch Depletion aus dem Pool entfernt wird.

3.3.2.5. Unterdrückung der Htt-Aggregation durch TRiC-Überexpression

Um direkte Hinweise auf die Rolle von TRiC zu erhalten, wurden Experimente mit einem Hefestamm durchgeführt, der alle acht TRiC-Untereinheiten (TCP1-TCP8) überexprimiert. TRiC-Überexpression in Wildtyp-Hefe inhibierte die Bildung SDS-unlöslicher Htt-Aggregate (sowohl Htt96Q als auch Htt103Q-GFP). TRiC-Überexpression in Hefestämmen mit reduzierter Menge an cytosolischem Hsp70 der Ssa-Klasse (ssa1Δ/ssa2Δ) führte dagegen nicht zu einer Reduktion der Aggregate. TRiC-Überexpression in Hefestämmen mit reduzierter Menge an nichtkanonischem, ribosomenassoziierten Hsp70

Ssb1p und Ssb2p (ssb1Δ/ssb2Δ) wiederum inhibierte die Aggregation. Dies unterstützt die aus den *in vitro*-Daten gezogene Hypothese, dass TRiC in Kooperation mit kanonischem Hsp70 und Hsp40 die Htt-Aggregation moduliert. Zur Unterdrückung der Aggregation war Überexpression aller acht Untereinheiten nötig. GroEL, das bakterielle Klasse I-Chaperonin, konnte die Aggregation nicht unterdrücken, was bedeutet, dass die Interaktion spezifische Eigenschaften von TRiC benötigt.

Auch *in vivo* wurde eine Gelfiltrationsanalyse der löslichen Fraktion der Zellextrakte durchgeführt. Hier zeigte sich, dass bei TRiC-Überexpression Htt96Q bei ~440 kDa fraktionierte, ohne TRiC-Überexpression konnte keine lösliche Htt96Q-Spezies erhalten werden. Dies reflektiert das Verhalten von gereinigtem Htt53Q in Gegenwart von TRiC und Hsp70/40 *in vitro*.

Nach allen bisherigen Erkenntnissen kann TRiC in Kooperation mit Hsp70/40 ein wohldefiniertes, lösliches Produkt bilden, das eine Konformation besitzt, die verschieden ist vom Ausgangsprotein. Interessant wäre nun, ob dieses Produkt immer noch toxisch ist. Um dies zu testen wurde ein Konstrukt verwendet, das in Wildtyp-Hefe einen Wachstumsdefekt zeigt, nämlich Htt103Q-GFP. Überexpression von TRiC hemmte den Wachstumsdefekt, Überexpression von Ssa1p (Hsp70-homolog) und Ydj1 (Hsp40-homolog) konnten dagegen den Wachstumsdefekt nicht aufheben. Gelfiltrationsanalyse von Htt103Q-GFP zeigte ohne Überexpression von TRiC eine ~200 kDa-Spezies, die im Falle von Htt96Q nicht zu beobachten war. Wahrscheinlich ist die Toxizität von Htt103Q-GFP auf diese Spezies zurückzuführen. Bei Überexpression von TRiC wurde dagegen Fraktionierung bei ~500 kDa beobachtet, vergleichbar mit Htt96Q. Ein kleiner Teil fraktionierte auch bei ~50 kDa, was wahrscheinlich monomerem Protein entspricht. Überexpression von Ssa1/Ydj1 reduzierte die ~200 kDa-Form nicht, was konsistent mit dem Unvermögen von Ssa1/Ydj1 ist, Toxizität zu unterdrücken. Das ~200 kDa-Oligomer unterscheidet sich strukturell vom ~500 kDa-Oligomer. Dies konnte durch ihre Immunoreaktivität mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Das ~200 kDa-Oligomer reagierte mit dem Antikörper A11, einem Antikörper, der sequenzunabhängig lösliche amyloide Oligomere erkennt (Kayed et al., 2003), und nur schwach mit dem Antikörper 1C2, der mit expandierten Polyglutaminsequenzen interagiert (Trottier et al., 1995). Dagegen wurde das ~500 kDa-Produkt durch den 1C2-Antikörper erkannt, reagierte aber nicht mit dem A11-Antikörper.

Aus den *in vitro*- und den *in vivo*-Daten kann man folgern, dass Kooperation von TRiC, Hsp70 und Hsp40 ein stabiles lösliches Oligomer generiert, das völlig neue konformationelle Eigenschaften aufweist und nicht toxisch ist.

4. DISKUSSION

4.1. Molekulare Analyse der Huntingtin-Aggregation

Charakteristisch für neurodegenerative Erkrankungen ist die Ausbildung amyloider oder amyloid-ähnlicher Fibrillen (siehe Einleitung). Aggregatbildung ist dabei assoziiert mit Neurodegenereration und neuronaler Dysfunktion. Welche Spezies im Aggregationsprozess hauptsächlich für die Toxizität verantwortlich ist, ist Gegenstand aktueller Forschung. Da Zelltod und Bildung mikroskopisch sichtbarer Aggregate nicht immer miteinander korrelieren, geht man inzwischen zunehmend davon aus, dass lösliche Intermediate eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen (Caughey and Lansbury, 2003; Cummings et al., 1999; Glabe, 2005; Klement et al., 1998; Saudou et al., 1998). In dieser Arbeit wurden Methoden für die Analyse des Aggregationsprozesses entwickelt. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Analyse und FRET wurde die Nukleationsphase der Htt-Aggregation näher untersucht, mit Hilfe konfokaler Einzelmolekülmessungen wurde die Elongationsphase näher charakterisiert.

4.1.1. Frühe Phase der Aggregation

Durch umgebungssensitive Fluoreszenzfarbstoffe konnte gezeigt werden, dass in der frühen Phase der Htt-Aggregation eine Konformationsänderung stattfindet. In den verschiedenen Bereichen des Proteins wirkt sich diese unterschiedlich aus. Der *c-myc-tag* befindet sich nach der Konformationsänderung in deutlich polarerer Umgebung, in unmittelbarer Nähe der Polyglutaminregion befindet sich der Fluorophor dagegen in einer hydrophoberen Umgebung als zuvor. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass eine Konformationsänderung innerhalb der Polyglutaminregion stattfindet, wobei die Polyglutaminregion auch an der Ausbildung höhermolekularer Strukturen wie Dimere, Trimere oder kleiner Oligomere beteiligt ist. Der *c-myc-tag* ist in dieser kompakten Konformation nicht involviert. Die Kinetik der Fluoreszenzänderung lässt sich weder mit einer unimolekularen noch mit einer bimolekularen Reaktion annähern. Wahrscheinlich überlagern sich mehrere Prozesse, wie z.B. die Spaltung des Fusionsproteins, Umlagerung im Monomer und Dimerisierung und/ oder Oligomerisierung. Eine detailliertere Analyse liegt jedoch außerhalb der Möglichkeiten der angewandten Methode.

Inter- und intramolekulare FRET-Experimente lieferten Hinweise, dass eine Konformationsänderung im Htt-Monomer stattfindet, die der Dimerisierung oder Oligomerisierung vorausgeht. Die Kompaktion des Monomers verläuft parallel zur Spaltung des Fusionsproteins, während Dimerisierung oder Oligomerisierung verzögert erfolgt. Die intermolekulare FRET-Kinetik entspricht der Kinetik der Änderung der Fluoreszenz im umgebungssensitiven Farbstoff, beide messen also denselben Effekt. Ein Plateau der Dimerisierung oder Oligomerisierung wurde je nach Bedingungen und verwendetem Protein nach einigen Stunden erreicht. Zu dieser Zeit waren bereits große SDS-unlösliche Aggregate im Filter-Retardations-Assay zu beobachten. Dies spricht dafür, dass sich mehrere Prozesse überlagern, von denen je nach Methode der eine oder andere beobachtet werden kann.

Für die polyglutaminabhängige Aggregation wurde in der Literatur ein nukleationsabhängiger Polymerisationsmechanismus vorgeschlagen (Chen et al., 2002a). Die polyglutaminabhängige Aggregation zeigt einige Charakteristika für einen solchen Mechanismus. So ist sie konzentrationsabhängig und zeigt eine typische *lag*-Phase, die durch Zugabe von Aggregationskeimen verkürzt werden kann (Chen et al., 2002a; Scherzinger et al., 1997). Als Nukleus wurde ein Monomer vorgeschlagen (Chen et al., 2002b), die Nukleation würde also der energetisch ungünstigen Konformationsänderung innerhalb des Monomers entsprechen. Dies wurde durch die intramolekularen FRET-Messungen bestätigt, es findet eine Kompaktion im Monomer statt, die weiteren Aggregationsschritten wie der Dimerisierung und Oligomerisierung vorausgeht.

4.1.2. Elongationsphase der Aggregation

Die Elongationsphase wurde mit Hilfe von konfokalen Einzelmolekülmessungen näher charakterisiert. Durch FRET-basierte FIDA-Analyse (*fluorescence intensity distribution analysis*) wurde die mittlere molekulare Helligkeit, die der Partikelgröße entspricht, und die jeweilige Partikelkonzentration bestimmt. Während der Aggregation wurde eine Zunahme der Partikelgröße beobachtet, die Partikelkonzentration blieb jedoch nach der anfänglichen Spaltungsreaktion mehr oder weniger konstant. Da Monomere in der FRET-basierten Messung nicht detektiert werden können, wurde die Abnahme der Monomerkonzentration nicht erfasst. Die Daten implizieren einen Aggregationsmechanismus durch Addition von Monomeren an die wachsende Fibrille. Ein ähnlicher Mechnanismus wurde auch von Berthelier et al. vorgeschlagen (Berthelier et al., 2001). Dieses Modell sieht einen zweiphasigen Additionsmechanismus vor, bei dem zuerst eine lose Anlagerung des

Monomers erfolgen würde (*docking*), der dann durch eine Konformationsänderung fest verankert würde (*locking*). Das Wachstum amyloider nicht-polyglutaminhaltiger Fibrillen wurde durch *Time-lapse-AFM* visualisiert (Goldsbury et al., 1999). Es wurde bidirektionales Wachstum an beiden Enden beobachtet. Ein ähnlicher experimenteller Ansatz könnte auch für eine weitere Analyse des Wachstums der Htt-Fibrillen verwendet werden.

Ein Elongationsmechanismus durch Monomer-Addition stünde allerdings im Widerspruch zum Auftreten von Intermediaten, wie sie von einigen Autoren beobachtet wurden (Poirier et al., 2002; Wacker et al., 2004). Allerding koexistieren oft verschiedenene intermediäre Spezies, die Ausbildung von globulären oder annulären Intermediaten könnte also auch einen Seitenweg (*off pathway*) darstellen.

Allerdings repräsentieren die in der konfokalen Einzelmolekülanalyse beobachteten Komplexe wahrscheinlich nicht die reifen Aggregate, sondern hochmolekulare intermediäre Spezies wie z.B. Protofibrillen, da reife Aggregate zu langsam diffundieren, um in der Einzelmolekülanalyse berücksichtigt zu werden. Diese hochmolekularen Spezies bestehen aus ca. 40-80 Monomeren. Ein Mechanismus, bei dem durch Monomer-Addition ein solches protofibrilläres Aggregat entstehen würde, wäre sowohl mit einem Elongationsmechanismus durch Monomer-Addition konsistent als auch mit dem Auftreten von protofibrillären Intermediaten.

Die Ergebnisse der konfokalen Einzelmolekülanalyse könnten aber auch dahingehend interpretiert werden, dass nicht Monomere an die wachsende Fibrille angelagert werden, sondern eine andere bisher nicht erfasste Spezies, möglicherweise Dimere oder kleine Oligomere, die sich direkt im Anschluss an die Spaltungsreaktion bilden. Allerdings müsste diese Spezies FRET-negativ sein.

Analyse der Aggregation durch den umgebungssensitiven Farbstoff bis-ANS zeigte ein kontinuierliches Ansteigen der Hydrophobizität, die nach ca. 8 h ein Zwischenplateau erreichte, dem Zeitpunkt, zu dem die SDS-resistente Aggregation weitgehend abgeschlossen ist. Danach allerdings stieg die Hydrophobizität weiter an, möglicherweise repräsentiert dies eine Umlagerung der SDS-resistenten Aggregate zu höher organisierten Einheiten. Der kontinuierliche Anstieg der Hydrophobizität unterstützt auf den ersten Blick mehr die Hypothese des kontinuierlichen Wachstums durch Anlagerung von Monomeren als die des Auftretens vieler verschiedener Intermediate mit unterschiedlicher Struktur. Da in dieser Messung aber nur Durchschnittswerte gemessen werden, wäre auch das Vorhandensein einer

Vielzahl unterschiedlicher Intermediate in der Lösung möglich, deren Zusammensetzung sich im Verlauf der Aggregation ändert, wobei die Gesamthydrophobizität kontinuierlich ansteigt.

