



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Chorea Huntington: Zelluläres *in vitro*-Modell der polyglutaminabhängigen Proteinaggregation

Autor: Andreas Holloschi
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Chorea Huntington ist eine autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung, die durch die Mutation eines einzigen Gens verursacht wird. Allein die Verlängerung der Polyglutamin-domäne von Huntingtin über einen pathologischen Schwellenwert hinaus bewirkt den Ausbruch der Krankheit und führt zu intrazellulären Ablagerungen des Proteins. Eine putativ ursächliche Beziehung zwischen diesen amyloiden Aggregaten und der Entstehung der Krankheit weist den Aggregationsprozess als möglichen therapeutischen Angriffspunkt aus. Für die Identifizierung von aggregationsmodulierenden Substanzen als auch für die Untersuchung ihrer Wirkmechanismen werden Modelle benötigt, die den Aggregationsprozess bzw. Teilaspekte davon möglichst genau abbilden können. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein zelluläres, FRET-basiertes *in vitro*-Modell für die polyglutaminabhängige Aggregation von Huntingtin etabliert und zusätzlich zur besseren Beurteilung von Substanzwirkungen mit einem fluorimetrischen Vitalitätstest kombiniert.

Zur Entwicklung des Assays wurden stabile Tet-off-Zelllinien generiert, die induzierbar CFP- und YFP-markierte Huntingtin Exon 1-Fragmente unter der Kontrolle eines tetracyclinregulierten Promotors exprimieren. Das zelluläre Assay wurde mit Hilfe von 27 Substanzen, deren aggregationsmodulierende