Die Frage, wie die Wachstumsphase vor sich geht, kann mit den bisher vorhandenen Daten nicht abschließend geklärt werden. Fest steht jedoch, dass es sich um einen sehr komplexen Prozess handelt, der durch die zusätzliche Spaltungsreaktion des Fusionsproteins noch zusätzlich verkompliziert wird. Möglicherweise ist am Aggregationsprozess eine Vielzahl von Spezies beteiligt, die entweder Zwischenprodukte oder unproduktive Seitenprodukte darstellen (*on pathway* oder *off pathway*). Deren genaue Eigenschaften gilt es nun herauszufinden. Weitere Experimente, z.B. Einzelmolekülanalysen, die genaueren Einblick in die Zusammensetzung komplexer Gemische erlauben, wären nötig, um ein vertieftes Verständnis für die Vorgänge während der Aggregation zu erhalten.

4.2. Struktur der Huntingtin-Aggregate

4.2.1. Struktur der reifen Aggregate

Polyglutaminaggregate weisen einige Merkmale amyloider Aggregate auf. So bilden sie lange unverzweigte Fibrillen (Scherzinger et al., 1997), sind resistent gegen proteolytische Degradation, binden Congorot und Thioflavin T (Scherzinger et al., 1997). Sie sind reich an β-Struktur-Elementen (Chen et al., 2002a). Außerdem besitzen sie gemeinsame Strukturmerkmale mit anderen amyloiden Aggregaten, die ein gemeinsamer Antikörper erkennt (O'Nuallain and Wetzel, 2002). Es gibt jedoch auch Unterschiede zu klassischen amyloiden Fibrillen. So wurde zwar Congorotbindung, jedoch nicht in allen Fällen auch grüne Doppelbrechung beobachtet (Chen et al., 2002a). Röntgenstrukturanalyse von Polyglutaminaggregaten zeigt ein ähnliches Beugungsmuster wie für amyloide Aggregate, allerdings gibt es deutliche Unterschiede, z.B. fehlt bei Polyglutaminaggregaten eine charakteristische 9,8-10 Å-meridionale Reflexion (Perutz et al., 2002). Polyglutamine können im Gegensatz zu klassischen amyloiden Fibrillen, die durch Wasserstoffbrücken zwischen Hauptkettenamiden stabilisiert werden, auch Wasserstoffbrücken zwischen Seitenkettenamiden aufbauen (Perutz et al., 2002). So können aus der Analyse von amyloiden Fibrillen zwar wertvolle Hinweise auf die Struktur von Polyglutaminaggregaten erhalten werden, die Unterschiede sollten jedoch nicht vernachlässigt werden.

Für Polyglutaminaggregate wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen. Wegweisend in der Erforschung der Struktur der Polyglutaminaggregate waren die Arbeiten von Max Perutz. 1994 schlug dieser eine sogenannte Reißverschluss (*polar zipper*)-Struktur vor, die durch Wasserstoffbrücken zwischen Haupt- und Seitenkettenamiden stabilisiert würde (Perutz et al., 1994). In einem neueren Modell, schlug er 2002 die wassergefüllte parallele β-Helix aus nur einem β-Strang vor (Perutz et al., 2002). Dabei würden 20 Glutamine eine Umdrehung der Helix bilden. Stabilisiert würde die Helix durch Wasserstoffbrücken zwischen Haupt- und Seitenkettenamiden. Eine solche Helix hätte einen Außendurchmesser von ungefähr 31 Å. Inzwischen ist dieses Modell jedoch sehr umstritten. Simulationen zeigten, dass eine wassergefüllte zirkuläre Helix nicht stabil wäre (Stork et al., 2005). Stattdessen wurde eine trianguläre Helix mit 18 Glutaminen pro Umdrehung vorgeschlagen, die durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert würde. Andere Simulationen (Merlino et al., 2006) identifizierten ebenfalls die trianguläre Helix mit 18 Glutaminen als die stabilste Struktur in einem bestimmten Bereich an Polyglutaminlängen (hier 61Q), eine wassergefüllte Helix wäre erst bei sehr langen Polyglutaminsequenzen stabil (hier 161Q).

Andere Modelle für Polyglutaminaggregate gehen nicht von einer helikalen Struktur aus. Stattdessen wurde eine kompakte kristalline Struktur vorgeschlagen, bei der die Faltblätter eng gestapelt sind (Sikorski and Atkins, 2005) oder eine scheibenartige Struktur aus mehreren β-Faltblättern (Sharma et al., 2005). Mutationsanalyse zeigte, dass nicht alle Glutamine der Polyglutaminsequenz äquivalent sind (Thakur and Wetzel, 2002). Je nach Position lassen sie sich durch eine Prolin-Glycin-Sequenz ersetzen oder nicht. Daraus entwickelten Thakur und Wetzel ein detailliertes Modell eines antiparallelen β-Faltblatts mit vier β-Strängen aus jeweils sieben Glutaminen, die durch Haarnadelschleifen miteinander verbunden wären. Die Ergebnisse wären aber auch konsistent mit einer triangulären Helix aus je 18 Glutaminen pro Umdrehung, wie sie von Stork et al. vorgeschlagen wurde.

Um eines der Modelle zu verifizieren, wurden in dieser Arbeit FRET-Messungen durchgeführt. FRET kann als molekularer Abstandsmesser dienen (Stryer, 1978). Jeweils vor und nach der Polyglutaminsequenz wurde ein Fluorophor gebunden, dadurch wurden intramolekulare Abstände innerhalb des Aggregats gemessen. Durch Verdünnung mit unmarkiertem Protein wurde intermolekularer FRET minimiert. Es kann somit keine Aussage über höhere Hierarchien in der Anordnung gemacht werden. Weitere biophysikalische Experimente wären für solche Aussagen nötig.

Als Donor-Akzeptor-Paar für die intramolekulare Abstandsmessung wurde IAEDANS-Fluorescein verwendet. Die Förster-Distanz beträgt 30,2 Å, d.h. Distanzen in diesem Bereich werden am empfindlichsten detektiert. Für eine Überprüfung durch Distanzmessungen eignen sich nur die sehr detaillierten Modelle, nämlich die zirkuläre β-Helix aus 20 Glutaminen pro Umdrehung (Perutz et al., 2002), die trianguläre β-Helix aus 18 Glutaminen pro Umdrehung (Stork et al., 2005) und das antiparallele β-Faltblatt mit sieben Glutaminen pro Strang (Thakur and Wetzel, 2002). Je nach Modell werden unterschiedliche Distanzen zwischen den Fluorophoren erwartet. Nach einer Abschätzung, ausgehend von einem C_α-C_α-Abstand von 3,5 Å innerhalb der β-Stränge und einem Abstand der Stränge voneinander von 4,8 Å, erwartet man für ein antiparalleles Faltblatt mit sieben Glutaminen pro Strang (Thakur and Wetzel, 2002) für 53 Glutamine eine Distanz von ca. 31 Å, für 40 Glutamine ca. 19 Å, für 30 Glutamine ca. 31 Å. Für eine parallele β-Helix mit 20 Glutaminen pro Umdrehung (Perutz et al., 2002) erwartet man für 53 Glutamine etwa 33 Å, für 40 Glutamine etwa 10 Å, für 30 Glutamine etwa 32 Å. Für eine trianguläre Helix mit 18 Glutaminen pro Umdrehung (Stork et al., 2005) erwartet man für 53 Glutamine ca. 16 Å, für 40 Glutamine ca. 12 Å, für 30 Glutamine ca. 32 Å. Die gemessenen Werte von 28,6 Å für 53 Glutamine, von 28,1 Å für 40 Glutamine und von 28,3 Å für 30 Glutamine (jeweils der Mittelwert) zeigen jedoch keine Abhängigkeit der Distanz von der Polyglutaminlänge. Somit kann keines der Modelle mit Hilfe dieser FRET-Messungen verifiziert werden. Möglicherweise konnte nicht die nötige Genauigkeit erreicht werden, um feinere Unterschiede zu detektieren, möglicherweise entsprechen diese Modelle nicht der Wirklichkeit.

Obwohl keine genaue Aussage über die Struktur der Polyglutaminaggregate getroffen werden konnte, konnte dennoch strukturelle Information aus den Messungen gewonnen werden. Die Tatsache, dass für Aggregate unabhängig von der Polyglutaminlänge die gleiche Distanz gemessen wurde, die kürzer als die Distanz im Ausgangsprotein ist, spricht für eine spezifische kompakte stabile Konformation des Aggregats.

4.2.2. Struktur der löslichen Spezies

Durch intramolekularen FRET wurden auch die Distanzen für 53Q in löslichen Oligomeren und im ungeschnittenen Fusionsprotein ermittelt. Im ungeschnittenen Fusionsprotein wurde eine durchschnittliche Distanz von 36,9 Å gemessen, die löslichen Spezies zeigten eine durchschnittliche Distanz von 40,3 Å. Dies deutet auf verschiedene

Konformationen im ungeschnittenen Protein und in löslichen Oligomeren hin, die löslichen Oligomere besitzen dabei eine ausgestreckte Konformation. Man muss bei der Interpretation der Daten jedoch berücksichtigen, dass es sich um Durchschnittswerte handelt, die durchaus eine Mischung verschiedener Spezies repräsentieren könnten. Einzelmolekülanalyse wäre geeignet zur detaillierteren Analyse von Gemischen aus verschiedenen Spezies.

4.2.3. Struktur der frühen Aggregate

Durch intramolekularen FRET wurden auch die Distanzen innerhalb der unlöslichen Spezies, die schon früher im Aggregationsprozess entstanden, gemessen. Diese Messungen wurden für das 53Q-enthaltende Protein durchgeführt. Die Distanz von 28,1 Å in der frühen unlöslichen Spezies im Vergleich zu 28,6 Å in reifen Aggregaten (jeweils der Mittelwert) zeigt keine gravierenden Unterschiede. Dies ist ein entscheidender Hinweis darauf, dass frühe unlösliche Spezies eine ähnliche Struktur aufweisen wie die späteren Aggregate, bzw. aus ähnlich strukturierten Einheiten aufgebaut sind. Dies spricht für das Vorkommen protofibrillärer Intermediate mit fibrillärer amyloid-ähnlicher Struktur, wie sie auch schon von anderen Autoren beobachtet wurden (Poirier et al., 2002).

4.3. Die Modulation der Aggregation durch TRiC

Die Aufgabe molekularer Chaperone in der Zelle ist es, Fehlfaltung und Aggregation neu synthetisierter oder denaturierter Proteine zur verhindern (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Daher ist es nicht verwunderlich, dass sie auch in die amyloide Aggregation modulierend eingreifen können. Für verschiedene Chaperone wurde neuroprotektive Wirkung gezeigt, die auf verschiedenen Mechanismen beruhen kann (siehe Kapitel 1.4.). Ich möchte mich hier auf die Rolle von Chaperonen in der Modulation der Aggregation beschränken. Neuroprotektion korreliert nicht immer mit einer Verhinderung der Bildung mikroskopisch sichtbarer Einschlüsse. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich zwar nicht das lichtmikroskopisch sichtbare Erscheinungsbild der Aggregate ändert, wohl aber deren biochemische und morphologische Eigenschaften (Muchowski et al., 2000). So verhinderte Hsp70 in Kombination mit Hsp40 die Ausbildung amyloid-ähnlicher Fibrillen, stattdessen wurden ungeordnete amorphe Einschlüsse beobachtet, die nicht SDS-resistent sind. Hsp70/40 verhinderten dabei die Bildung eines Nukleationskeimes und damit die Akkumulation von

potentiell toxischen Aggregationsintermediaten, die während der weiteren Aggregation entstehen würden (Schaffar et al., 2004).

Andere in der Zelle vorhandenen Chaperone könnten ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die Aggregation ausüben. Durch einen RNA-*interference screen* in *C. elegans* wurde TRiC als potentieller Modulator der Htt-Aggregation identifiziert. Herunterregulation einzelner TRiC-Untereinheiten resultierte in verstärkter Aggregation (Nollen et al., 2004). In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der TRiC-vermittelten Modulation der Htt-Aggregation eingehend untersucht.

4.3.1. Direkte Interaktion von TRiC mit Huntingtin

Der zuerst in *C.elegans* entdeckte Effekt, dass die Htt-Aggregation durch Herunterregulation einzelner TRiC-Untereinheiten verstärkt wird (Nollen et al., 2004), wurde in einem Hefe-Modell mit defizientem TRiC (tcp1-2) bestätigt (Behrends et al., 2006). Auch in zwei kürzlich erschienenen Publikationen wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet (Kitamura et al., 2006; Tam et al., 2006). Überexpression aller acht Untereinheiten von TRiC hingegen inhibierte die Aggregation in Hefe (Behrends et al., 2006) und in Zellkultur (Kitamura et al., 2006).

Die direkte Rolle von TRiC in der Modulation der Htt-Aggregation wurde mit Hilfe gereinigter Komponenten *in vitro* untersucht. TRiC verhinderte die Bildung großer, SDS-resistenter Aggregate in konzentrationsabhängiger Weise. Dabei waren auch substöchiometrische Mengen an TRiC effektiv. Dies wurde ebenfalls von Tam et al. beobachtet (Tam et al., 2006). TRiC verminderte jedoch nicht die Gesamtmenge an pelletierbarem Material, vielmehr veränderte es dessen Morphologie. Im Elektronenmikroskop wurden kurze, dünne fibrilläre Strukturen detektiert, deren Länge von der eingesetzten TRiC-Konzentration abhängig ist. Wegen ihrer fibrillären Morphologie sind diese Strukturen SDS-unlöslich, können aber aufgrund ihrer geringen Größe nicht oder nur teilweise im Filter-Retardations-Assay zurückgehalten werden.

TRiC hatte keinen Einfluss auf die frühe Phase der Aggregation, weder auf die Kompaktion im Monomer, gemessen durch intramolekularen FRET, noch auf die Dimerisierung oder frühe Oligomerisierung, gemessen durch den umgebungssensitiven Farbstoff IAEDANS. Auch in konfokalen Einzelmolekülmessungen, die durch FIDA-Analyse interpretiert wurden, hatte TRiC keinen Effekt auf die frühe Phase, sondern blockierte

stattdessen die Elongation der Fibrillen. Dabei war TRiC auch noch effektiv, wenn es erst zu späteren Zeitpunkten in die Aggregationsreaktion gegeben wurde. Offensichtlich wirkt TRiC also anders als Hsp70 und Hsp40, die die intramolekulare Kompaktion im Monomer inhibieren. Ähnliche Ergebnisse erhielt auch Tam et al.: In einem Filter-Retardations-Assay war TRiC im Gegensatz zu Hsp70 auch bei späterer Zugabe (hier nach 2 h) effektiv. Reife Aggregate konnten durch TRiC jedoch nicht aufgelöst werden (Tam et al., 2006). Durch SIFT-Analyse wurde nachgewiesen, dass TRiC mit Htt53Q-Oligomeren verschiedener Größe interagiert.

Die Interaktion von TRiC mit Htt53Q war in Abwesenheit von ATP genauso ausgeprägt wie in Anwesenheit von ATP und ATP-regenerierendem System. ADP und AMP-PNP verstärkten den Effekt sogar leicht. Dies ist konsistent mit dem vorgeschlagenen Reaktionsmechansimus für TRiC, nach dem erst ATP-Hydrolyse Schließen der Kammer bewirkt (Spiess et al., 2004). ADP und AMP-PNP würden somit den Akzeptor-Status von TRiC stabilisieren, während TRiC in Anwesenheit von ATP zwischen seinen verschiedenen Konformationen wechselt. Die Daten sprechen für eine sehr transiente Interaktion ohne Einschließen des Substrats in der Kammer und aktive Faltung. Für eine sehr transiente Interaktion spricht auch, dass keine Komplexe zwischen gereinigtem TRiC und gereinigtem Htt53Q coimmunopräzipitiert werden konnten.

Hsp70 und Hsp40 können in Aggregate rekrutiert und damit aus dem Pool an löslichem Hsp70 und Hsp40 entfernt werden. Zwar wurde in letzter Zeit gezeigt, dass sie nicht irreversibel eingeschlossen werden, sondern im dynamischen Gleichgewicht stehen (Kim et al., 2002), doch die Tatsache, dass Hsp70 und Hsp40 auch in Polyglutamineinschlüssen in *post mortem*-Gehirnen nachgewiesen wurden (Cummings et al., 1998), legt eine Beteiligung am Krankheitsverlauf nahe. TRiC dagegen befindet sich *in vitro* ausschließlich in der löslichen Fraktion. *In vivo* konnte Rekrutierung von TRiC in Aggregate beobachtet werden, allerdings ist der größte Teil (75%) löslich (Behrends et al., 2006). Auch Kitamura et al. stellten keine Änderung der Lokalisation von TRiC fest (Kitamura et al., 2006). Depletierung von TRiC dürfte somit keine herausragende Rolle für die Toxizität spielen.

4.3.2. Kooperativer Effekt verschiedener Chaperon-Systeme

In der Zelle kooperieren die verschiedenen Chaperonsysteme bei der *de novo*-Faltung von Proteinen und bilden dabei ein funktionelles Netzwerk (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kooperativität auch bei der Modulation der Htt-Aggregation eine Rolle spielt. Kombinierter Einsatz von TRiC, Hsp70 und Hsp40 erhöhte die Htt53Q-Löslichkeit. Dieser *in vitro*-Befund wurde durch *in vivo*-Daten bestätigt. So wurde eine Erhöhung der Htt-Löslichkeit bei Überexpression aller acht TRiC-Untereinheiten in Wildtyp-Hefe-Zellen, die endogenes Hsp70 und Hsp40 beinhalten, beobachtet, nicht jedoch in ssa1Δ/ssa2Δ-Stämmen mit reduzierter Menge an cytosolischem Hsp70 der Ssa-Klasse. Für die Erhöhung der Löslichkeit sind somit beide Chaperonsysteme verantwortlich. Interessanterweise konnte Überexpression von TRiC in ssb1Δ/ssb2Δ-Stämmen mit reduzierter Menge an ribosomenassoziiertem Hsp70 die Htt-Löslichkeit erhöhen, es sind also nur die kanonischen Hsp-Proteine für die Aggregationsinhibition verantwortlich. Diese Hypothese wird unterstützt durch einen Befund von Tam et al., wonach Htt sowohl mit Ssa als auch mit TRiC coimmunopräzipitiert werden konnte, nicht jedoch mit Ssb (Tam et al., 2006). In diesem Fall war Coimmunopräzipitation möglich, da statt gereinigten Komponenten Hefe-Cytosol verwendet wurde, in dem sämtliche Chaperonsysteme vorhanden waren. Die spezifische kooperative Interaktion scheint also wesentlich stabiler zu sein als die unspezifischere von TRiC mit Htt in Abwesenheit von sonstigen Chaperonen.

Für die Unterdrückung der Aggregation war die Expression aller acht TRiC-Untereinheiten notwendig. Überexpression von Kombinationen einzelner Untereinheiten oder des bakteriellen Chaperonin GroEL konnte die Aggregation nicht inhibieren. Zwar wurde in einer anderen Studie veröffentlicht, dass einzelne TRiC-Untereinheiten (CCT1 und CCT4) ausreichend für die Modulation der Aggregation sind (Tam et al., 2006). In Immunfluoreszenz-Aufnahmen beobachteten die Autoren statt eines großen singulären Aggregats mehrere kleinere Foci, ein ähnlicher Effekt wurde durch Überexpression des Hsp70-Homologs Ssa1 erzielt. Möglicherweise handelt es sich hier also um einen zusätzlichen Effekt, der der Aggregationsmodulation durch Hsp70 ähnelt, und nicht um den spezifischen TRiC-Effekt in Kooperation mit anderen Chaperonsystemen.

Gelfiltrationsanalyse *in vitro* und *in vivo* zeigte, dass durch Einwirkung von TRiC, Hsp70 und Hsp40 ein stabiles, lösliches Produkt von 400-500 kDa generiert wird, das nicht an Chaperone gebunden ist. Seine SDS-Löslichkeit spricht dafür, dass es ein nichtfibrilläres

Oligomer ist. *In vivo*-Experimente zeigten, dass es nicht toxisch ist und nicht mit einem Antikörper (A11) (Kayed et al., 2003) reagiert, der spezifisch für intermediäre amyloidogene Oligomere ist (Behrends et al., 2006). Das durch kooperative Interaktion mit TRiC, Hsp70 und Hsp40 generierte Produkt besitzt also eine völlig neue Konformation. Dies zeigte auch die Analyse des löslichen Oligomers durch einen umgebungssensitiven Farbstoff. Der Fluorophor ist deutlich exponiert, das Protein liegt damit in einer bisher nicht beobachteten Konformation vor.

Die Generierung des ~500 kDa-Produkts findet nur statt, wenn sowohl TRiC als auch Hsp70 und Hsp40 vorhanden sind. Unter Einwirkung von Hsp70 und Hsp40 alleine wird ein Produkt generiert, das teilweise mit Hsp70 überlappt, mit TRiC alleine wird fast kein lösliches Material erhalten. Es handelt sich somit nicht um einen additiven, sondern einen kooperativen Effekt.

Im Gegensatz zur Interaktion von gereinigtem TRiC mit Htt-Oligomeren, die ATP-unabhängig ist, ist die kooperative Interaktion von TRiC, Hsp70 und Hsp40 mit Generierung des löslichen ~500 kDa-Produkts ATP-abhängig. Man kann daraus einen spezifischeren Faltungsmechanismus folgern. Auch die Tatsache, dass *in vivo* der vollständige TRiC-Komplex benötigt wird und das bakterielle Klasse I-Chaperonin GroEL nicht den gleichen Effekt zeigt, impliziert einen für TRiC spezifischen aktiven Faltungsmechanismus mit Enkapsulierung des Substrats.

Die Interaktion von Hsp70/Hsp40 und TRiC mit Htt ist sequentiell, Hsp70/Hsp40 stabilisieren Htt in einer Konformation, die von TRiC erkannt wird und weiter in eine nicht-toxische Konformation gefalten wird. Dies ähnelt der Situation in der *de novo*-Proteinfaltung. Auch hier stabilisieren Hsp70/Hsp40 eine Konformation, die für eine Interaktion mit TRiC geeignet ist.

Die kooperative und sequentielle Interaktion von Hsp70/Hsp40 und TRiC verhindert die intramolekulare Kompaktion, die die Nukleation der Aggregationsreaktion darstellt. Als Folge davon wird auch eine Akkumulation potentiell toxischer Intermediate der Aggregations-reaktion effizient verhindert.

4.3.3. Modell für die Modulation der Aggregation durch Chaperone

Aus den Daten konnte folgendes Modell abgeleitet werden: (i) In Abwesenheit von Chaperonen macht das unstrukturierte Htt-Monomer nach seiner Freisetzung durch proteolytische Abspaltung eine intramolekulare Konformationsänderung durch. Dies entspricht der Nukleation der Aggregation. Das β-strukturierte Monomer oligomerisiert im weiteren Verlauf, gefolgt von der Bildung langer Fibrillen. TRiC kann das Fibrillenwachstum inhibieren, nicht aber die Anhäufung potentiell toxischer Intermediate verhindern. (ii) In Anwesenheit von Hsp70/40 wird die intramolekulare Kompaktion verhindert. Stattdessen wird ein Reaktionspfad eingeschlagen, der in der Bildung amorpher Aggregate endet. (iii) In Anwesenheit von Hsp70/40 und TRiC interagieren beide Chaperone mit dem Htt-Monomer. Dabei wirken sie sequentiell, wie es auch dem natürlichen Mechanismus der Chaperone in der *de novo*-Faltung von Proteinen entspricht. Das durch Hsp70/40 generierte monomere Produkt ist dabei Substrat für TRiC, das das Htt-Monomer aktiv faltet. Daraus resultiert ein stabiles, lösliches, nicht-fibrilläres, oligomeres Produkt von ~500 kDa. *In vivo* wurde nachgewiesen, dass es nicht toxisch ist und nicht von einem Antikörper erkannt wird, der spezifisch ist für intermediäre amyloidogene Oligomere. Die durch kombinierte kooperative Interaktion generierte Spezies stellt also ein nicht-toxisches Endprodukt einer Faltungsreaktion dar.

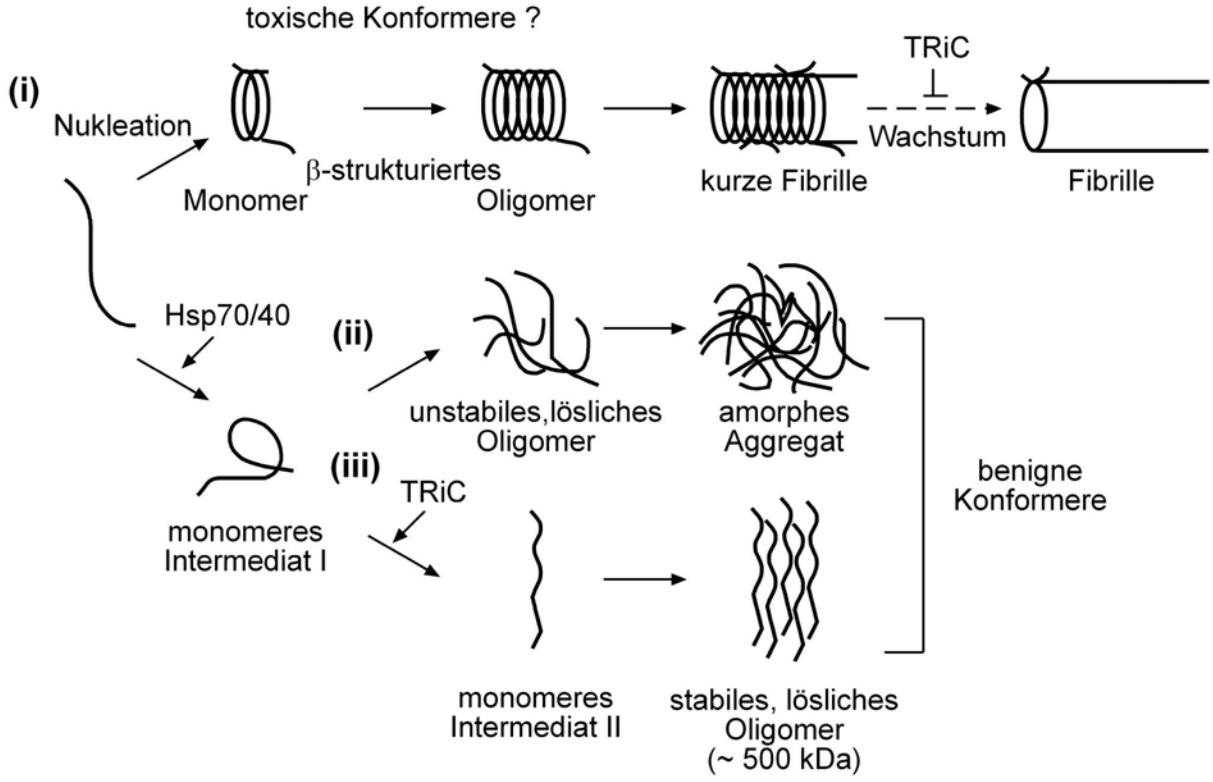

Abb. 4-1: Modell für den Einfluss von Chaperonen auf die Huntingtin-Aggregation. Erklärungen im Text.

Kooperative und sequentielle Interaktion von Hsp70/Hsp40 und TRiC stellen möglicherweise ein physiologisch relevantes System zur Verhinderung der amyloiden oder amyloid-ähnlichen Aggregation dar. Der Mechanismus der Interaktion von Hsp70/Hsp40 und TRiC mit Htt ähnelt dem Mechanismus der *de novo*-Proteinfaltung. Zu den cytosolischen TRiC-Substraten zählen u.a. der Von-Hippel-Lindau Tumorsuppressor (VHL), Cdc20 und einige WD40-Proteine (Spiess et al., 2004). Gemeinsam ist den verschiedenen Substratproteinen, dass sie Komponenten größerer oligomerer Komplexe sind. Dies könnte auch eine Rolle in der Interaktion mit Htt spielen. Das neue „gefaltete" Htt-Monomer-Produkt assembliert ebenfalls in einen höhermolekularen oligomeren Komplex, möglicherweise ist dieser Prozess streng reguliert und resultiert daher in einer relativ homogenen oligomeren Spezies. Die TRiC-Substrate besitzen keine offensichtlichen Ähnlichkeiten in der Struktur, außer den WD40-Proteinen, die β-Propeller-Strukturen ausbilden. Daher wurde für TRiC eine Rolle in der Faltung von β-Faltblättern postuliert. TRiC bindet spezifisch hydrophobe β-Stränge z.B. in VHL (Feldman et al., 2003) und in Gβ, einem WD40-Protein (Kubota et al., 2006). Die Rolle in der Faltung von β-Faltblättern verknüpft TRiC auch mit Htt, da dieses ebenfalls ungefaltete β-Struktur-Elemente enthält. Ob das Endprodukt der Interaktion mit TRiC, das „gefaltete" Htt-Oligomer, β-Struktur-Anteile enthält, muss allerdings noch untersucht werden. In diesem Falle wären die β-Struktur-Elemente aber verschieden von den amyloiden Kreuz-β-Strukturen. Dass die Bildung des ~500 kDa-Produkts nur mit TRiC und nicht mit GroEL/ES stattfindet, deutet auf eine spezifische Interaktion von TRiC mit dem von Hsp70/40 vorgeformten Htt-Monomer hin. Während GroEL hydrophobe Sequenzen erkennt, ist die Substraterkennung durch TRiC spezifischer (Spiess et al., 2006). Htt ist also möglicherweise ein natürliches Substrat. Dies könnte auch für Htt mit nichtexpandierter Polyglutaminsequenz gelten, es konnte jedenfalls eine direkte Interaktion von TRiC mit nichtexpandiertem Htt gezeigt werden (Tam et al., 2006).

4.3.4. Vorhandensein mehrerer oligomerer Spezies

In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein mehrerer oligomerer Spezies bestätigt. Durch Gelfiltrationsanalyse, FRET, umgebungssensitive Fluorophore und durch Immunreaktivität mit spezifischen Antikörpern (Behrends et al., 2006) wurden verschiedene Spezies identifiziert. Ein ~200 kDa-Oligomer ist assoziiert mit Cytotoxizität. Da das Oligomer mit dem A11-Antikörper reagiert, ähnelt es wahrscheinlich intermediären präfibrillären Formen

anderer amyloidogener Proteine. Das ~500 kDa-Oligomer, das durch Einwirkung der Chaperone generiert wird, ist nicht toxisch und nicht reaktiv mit dem A11-Antikörper, d.h. die Polyglutaminsequenz liegt in einer anderen Konformation vor, die nicht zu Aggregation führt und offensichtlich auch nicht zu aberranten Interaktionen mit zellulären Proteinen. Das Vorhandensein verschiedener Spezies mit unterschiedlichen Eigenschaften und unterschiedlicher Toxizität, die entweder *on pathway* oder *off pathway* in der Aggregationsreaktion sind, macht deutlich, dass Aggregation und Inhibition der Aggregation innerhalb der Zelle komplexe Prozesse sind. Hemmung einzelner Schritte beispielsweise durch potentielle Inhibitoren könnte ungewollt toxische Spezies anhäufen oder alternative Reaktionspfade eröffnen. Daher ist es notwendig, den Aggregationsprozess in seiner Komplexität vollständig zu begreifen.

4.3.5. Ausblick

Die kooperative Interaktion von Hsp70/Hsp40 und TRiC mit Htt könnte also kritisch sein für die Prävention der Htt-Aggregation. Eine altersbedingte Deregulation der Hsp-Chaperone (Heydari et al., 1994) könnte demnach zumindest zum Teil den späten Ausbruch der Erkrankung erklären. Während im jungen Menschen die Kapazität des Stressprotein-Netzwerkes ausreicht, um die Menge an toxischen Spezies relativ gering zu halten, könnte die erniedrigte Expression der Hitzeschockproteine zu einer verstärkten Anhäufung von toxischen fehlgefalteten oder aggregierten Spezies führen. Durch Rekrutierung von Hsp-Chaperonen würde deren verfügbare Menge zusätzlich herabgesetzt. Um diesen altersbedingten Effekt auszugleichen und da Überexpression von Chaperonen eine neuroprotektive Wirkung hat, könnte es sinnvoll sein, durch Stimulierung der Hitzeschock-Antwort (*heat shock response*) zusätzlich Chaperone zur Verfügung zu stellen. So kann aktives HSF1, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression der Hitzeschockproteine reguliert, die Aggregatbildung unterdrücken (Fujimoto et al., 2005). Modulatoren der Hitzeschock-Antwort kämen also durchaus für therapeutische Zwecke in Frage (Westerheide and Morimoto, 2005). Geldanamycin, ein Aktivator der Hitzeschock-Antwort, kann die α-Synuclein-Toxizität in Drosophila unterdrücken (Auluck et al., 2002; Auluck et al., 2005). Geldanamycin inhibiert auch die Htt-Aggregation durch Induktion der Expression von Hsp40, Hsp70 und Hsp90 (Sittler et al., 2001). Die chemische Aktivierung der Hitzeschock-Antwort scheint also ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass das Chaperonin TRiC eine essentielle Rolle in der Prävention der Aggregation einnimmt, und dabei der limitierende Faktor ist. Da TRiC HSF1-unabhängig ist (Albanese et al., 2006), erscheint jedoch eine Stimulation der Expression schwierig, eine Erhöhung der TRiC-Level wäre aber wahrscheinlich durchaus von Vorteil für die Verzögerung der Erkrankung. Potentielle Aktivatoren der TRiC-Expression wären ein vielversprechender therapeutischer Ansatz.

Möglicherweise spielt TRiC ebenso wie andere Chaperone eine Rolle in anderen neurodegenerativen Erkrankungen. Die im Zusammenhang mit der Htt-Aggregation gewonnenen Erkenntnisse könnten also auch für andere neurodegenerative Erkrankungen von Bedeutung sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Polyglutaminerkrankungen sind neurodegenerative Erkrankungen mit fatalem Verlauf, die sich durch selektive neuronale Degeneration und die Bildung intrazellulärer Aggregate auszeichnen. Verursacht werden sie durch eine Expansion einer Polyglutaminsequenz in einem für die Erkrankung spezifischen Protein, die Fehlfaltung und Aggregation des entsprechenden Proteins bewirkt. Die Aggregation wirkt dabei neurotoxisch, wobei Toxizität hauptsächlich durch lösliche Intermediate des Aggregationsprozesses vermittelt wird.

Zur Untersuchung der frühen Aggregationsphase und der späteren Elongationsphase wurden in dieser Arbeit verschiedene fluoreszenzbasierte Methoden etabliert. Mit Hilfe dieser Methoden konnte gezeigt werden, dass nach proteolytischer Spaltung von GST-Htt-Exon1 das Monomer eine Konformationsumlagerung durchmacht, die von einer Dimerisierung oder Oligomerisierung gefolgt wird. Dimere oder Oligomere bilden dabei eine kompakte Struktur aus. Wachstum der Fibrillen erfolgt durch Anlagerung von Monomeren oder einer anderen bisher nicht identifizierten Spezies. Durch Distanzmessungen innerhalb verschiedener Spezies konnte gezeigt werden, dass unlösliche Spezies eine kompakte Struktur aufweisen, die spezifisch für unlösliche Spezies ist. Lösliche Spezies liegen dagegen in einer expandierteren Konformation vor.

Molekulare Chaperone üben oftmals eine protektive Funktion auf Neuronen in neurodegenerativen Erkrankungen aus. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit das eukaryontische Chaperonin TRiC, das in einem RNA-*interference screen* als potentieller Suppressor der Huntingtin-Aggregation identifiziert wurde, Aggregation modulieren kann.

Gereinigtes TRiC hat keinen Einfluss auf die frühe Phase der Htt-Exon1-Aggregation, vielmehr inhibiert es die Elongation von fibrillären Strukturen, indem es mit Htt-Exon1-Oligomeren interagiert. Diese Interaktion ist transient und ATP-unabhängig. Im Gegensatz dazu interagiert TRiC in Kooperation mit dem Hsp70/40-System mit Htt-Exon1-Monomeren und verhindert die Nukleation der Aggregation. Stattdessen wird ein „gefaltetes“ Htt-Exon1-Produkt mit einer neuartigen Konformation gebildet, das löslich, nicht-fibrillär und nicht-toxisch ist und ~500 kDa-Oligomere ausbildet. Diese Interaktion ist kooperativ, sequentiell und benötigt ATP, ähnelt also der kooperativen Interaktion von TRiC und Hsp70/40 in der *de novo*-Proteinfaltung und stellt möglicherweise einen natürlichen Faltungsweg für Huntingtin dar.

6. LITERATUR

The Huntington's Disease Collaborative Research Group Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Pagoulatos, G., Angelidis, C., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G. (2003). Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. J Neurosci *23*, 2203-2211.

Albanese, V., Yam, A. Y., Baughman, J., Parnot, C., and Frydman, J. (2006). Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. Cell *124*, 75-88.

Altschuler, E. L., Hud, N. V., Mazrimas, J. A., and Rupp, B. (1997). Random coil conformation for extended polyglutamine stretches in aqueous soluble monomeric peptides. J Pept Res *50*, 73-75.

Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Barnes, G., Bates, G. P., Lin, C. S., Srinidhi, J., Baxendale, S., Hummerich, H., Lehrach, H., Altherr, M., and 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.

Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M. A., and et al. (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. Nat Genet *4*, 398-403.

Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. Science *181*, 223-230.

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.

Auluck, P. K., Chan, H. Y., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., and Bonini, N. M. (2002). Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. Science *295*, 865-868.

Auluck, P. K., Meulener, M. C., and Bonini, N. M. (2005). Mechanisms of Suppression of {alpha}-Synuclein Neurotoxicity by Geldanamycin in Drosophila. J Biol Chem *280*, 2873-2878.

Barral, J. M., Broadley, S. A., Schaffar, G., and Hartl, F. U. (2004). Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. Semin Cell Dev Biol *15*, 17-29.

Beatrix, B., Sakai, H., and Wiedmann, M. (2000). The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. J Biol Chem *275*, 37838-37845.

Becher, M. W., Kotzuk, 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 pallidoluysian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. Neurobiol Dis *4*, 387-397.

Behrends, C., Langer, C. A., Boteva, R., Bottcher, U. M., Stemp, M. J., Schaffar, G., Rao, B. V., Giese, A., Kretzschmar, H., Siegers, K., and Hartl, F. U. (2006). Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers. Mol Cell *23*, 887-897.

Bence, N. F., Sampat, R. M., and Kopito, R. R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. Science *292*, 1552-1555.

Ben-Zvi, A. P., and Goloubinoff, P. (2001). Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. J Struct Biol *135*, 84-93.

Berthelier, V., Hamilton, J. B., Chen, S., and Wetzel, R. (2001). A microtiter plate assay for polyglutamine aggregate extension. Anal Biochem *295*, 227-236.

Bevivino, A. E., and Loll, P. J. (2001). An expanded glutamine repeat destabilizes native ataxin-3 structure and mediates formation of parallel beta -fibrils. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 11955-11960.

Bhattacharyya, A., Thakur, A. K., Chellgren, V. M., Thiagarajan, G., Williams, A. D., Chellgren, B. W., Creamer, T. P., and Wetzel, R. (2006). Oligoproline effects on polyglutamine conformation and aggregation. J Mol Biol *355*, 524-535.

Bieschke, J., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Poser, S., Eigen, M., and Kretzschmar, H. (2000). Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 5468-5473.

Blaha, G., Wilson, D. N., Stoller, G., Fischer, G., Willumeit, R., and Nierhaus, K. H. (2003). Localization of the trigger factor binding site on the ribosomal 50S subunit. J Mol Biol *326*, 887-897.

Bouchard, M., Zurdo, J., Nettleton, E. J., Dobson, C. M., and Robinson, C. V. (2000). Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. Protein Sci *9*, 1960-1967.

Boutell, J. M., Wood, J. D., Harper, P. S., and Jones, A. L. (1998). Huntingtin interacts with cystathionine beta-synthase. Hum Mol Genet *7*, 371-378.

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.

Brinker, A., Pfeifer, G., Kerner, M. J., Naylor, D. J., Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2001). Dual function of protein confinement in chaperonin-assisted protein folding. Cell *107*, 223-233.

Bucciantini, M., Calloni, G., Chiti, F., Formigli, L., Nosi, D., Dobson, C. M., and Stefani, M. (2004). Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. J Biol Chem *279*, 31374-31382.

Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., and Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. Nature *416*, 507-511.

Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. Trends Biochem Sci *24*, 136-141.

Bukau, B., and Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell *92*, 351-366.

Burke, J. R., Enghild, J. J., Martin, M. E., Jou, Y. S., Myers, R. M., Roses, A. D., Vance, J. M., and Strittmatter, W. J. (1996). Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. Nat Med *2*, 347-350.

Camasses, A., Bogdanova, A., Shevchenko, A., and Zachariae, W. (2003). The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20. Mol Cell *12*, 87-100.

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.

Cattaneo, E., Zuccato, C., and Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. Nat Rev Neurosci *6*, 919-930.

Caughey, B., and Lansbury, P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. Annu Rev Neurosci *26*, 267-298.

Chai, Y., Koppenhafer, S. L., Bonini, N. M., and Paulson, H. L. (1999a). Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. J Neurosci *19*, 10338-10347.

Chai, Y., Koppenhafer, S. L., Shoesmith, S. J., Perez, M. K., and Paulson, H. L. (1999b). Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. Hum Mol Genet *8*, 673-682.

Chai, Y., Shao, J., Miller, V. M., Williams, A., and Paulson, H. L. (2002). Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 9310-9315.

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, S., Berthelier, V., Hamilton, J. B., O'Nuallain, B., and Wetzel, R. (2002a). Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. Biochemistry *41*, 7391-7399.

Chen, S., Berthelier, V., Yang, W., and Wetzel, R. (2001). Polyglutamine aggregation behavior in vitro supports a recruitment mechanism of cytotoxicity. J Mol Biol *311*, 173-182.

Chen, S., Ferrone, F. A., and Wetzel, R. (2002b). Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 11884-11889.

Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annu Rev Biochem *75*, 333-366.

Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (1999). Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 3590-3594.

Clark, J. I., and Muchowski, P. J. (2000). Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. Curr Opin Struct Biol *10*, 52-59.

Cohen, A. S., and Calkins, E. (1959). Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. Nature *183*, 1202-1203.

Cooper, J. K., Schilling, G., Peters, M. F., Herring, W. J., Sharp, A. H., Kaminsky, Z., Masone, J., Khan, F. A., Delanoy, M., Borchelt, D. R., *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.

Cornett, J., Cao, F., Wang, C. E., Ross, C. A., Bates, G. P., Li, S. H., and Li, X. J. (2005). Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export. Nat Genet *37*, 198-204.

Cummings, C. J., Mancini, M. A., Antalffy, B., DeFranco, D. B., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (1998). Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. Nat Genet *19*, 148-154.

Cummings, C. J., Reinstein, E., Sun, Y., Antalffy, B., Jiang, Y., Ciechanover, A., Orr, H. T., Beaudet, A. L., and Zoghbi, H. Y. (1999). Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. Neuron *24*, 879-892.

Cummings, C. J., Sun, Y., Opal, P., Antalffy, B., Mestril, R., Orr, H. T., Dillmann, W. H., and Zoghbi, H. Y. (2001). Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. Hum Mol Genet *10*, 1511-1518.

Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., Scherzinger, E., Wanker, E. E., Mangiarini, L., and Bates, G. P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. Cell *90*, 537-548.

Dehay, B., and Bertolotti, A. (2006). Critical role of the proline-rich region in Huntingtin for aggregation and cytotoxicity in yeast. J Biol Chem *281*, 35608-35615.

Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A., and Bukau, B. (1999). Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. Nature *400*, 693-696.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J. P., Carraway, R., Reeves, S. A., and 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.

Dill, K. A., and Chan, H. S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. Nat Struct Biol *4*, 10-19.

Ding, T. T., Lee, S. J., Rochet, J. C., and Lansbury, P. T., Jr. (2002). Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. Biochemistry *41*, 10209-10217.

Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Stetter, K. O., Huber, H., Huber, R., and Steinbacher, S. (1998). Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. Cell *93*, 125-138.

Dobson, C. M., and Karplus, M. (1999). The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. Curr Opin Struct Biol *9*, 92-101.

Dragovic, Z., Broadley, S. A., Shomura, Y., Bracher, A., and Hartl, F. U. (2006). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. Embo J *25*, 2519-2528.

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.

Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., Folstein, S., Ross, C., Franz, M., Abbott, M., and 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., Persichetti, F., Barnes, G. T., McNeil, S. M., Ge, P., Vonsattel, J. P., Gusella, J. F., Joyner, A. L., and et al. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. Science *269*, 407-410.

Eanes, E. D., and Glenner, G. G. (1968). X-ray diffraction studies on amyloid filaments. J Histochem Cytochem *16*, 673-677.

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.

Etchells, S. A., Meyer, A. S., Yam, A. Y., Roobol, A., Miao, Y., Shao, Y., Carden, M. J., Skach, W. R., Frydman, J., and Johnson, A. E. (2005). The cotranslational contacts between ribosome-bound nascent polypeptides and the subunits of the hetero-oligomeric chaperonin TRiC probed by photocross-linking. J Biol Chem *280*, 28118-28126.

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.

Feldman, D. E., Spiess, C., Howard, D. E., and Frydman, J. (2003). Tumorigenic mutations in VHL disrupt folding in vivo by interfering with chaperonin binding. Mol Cell *12*, 1213-1224.

Feldman, D. E., Thulasiraman, V., Ferreyra, R. G., and Frydman, J. (1999). Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. Mol Cell *4*, 1051-1061.

Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M. L., de Gouyon, B., She, W. C., Luchak, J. M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P. J., *et al.* (2000). Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. Nature *408*, 101-106.

Förster, T. (1965). In Modern Quantum Chemistry (New York, Academic Press), pp. 93-137.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Erdjument-Bromage, H., Wall, J. S., Tempst, P., and Hartl, F. U. (1992). Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. Embo J *11*, 4767-4778.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K., and Hartl, F. U. (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. Nature *370*, 111-117.

Fujimoto, M., Takaki, E., Hayashi, T., Kitaura, Y., Tanaka, Y., Inouye, S., and Nakai, A. (2005). Active HSF1 significantly suppresses polyglutamine aggregate formation in cellular and mouse models. J Biol Chem *280*, 34908-34916.

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.

Gao, Y., Thomas, J. O., Chow, R. L., Lee, G. H., and Cowan, N. J. (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. Cell *69*, 1043-1050.

Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelieres, F. P., De Mey, J., MacDonald, M. E., Lessmann, V., Humbert, S., and Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. Cell *118*, 127-138.

Geissler, S., Siegers, K., and Schiebel, E. (1998). A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. Embo J *17*, 952-966.

Giese, A., Bader, B., Bieschke, J., Schaffar, G., Odoy, S., Kahle, P. J., Haass, C., and Kretzschmar, H. (2005). Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation. Biochem Biophys Res Commun *333*, 1202-1210.

Glabe, C. C. (2005). Amyloid accumulation and pathogensis of Alzheimer's disease: significance of monomeric, oligomeric and fibrillar Abeta. Subcell Biochem *38*, 167-177.

Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem Biophys Res Commun *120*, 885-890.

Glover, J. R., and Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. Cell *94*, 73-82.

Goldberg, Y. P., Nicholson, D. W., Rasper, D. M., Kalchman, M. A., Koide, H. B., Graham, R. K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., and Hayden, M. R. (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. Nat Genet *13*, 442-449.

Goldsbury, C., Kistler, J., Aebi, U., Arvinte, T., and Cooper, G. J. (1999). Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy. J Mol Biol *285*, 33-39.

Grallath, S., Schwarz, J. P., Bottcher, U. M., Bracher, A., Hartl, F. U., and Siegers, K. (2006). L25 functions as a conserved ribosomal docking site shared by nascent chain-associated complex and signal-recognition particle. EMBO Rep *7*, 78-84.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., and Wisniewski, H. M. (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. J Biol Chem *261*, 6084-6089.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and Binder, L. I. (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc Natl Acad Sci U S A *83*, 4913-4917.

Guijarro, J. I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D., and Dobson, C. M. (1998). Amyloid fibril formation by an SH3 domain. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 4224-4228.

Gunawardena, S., Her, L. S., Brusch, 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., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M. R., Sakaguchi, A. Y., and et al. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. Nature *306*, 234-238.

Gutekunst, C. A., Li, S. H., Yi, H., Mulroy, J. S., Kuemmerle, S., Jones, R., Rye, D., Ferrante, R. J., Hersch, S. M., and Li, X. J. (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.

Hansson, O., Nylandsted, J., Castilho, R. F., Leist, M., Jaattela, M., and Brundin, P. (2003). Overexpression of heat shock protein 70 in R6/2 Huntington's disease mice has only modest effects on disease progression. Brain Res *970*, 47-57.

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, J. D., and Lansbury, P. T., Jr. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. Annu Rev Biochem *66*, 385-407.

Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M., and Lansbury, P. T. (1997). Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. Chem Biol *4*, 119-125.

Harrison, C. J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F., and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. Science *276*, 431-435.

Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science *295*, 1852-1858.

Haslbeck, M. (2002). sHsps and their role in the chaperone network. Cell Mol Life Sci *59*, 1649-1657.

Hesterkamp, T., Hauser, S., Lutcke, H., and Bukau, B. (1996). Escherichia coli trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 4437-4441.

Heydari, A. R., Takahashi, R., Gutsmann, A., You, S., and Richardson, A. (1994). Hsp70 and aging. Experientia *50*, 1092-1098.

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., *et al.* (2002). Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry. Nature *415*, 180-183.

Hodgson, J. G., Agopyan, N., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D. J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., *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.

Hohfeld, J., and Jentsch, S. (1997). GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. Embo J *16*, 6209-6216.

Hohfeld, J., Minami, Y., and Hartl, F. U. (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. Cell *83*, 589-598.

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.

Holmberg, M., Duyckaerts, C., Durr, A., Cancel, G., Gourfinkel-An, I., Damier, P., Faucheux, B., Trottier, Y., Hirsch, E. C., Agid, Y., and Brice, A. (1998). Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. Hum Mol Genet *7*, 913-918.

Huang, K., Yanai, A., Kang, R., Arstikaitis, P., Singaraja, R. R., Metzler, M., Mullard, A., Haigh, B., Gauthier-Campbell, C., Gutekunst, C. A., *et al.* (2004). Huntingtin-interacting protein HIP14 is a palmitoyl transferase involved in palmitoylation and trafficking of multiple neuronal proteins. Neuron *44*, 977-986.

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. Med Surg Rep *26*, 217-321.

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.

Jarrett, J. T., and Lansbury, P. T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? Cell *73*, 1055-1058.

Kabani, M., Beckerich, J. M., and Brodsky, J. L. (2002a). Nucleotide exchange factor for the yeast Hsp70 molecular chaperone Ssa1p. Mol Cell Biol *22*, 4677-4689.

Kabani, M., McLellan, C., Raynes, D. A., Guerriero, V., and Brodsky, J. L. (2002b). HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. FEBS Lett *531*, 339-342.

Kafri, G., and Horovitz, A. (2003). Transient kinetic analysis of ATP-induced allosteric transitions in the eukaryotic chaperonin containing TCP-1. J Mol Biol *326*, 981-987.

Kafri, G., Willison, K. R., and Horovitz, A. (2001). Nested allosteric interactions in the cytoplasmic chaperonin containing TCP-1. Protein Sci *10*, 445-449.

Kalchman, M. A., Graham, R. K., Xia, G., Koide, H. B., Hodgson, J. G., Graham, K. C., Goldberg, Y. P., Gietz, R. D., Pickart, C. M., and Hayden, M. R. (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., Graham, R. K., Nichol, K., Nishiyama, K., Kazemi-Esfarjani, P., Lynn, F. C., Wellington, C., Metzler, M., *et al.* (1997). HIP1, a human homologue of S. cerevisiae Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. Nat Genet *16*, 44-53.

Kask, P., Palo, K., Fay, N., Brand, L., Mets, U., Ullmann, D., Jungmann, J., Pschorr, J., and Gall, K. (2000). Two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis: theory and applications. Biophys J *78*, 1703-1713.

Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science *300*, 486-489.

Kazantsev, A., Preisinger, E., Dranovsky, A., Goldgaber, D., and Housman, D. (1999). Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 11404-11409.

Kazemi-Esfarjani, P., and Benzer, S. (2000). Genetic suppression of polyglutamine toxicity in Drosophila. Science *287*, 1837-1840.

Kim, S., Nollen, E. A., Kitagawa, K., Bindokas, V. P., and Morimoto, R. I. (2002). Polyglutamine protein aggregates are dynamic. Nat Cell Biol *4*, 826-831.

Kim, S., Willison, K. R., and Horwich, A. L. (1994). Cystosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. Trends Biochem Sci *19*, 543-548.

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.

Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., and Fujita, T. (2001). Initial process of polyglutamine aggregate formation in vivo. Genes Cells *6*, 887-897.

Kitamura, A., Kubota, H., Pack, C. G., Matsumoto, G., Hirayama, S., Takahashi, Y., Kimura, H., Kinjo, M., Morimoto, R. I., and Nagata, K. (2006). Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. Nat Cell Biol *8*, 1163-1170.

Klement, I. A., Skinner, P. J., Kaytor, M. D., Yi, H., Hersch, S. M., Clark, H. B., Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (1998). Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. Cell *95*, 41-53.

Klucken, J., Shin, Y., Masliah, E., Hyman, B. T., and McLean, P. J. (2004). Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. J Biol Chem *279*, 25497-25502.

Klunk, W. E., Pettegrew, J. W., and Abraham, D. J. (1989). Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. J Histochem Cytochem *37*, 1273-1281.

Kramer, G., Rauch, T., Rist, W., Vorderwulbecke, S., Patzelt, H., Schulze-Specking, A., Ban, N., Deuerling, E., and Bukau, B. (2002). L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. Nature *419*, 171-174.

Krobitsch, S., and Lindquist, S. (2000). Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 1589-1594.

Kubota, S., Kubota, H., and Nagata, K. (2006). Cytosolic chaperonin protects folding intermediates of Gbeta from aggregation by recognizing hydrophobic beta-strands. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 8360-8365.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., *et al.* (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 6448-6453.

Landwehrmeyer, G. B., McNeil, S. M., Dure, L. S. t., Ge, P., Aizawa, H., Huang, Q., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Bird, E. D., Bonilla, E., and et al. (1995). Huntington's disease gene: regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals. Ann Neurol *37*, 218-230.

Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K., and Hartl, F. U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. Nature *356*, 683-689.

Lansbury, P. T., Jr. (1999). Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 3342-3344.

Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T., and Lansbury, P. T., Jr. (2002). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. Nature *418*, 291.

Lathrop, R. H., Casale, M., Tobias, D. J., Marsh, J. L., and Thompson, L. M. (1998). Modeling protein homopolymeric repeats: possible polyglutamine structural motifs for Huntington's disease. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol *6*, 105-114.

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.

Leavitt, B. R., van Raamsdonk, J. M., Shehadeh, J., Fernandes, H., Murphy, Z., Graham, R. K., Wellington, C. L., Raymond, L. A., and Hayden, M. R. (2006). Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. J Neurochem *96*, 1121-1129.

Lee, S., Sowa, M. E., Watanabe, Y. H., Sigler, P. B., Chiu, W., Yoshida, M., and Tsai, F. T. (2003). The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. Cell *115*, 229-240.

Leroux, M. R., Fandrich, M., Klunker, D., Siegers, K., Lupas, A. N., Brown, J. R., Schiebel, E., Dobson, C. M., and Hartl, F. U. (1999). MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. Embo J *18*, 6730-6743.

Levinthal, C. (1969). In Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems. Proceedings of a meeting held at Allerton house, Monticello, Illinois, P. Debrunner, Tsibris,J., Munck,E., ed. (Urbana, Illinois, University of Illinois Press), pp. 22-24.

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, M., Miwa, S., Kobayashi, Y., Merry, D. E., Yamamoto, M., Tanaka, F., Doyu, M., Hashizume, Y., Fischbeck, K. H., and Sobue, G. (1998). Nuclear inclusions of the androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. Ann Neurol *44*, 249-254.

Li, S. H., Schilling, G., Young, W. S., 3rd, Li, X. J., Margolis, R. L., Stine, O. C., Wagster, M. V., Abbott, M. H., Franz, M. L., Ranen, N. G., and et al. (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. Neuron *11*, 985-993.

Li, X. J., Li, S. H., Sharp, A. H., Nucifora, F. C., Jr., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S. H., and Ross, C. A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. Nature *378*, 398-402.

Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C., and Zylicz, M. (1991). Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 2874-2878.

Llorca, O., Martin-Benito, J., Grantham, J., Ritco-Vonsovici, M., Willison, K. R., Carrascosa, J. L., and Valpuesta, J. M. (2001). The 'sequential allosteric ring' mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin. Embo J *20*, 4065-4075.

Llorca, O., Martin-Benito, J., Ritco-Vonsovici, M., Grantham, J., Hynes, G. M., Willison, K. R., Carrascosa, J. L., and Valpuesta, J. M. (2000). Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. Embo J *19*, 5971-5979.

Llorca, O., McCormack, E. A., Hynes, G., Grantham, J., Cordell, J., Carrascosa, J. L., Willison, K. R., Fernandez, J. J., and Valpuesta, J. M. (1999a). Eukaryotic type II chaperonin CCT interacts with actin through specific subunits. Nature *402*, 693-696.

Llorca, O., Smyth, M. G., Carrascosa, J. L., Willison, K. R., Radermacher, M., Steinbacher, S., and Valpuesta, J. M. (1999b). 3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals the asymmetric folding conformation of a type II chaperonin. Nat Struct Biol *6*, 639-642.

Lum, R., Tkach, J. M., Vierling, E., and Glover, J. R. (2004). Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by Saccharomyces cerevisiae Hsp104. J Biol Chem *279*, 29139-29146.

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.

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.

Luthi-Carter, R., Hanson, S. A., Strand, A. D., Bergstrom, D. A., Chun, W., Peters, N. L., Woods, A. M., Chan, E. Y., Kooperberg, C., Krainc, D., *et al.* (2002). Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. Hum Mol Genet *11*, 1911-1926.

Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N. L., Solano, S. M., Hollingsworth, Z. R., Menon, A. S., Frey, A. S., Spektor, B. S., Penney, E. B., Schilling, G., *et al.* (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. Hum Mol Genet *9*, 1259-1271.

Magrane, J., Smith, R. C., Walsh, K., and Querfurth, H. W. (2004). Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. J Neurosci *24*, 1700-1706.

Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trottier, Y., Lehrach, H., Davies, S. W., and Bates, G. P. (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.

Marchut, A. J., and Hall, C. K. (2006). Spontaneous formation of annular structures observed in molecular dynamics simulations of polyglutamine peptides. Comput Biol Chem *30*, 215-218.

Martindale, D., Hackam, A., Wieczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K., Singaraja, R., Kazemi-Esfarjani, P., Devon, R., Kim, S. U., *et al.* (1998). Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. Nat Genet *18*, 150-154.

Masino, L., Kelly, G., Leonard, K., Trottier, Y., and Pastore, A. (2002). Solution structure of polyglutamine tracts in GST-polyglutamine fusion proteins. FEBS Lett *513*, 267-272.

Masino, L., and Pastore, A. (2001). A structural approach to trinucleotide expansion diseases. Brain Res Bull *56*, 183-189.

Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A *82*, 4245-4249.

Matsumoto, G., Kim, S., and Morimoto, R. I. (2006). Huntingtin and mutant SOD1 form aggregate structures with distinct molecular properties in human cells. J Biol Chem *281*, 4477-4485.

Mayer, M. P., Schroder, H., Rudiger, S., Paal, K., Laufen, T., and Bukau, B. (2000). Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. Nat Struct Biol *7*, 586-593.

McCallum, C. D., Do, H., Johnson, A. E., and Frydman, J. (2000). The interaction of the chaperonin tailless complex polypeptide 1 (TCP1) ring complex (TRiC) with ribosome-bound nascent chains examined using photo-cross-linking. J Cell Biol *149*, 591-602.

McCampbell, A., Taylor, J. P., Taye, A. A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G., and Fischbeck, K. H. (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. Hum Mol Genet *9*, 2197-2202.

McCarty, J. S., Buchberger, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. J Mol Biol *249*, 126-137.

McLean, P. J., Kawamata, H., Shariff, S., Hewett, J., Sharma, N., Ueda, K., Breakefield, X. O., and Hyman, B. T. (2002). TorsinA and heat shock proteins act as molecular chaperones: suppression of alpha-synuclein aggregation. J Neurochem *83*, 846-854.

Melville, M. W., McClellan, A. J., Meyer, A. S., Darveau, A., and Frydman, J. (2003). The Hsp70 and TRiC/CCT chaperone systems cooperate in vivo to assemble the von Hippel-Lindau tumor suppressor complex. Mol Cell Biol *23*, 3141-3151.

Merlino, A., Esposito, L., and Vitagliano, L. (2006). Polyglutamine repeats and beta-helix structure: molecular dynamics study. Proteins *63*, 918-927.

Meyer, A. S., Gillespie, J. R., Walther, D., Millet, I. S., Doniach, S., and Frydman, J. (2003). Closing the folding chamber of the eukaryotic chaperonin requires the transition state of ATP hydrolysis. Cell *113*, 369-381.

Minton, A. P. (2000). Implications of macromolecular crowding for protein assembly. Curr Opin Struct Biol *10*, 34-39.

Monoi, H. (1995). New tubular single-stranded helix of poly-L-amino acids suggested by molecular mechanics calculations: I. Homopolypeptides in isolated environments. Biophys J *69*, 1130-1141.

Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. Annu Rev Neurosci *28*, 57-87.

Morimoto, R. I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. Science *259*, 1409-1410.

Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev *12*, 3788-3796.

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.

Muchowski, P. J., and Wacker, J. L. (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. Nat Rev Neurosci *6*, 11-22.

Nance, M. A., Mathias-Hagen, V., Breningstall, G., Wick, M. J., and McGlennen, R. C. (1999). Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. Neurology *52*, 392-394.

Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kusky, J. R., Diewert, V. M., Richman, J. M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J. D., Phillips, A. G., and Hayden, M. R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. Cell *81*, 811-823.

Nollen, E. A., Garcia, S. M., van Haaften, G., Kim, S., Chavez, A., Morimoto, R. I., and Plasterk, R. H. (2004). Genome-wide RNA interference screen identifies previously undescribed regulators of polyglutamine aggregation. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 6403-6408.

Nollen, E. A., Kabakov, A. E., Brunsting, J. F., Kanon, B., Hohfeld, J., and Kampinga, H. H. (2001). Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1. J Biol Chem *276*, 4677-4682.

Nucifora, F. C., Jr., Sasaki, M., Peters, M. F., Huang, H., Cooper, J. K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V. L., *et al.* (2001). Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. Science *291*, 2423-2428.

Obermann, W. M., Sondermann, H., Russo, A. A., Pavletich, N. P., and Hartl, F. U. (1998). In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. J Cell Biol *143*, 901-910.

O'Nuallain, B., and Wetzel, R. (2002). Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 1485-1490.

Ordway, J. M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C. A., Bernstein, E. M., Cearley, J. A., Wiener, H. W., Dure, L. S. t., Lindsey, R., Hersch, S. M., Jope, R. S., *et al.* (1997). Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. Cell *91*, 753-763.

Palo, K., Mets, U., Jager, S., Kask, P., and Gall, K. (2000). Fluorescence intensity multiple distributions analysis: concurrent determination of diffusion times and molecular brightness. Biophys J *79*, 2858-2866.

Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A., and Lindquist, S. (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. Nature *372*, 475-478.

Paulson, H. L., Perez, M. K., Trottier, Y., Trojanowski, J. Q., Subramony, S. H., Das, S. S., Vig, P., Mandel, J. L., Fischbeck, K. H., and Pittman, R. N. (1997). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. Neuron *19*, 333-344.

Pellecchia, M., Montgomery, D. L., Stevens, S. Y., Vander Kooi, C. W., Feng, H. P., Gierasch, L. M., and Zuiderweg, E. R. (2000). Structural insights into substrate binding by the molecular chaperone DnaK. Nat Struct Biol *7*, 298-303.

Perutz, M. F., Finch, J. T., Berriman, J., and Lesk, A. (2002). Amyloid fibers are water-filled nanotubes. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 5591-5595.

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.

Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B. A., Lopez-Buesa, P., Walter, W. A., Wiedmann, M., and Craig, E. A. (1998). The molecular chaperone Ssb from Saccharomyces cerevisiae is a component of the ribosome-nascent chain complex. Embo J *17*, 3981-3989.

Poirier, M. A., Jiang, H., and Ross, C. A. (2005). A structure-based analysis of huntingtin mutant polyglutamine aggregation and toxicity: evidence for a compact beta-sheet structure. Hum Mol Genet *14*, 765-774.

Poirier, M. A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M., and Ross, C. A. (2002). Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. J Biol Chem *277*, 41032-41037.

Puchtler, H., and Sweat, F. (1965). Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. J Histochem Cytochem *13*, 693-694.

Reddy, P. H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike-Buchanan, L., Whetsell, W. O., Jr., Miller, G., and Tagle, D. A. (1998). Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. Nat Genet *20*, 198-202.

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., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., Clementi, E., Hackam, A., Hayden, M. R., Li, Y., *et al.* (2000). Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. J Neurosci *20*, 3705-3713.

Rochet, J. C., and Lansbury, P. T., Jr. (2000). Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. Curr Opin Struct Biol *10*, 60-68.

Roseman, A. M., Chen, S., White, H., Braig, K., and Saibil, H. R. (1996). The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. Cell *87*, 241-251.

Ross, C. A., Poirier, M. A., Wanker, E. E., and Amzel, M. (2003). Polyglutamine fibrillogenesis: the pathway unfolds. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 1-3.

Rubinsztein, D. C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J. J., Chotai, K., Connarty, M., Crauford, D., Curtis, A., *et al.* (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. Am J Hum Genet *59*, 16-22.

Rudiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., and Bukau, B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. Embo J *16*, 1501-1507.

Rudiger, S., Schneider-Mergener, J., and Bukau, B. (2001). Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. Embo J *20*, 1042-1050.

Saibil, H. R., Zheng, D., Roseman, A. M., Hunter, A. S., Watson, G. M., Chen, S., Auf Der Mauer, A., O'Hara, B. P., Wood, S. P., Mann, N. H., *et al.* (1993). ATP induces large quaternary rearrangements in a cage-like chaperonin structure. Curr Biol *3*, 265-273.

Sakahira, H., Breuer, P., Hayer-Hartl, M. K., and Hartl, F. U. (2002). Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A *99 Suppl 4*, 16412-16418.

Sarafoff, N. I., Bieschke, J., Giese, A., Weber, P., Bertsch, U., and Kretzschmar, H. A. (2005). Automated PrPres amplification using indirect sonication. J Biochem Biophys Methods *63*, 213-221.

Sathasivam, K., Hobbs, C., Turmaine, M., Mangiarini, L., Mahal, A., Bertaux, F., Wanker, E. E., Doherty, P., Davies, S. W., and Bates, G. P. (1999). Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. Hum Mol Genet *8*, 813-822.

Satyal, S. H., Schmidt, E., Kitagawa, K., Sondheimer, N., Lindquist, S., Kramer, J. M., and Morimoto, R. I. (2000). Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in Caenorhabditis elegans. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 5750-5755.

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.

Schaffar, G. (2004). Inhibition der Polyglutamin-induzierten Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren durch molekulare Chaperone, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (Berlin, Mensch und Buch Verlag).

Schaffar, G., Breuer, P., Boteva, R., Behrends, C., Tzvetkov, N., Strippel, N., Sakahira, H., Siegers, K., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F. U. (2004). Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. Mol Cell *15*, 95-105.

Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G. P., Davies, S. W., Lehrach, H., and Wanker, E. E. (1997). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. Cell *90*, 549-558.

Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G. P., Lehrach, H., and Wanker, E. E. (1999). Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 4604-4609.

Schiene, C., and Fischer, G. (2000). Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. Curr Opin Struct Biol *10*, 40-45.

Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A., and Lindquist, S. (1996). HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. Trends Biochem Sci *21*, 289-296.

Schwille, P., Meyer-Almes, F. J., and Rigler, R. (1997). Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. Biophys J *72*, 1878-1886.

Serpell, L. C., Blake, C. C., and Fraser, P. E. (2000a). Molecular structure of a fibrillar Alzheimer's A beta fragment. Biochemistry *39*, 13269-13275.

Serpell, L. C., Sunde, M., Benson, M. D., Tennent, G. A., Pepys, M. B., and Fraser, P. E. (2000b). The protofilament substructure of amyloid fibrils. J Mol Biol *300*, 1033-1039.

Sha, B., Lee, S., and Cyr, D. M. (2000). The crystal structure of the peptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1. Structure *8*, 799-807.

Sharma, D., Sharma, S., Pasha, S., and Brahmachari, S. K. (1999). Peptide models for inherited neurodegenerative disorders: conformation and aggregation properties of long polyglutamine peptides with and without interruptions. FEBS Lett *456*, 181-185.

Sharma, D., Shinchuk, L. M., Inouye, H., Wetzel, R., and Kirschner, D. A. (2005). Polyglutamine homopolymers having 8-45 residues form slablike beta-crystallite assemblies. Proteins *61*, 398-411.

Sharp, A. H., Loev, S. J., Schilling, G., Li, S. H., Li, X. J., Bao, J., Wagster, M. V., Kotzuk, J. A., Steiner, J. P., Lo, A., and et al. (1995). Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. Neuron *14*, 1065-1074.

Shirahama, T., and Cohen, A. S. (1967). High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. J Cell Biol *33*, 679-708.

Siegers, K., Bolter, B., Schwarz, J. P., Bottcher, U. M., Guha, S., and Hartl, F. U. (2003). TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes. Embo J *22*, 5230-5240.

Siegert, R., Leroux, M. R., Scheufler, C., Hartl, F. U., and Moarefi, I. (2000). Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins. Cell *103*, 621-632.

Sikorski, P., and Atkins, E. (2005). New model for crystalline polyglutamine assemblies and their connection with amyloid fibrils. Biomacromolecules *6*, 425-432.

Sittler, A., Lurz, R., Lueder, G., Priller, J., Lehrach, H., Hayer-Hartl, M. K., Hartl, F. U., and Wanker, E. E. (2001). Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. Hum Mol Genet *10*, 1307-1315.

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 polygln-containing protein aggregates. Mol Cell *2*, 427-436.

Skinner, P. J., Koshy, B. T., Cummings, C. J., Klement, I. A., Helin, K., Servadio, A., Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (1997). Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. Nature *389*, 971-974.

Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E. J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. Trends Biochem Sci *24*, 181-185.

Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Hohfeld, J., Hartl, F. U., and Moarefi, I. (2001). Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. Science *291*, 1553-1557.

Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurosci *4*, 49-60.

Spiess, C., Meyer, A. S., Reissmann, S., and Frydman, J. (2004). Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. Trends Cell Biol *14*, 598-604.

Spiess, C., Miller, E. J., McClellan, A. J., and Frydman, J. (2006). Identification of the TRiC/CCT Substrate Binding Sites Uncovers the Function of Subunit Diversity in Eukaryotic Chaperonins. Mol Cell *24*, 25-37.

Stefani, M., and Dobson, C. M. (2003). Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. J Mol Med *81*, 678-699.

Steffan, J. S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L. C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y. Z., Cattaneo, E.*, et al.* (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. Science *304*, 100-104.

Steffan, J. S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y. Z., Gohler, H., Wanker, E. E., Bates, G. P., Housman, D. E., and Thompson, L. M. (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.

Stenoien, D. L., Mielke, M., and Mancini, M. A. (2002). Intranuclear ataxin1 inclusions contain both fast- and slow-exchanging components. Nat Cell Biol *4*, 806-810.

Stine, W. B., Jr., Snyder, S. W., Ladror, U. S., Wade, W. S., Miller, M. F., Perun, T. J., Holzman, T. F., and Krafft, G. A. (1996). The nanometer-scale structure of amyloid-beta visualized by atomic force microscopy. J Protein Chem *15*, 193-203.

Stork, M., Giese, A., Kretzschmar, H. A., and Tavan, P. (2005). Molecular dynamics simulations indicate a possible role of parallel beta-helices in seeded aggregation of poly-Gln. Biophys J *88*, 2442-2451.

Stromer, T., and Serpell, L. C. (2005). Structure and morphology of the Alzheimer's amyloid fibril. Microsc Res Tech *67*, 210-217.

Strong, T. V., Tagle, D. A., Valdes, J. M., Elmer, L. W., Boehm, K., Swaroop, M., Kaatz, K. W., Collins, F. S., and Albin, R. L. (1993). Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. Nat Genet *5*, 259-265.

Stryer, L. (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. Annu Rev Biochem *47*, 819-846.

Sugars, K. L., Brown, R., Cook, L. J., Swartz, J., and Rubinsztein, D. C. (2004). Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. J Biol Chem *279*, 4988-4999.

Suhr, S. T., Senut, M. C., Whitelegge, J. P., Faull, K. F., Cuizon, D. B., and Gage, F. H. (2001). Identities of sequestered proteins in aggregates from cells with induced polyglutamine expression. J Cell Biol *153*, 283-294.

Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P. H., and Liu, Y. F. (2001). Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. J Biol Chem *276*, 24713-24718.

Sunde, M., and Blake, C. (1997). The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. Adv Protein Chem *50*, 123-159.

Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., and Blake, C. C. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. J Mol Biol *273*, 729-739.

Szabo, A., Langer, T., Schroder, H., Flanagan, J., Bukau, B., and Hartl, F. U. (1994). The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 10345-10349.

Tam, S., Geller, R., Spiess, C., and Frydman, J. (2006). The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. Nat Cell Biol *8*, 1155-1162.

Teter, S. A., Houry, W. A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C., and Hartl, F. U. (1999). Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. Cell *97*, 755-765.

Thakur, A. K., and Wetzel, R. (2002). Mutational analysis of the structural organization of polyglutamine aggregates. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 17014-17019.

Thomas, P. J., Qu, B. H., and Pedersen, P. L. (1995). Defective protein folding as a basis of human disease. Trends Biochem Sci *20*, 456-459.

Tian, G., Vainberg, I. E., Tap, W. D., Lewis, S. A., and Cowan, N. J. (1995). Specificity in chaperonin-mediated protein folding. Nature *375*, 250-253.

Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., Saudou, F., Weber, C., David, G., Tora, L., and et al. (1995). Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. Nature *378*, 403-406.

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.

Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L., and Cowan, N. J. (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. Cell *93*, 863-873.

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.

Wacker, J. L., Zareie, M. H., Fong, H., Sarikaya, M., and Muchowski, P. J. (2004). Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. Nat Struct Mol Biol *11*, 1215-1222.

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.

Wall, D., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1994). The NH2-terminal 108 amino acids of the Escherichia coli DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. J Biol Chem *269*, 5446-5451.

Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B. (1999). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. J Biol Chem *274*, 25945-25952.

Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature *416*, 535-539.

Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., and Teplow, D. B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. J Biol Chem *272*, 22364-22372.

Wanker, E. E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J., and Lehrach, H. (1997). HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. Hum Mol Genet *6*, 487-495.

Warby, S. C., Chan, E. Y., Metzler, M., Gan, L., Singaraja, R. R., Crocker, S. F., Robertson, H. A., and Hayden, M. R. (2005). Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo. Hum Mol Genet *14*, 1569-1577.

Warrick, J. M., Chan, H. Y., Gray-Board, G. L., Chai, Y., Paulson, H. L., and Bonini, N. M. (1999). Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in Drosophila by the molecular chaperone HSP70. Nat Genet *23*, 425-428.

Warrick, J. M., Paulson, H. L., Gray-Board, G. L., Bui, Q. T., Fischbeck, K. H., Pittman, R. N., and Bonini, N. M. (1998). Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in Drosophila. Cell *93*, 939-949.

Wellington, C. L., Ellerby, L. M., Gutekunst, C. A., Rogers, D., Warby, S., Graham, R. K., Loubser, O., van Raamsdonk, J., Singaraja, R., Yang, Y. Z., *et al.* (2002). Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. J Neurosci *22*, 7862-7872.

Wellington, C. L., Singaraja, R., Ellerby, L., Savill, J., Roy, S., Leavitt, B., Cattaneo, E., Hackam, A., Sharp, A., Thornberry, N., *et al.* (2000). Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. J Biol Chem *275*, 19831-19838.

Westerheide, S. D., and Morimoto, R. I. (2005). Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. J Biol Chem *280*, 33097-33100.

Wexler, N. S., Young, A. B., Tanzi, R. E., Travers, H., Starosta-Rubinstein, S., Penney, J. B., Snodgrass, S. R., Shoulson, I., Gomez, F., Ramos Arroyo, M. A., and et al. (1987). Homozygotes for Huntington's disease. Nature *326*, 194-197.

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.

Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A., and Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. Nature *370*, 434-440.

Willingham, S., Outeiro, T. F., DeVit, M. J., Lindquist, S. L., and Muchowski, P. J. (2003). Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. Science *302*, 1769-1772.

Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J. C., Citron, M., and Biere, A. L. (1999). alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. J Biol Chem *274*, 19509-19512.

Woolhead, C. A., McCormick, P. J., and Johnson, A. E. (2004). Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. Cell *116*, 725-736.

Wyttenbach, A., Sauvageot, O., Carmichael, J., Diaz-Latoud, C., Arrigo, A. P., and Rubinsztein, D. C. (2002). Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. Hum Mol Genet *11*, 1137-1151.

Wyttenbach, A., Swartz, J., Kita, H., Thykjaer, T., Carmichael, J., Bradley, J., Brown, R., Maxwell, M., Schapira, A., Orntoft, T. F.*, et al.* (2001). Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. Hum Mol Genet *10*, 1829-1845.

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.

Xu, Z., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex. Nature *388*, 741-750.

Yamamoto, A., Lucas, J. J., and Hen, R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. Cell *101*, 57-66.

Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., and Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. Nat Rev Mol Cell Biol *5*, 781-791.

Young, J. C., Moarefi, I., and Hartl, F. U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. J Cell Biol *154*, 267-273.

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.

Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. Annu Rev Neurosci *23*, 217-247.

Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., Friedlander, R. M., Silani, V., Hayden, M. R., *et al.* (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. Science *293*, 493-498.

Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Timmusk, T., *et al.* (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. Nat Genet *35*, 76-83.

7. ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADP	Adenosin 5'-Diphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCT	*Chaperonine Containing TCP-1*
C.elegans	*Caenorhabditis elegans*
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
D.melanogaster	Drosophila melanogaster
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	*fluorescence correlation spectroscopy*
FIDA	*fluorescence intensity distribution analysis*
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GST	Glutathion-S-Transferase
Hsp	Hitzeschockprotein
Htt	Huntingtin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	kilobasen
MBP	*Maltose Binding Protein*
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PolyQ	Polyglutamin
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIFT	*Scanning for Intensely Fluorescent Targets*
Tab	Tabelle
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
TRiC	*TCP-1-ring Complex*
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

Proteinsequenzen der verwendeten Polyglutaminproteine:

GST-myc-Htt53Q

M S P I L G Y W K I K G L V Q P T R L L L E Y L E E K Y E E H L Y E R D E G D K W
R N K K F E L G L E F P N L P Y Y I D G D V K L T Q S M A I I R Y I A D K H N M L G
G C P K E R A E I S M L E G A V L D I R Y G V S R I A Y S K D F E T L K V D F L S K
L P E M L K M F E D R L C H K T Y L N G D H V T H P D F M L Y D A L D V V L Y M
D P M C L D A F P K L V C F K K R I E A I P Q I D K Y L K S S K Y I A W P L Q G W Q
A T F G G G D H P P K S D L E V L F Q G P L G S P E F I M C E Q K L I S E E D L G M
Q I R M A T L E K L M K A F E S L K S S $(Q)_{53}$ P P P P P P P P P P P Q L P Q P P P Q A
Q P L L P Q P Q P P P P P P P P P P P G P A V A E E P L H R P

GST-C4S-myc-Htt53Q

M S P I L G Y W K I K G L V Q P T R L L L E Y L E E K Y E E H L Y E R D E G D K W
R N K K F E L G L E F P N L P Y Y I D G D V K L T Q S M A I I R Y I A D K H N M L G
G S P K E R A E I S M L E G A V L D I R Y G V S R I A Y S K D F E T L K V D F L S K
L P E M L K M F E D R L S H K T Y L N G D H V T H P D F M L Y D A L D V V L Y M
D P M S L D A F P K L V S F K K R I E A I P Q I D K Y L K S S K Y I A W P L Q G W Q
A T F G G G D H P P K S D L E V L F Q G P L G S P E F I M C E Q K L I S E E D L G M
Q I R M A T L E K L M K A F E S L K S S $(Q)_{53}$ P P P P P P P P P P P Q L P Q P P P Q A
Q P L L P Q P Q P P P P P P P P P P P G P A V A E E P L H R P

MBP-PPMKC2-HA-Htt53Q-His

M K I E E G K L V I W I N G D K G Y N G L A E V G K K F E K D T G I K V T V E H P
D K L E E K F P Q V A A T G D G P D I I F W A H D R F G G Y A Q S G L L A E I T P D
K A F Q D K L Y P F T W D A V R Y N G K L I A Y P I A V E A L S L I Y N K D L L P N
P P K T W E E I P A L D K E L K A K G K S A L M F N L Q E P Y F T W P L I A A D G
G Y A F K Y E N G K Y D I K D V G V D N A G A K A G L T F L V D L I K N K H M N
A D T D Y S I A E A A F N K G E T A M T I N G P W A W S N I D T S K V N Y G V T V
L P T F K G Q P S K P F V G V L S A G I N A A S P N K E L A K E F L E N Y L L T D E
G L E A V N K D K P L G A V A L K S Y E E E L A K D P R I A A T M E N A Q K G E I
M P N I P Q M S A F W Y A V R T A V I N A A S G R Q T V D E A L K D A Q T N S S S
G A G S D L E V L F Q G P L G S R R A S V A S S G S M G Y P Y D V P D Y A G R S M
A T L E K L M K A F E S L K C F $(Q)_{53}$ P P P P P P P P P P P Q L P Q P P P Q A Q P L L P
Q P Q P P P P P P P P P P P G P A V A E E P L H R P G S S G H H H H H H

GST-C4S-HA-Htt53/30QΔP1P-CQC-His

M S P I L G Y W K I K G L V Q P T R L L L E Y L E E K Y E E H L Y E R D E G D K W
R N K K F E L G L E F P N L P Y Y I D G D V K L T Q S M A I I R Y I A D K H N M L G
G C P K E R A E I S M L E G A V L D I R Y G V S R I A Y S K D F E T L K V D F L S K
L P E M L K M F E D R L C H K T Y L N G D H V T H P D F M L Y D A L D V V L Y M
D P M C L D A F P K L V C F K K R I E A I P Q I D K Y L K S S K Y I A W P L Q G W Q
A T F G G G D H P P K S D L E V L F Q G P L G S M G Y P Y D V P Y D V P D Y A G G
S M A T L E K L M K A F E S L K C F $(Q)_{53/30}$ P C E G S S G H H H H H H

GST-C4S-HA-Htt53Q40QΔP0P-CQC-His

M S P I L G Y W K I K G L V Q P T R L L L E Y L E E K Y E E H L Y E R D E G D K W
R N K K F E L G L E F P N L P Y Y I D G D V K L T Q S M A I I R Y I A D K H N M L G
G C P K E R A E I S M L E G A V L D I R Y G V S R I A Y S K D F E T L K V D F L S K
L P E M L K M F E D R L C H K T Y L N G D H V T H P D F M L Y D A L D V V L Y M
D P M C L D A F P K L V C F K K R I E A I P Q I D K Y L K S S K Y I A W P L Q G W Q
A T F G G G D H P P K S D L E V L F Q G P L G S M G Y P Y D V P Y D V P D Y A G G
S M A T L E K L M K A F E S L K C F $(Q)_{40}$ C E G S S G H H H H H H

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Behrends, C., Langer, C. A., Boteva, R., Böttcher, U. M., Stemp, M. J., Schaffar, G., Rao, B. V, Giese, A., Kretzschmar, H., Siegers, K., Hartl, F.U. (2006). Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers.Mol Cell 23, 887-897.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, in der Abteilung Zelluläre Biochemie angefertigt. An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Ulrich Hartl für die reizvolle und interessante Themenstellung und die stete Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Zoya Ignatova möchte ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken und für viele anregende und hilfreiche Diskussionen, insbesondere auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Raina Boteva für ihre Einführung in die Fluoreszenztechniken und die hervorragende Zusammenarbeit. Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Armin Giese (LMU München) für seine Einführung in die konfokale Einzelmolekül-analyse und die äußerst erfolgreiche und angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Christian Behrends, Herrn Markus Stemp und Frau Bharathi Vasudeva Rao möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projekts danken.

Für ihre stete Hilfsbereitschaft bei experimentellen Problemen möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Hideki Sakahira, Herrn Nikolai Tzvetkov, Herrn Dr. Gregor Schaffar und Herrn Dr. Jason Young bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hartl möchte ich für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken, insbesondere Herrn Markus Stemp, Frau Dr. Annette Haacke, Herrn Niclas Schiffer, Frau Sladjana Tomic, Frau Dr. Stephanie Etchells und Frau Dr. Sarah Broadley.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die stete Unterstützung, insbesondere meinem Mann Michael für seine Hilfe bei Computerproblemen, und vor allem für seine Geduld und seine unerschütterliche Zuversicht.

LEBENSLAUF

Name:	Carola Alexandra Langer
Geburtsname:	Baier
Geburtsdatum:	15.01.1976
Geburtsort:	Fürth
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

09/82-08/86	Besuch der Grundschule am Schießstättenweg Neumarkt
09/86-06/95	Besuch des Ostendorfer Gymnasiums Neumarkt

Studium

10/1995-09/1996	Studium der Physik an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
10/1996-03/1999	Grundstudium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
04/1999-01/2002	Hauptstudium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Hauptfach Biochemie/Biophysik
01/2002	Diplom

Doktorarbeit

seit 04/02	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried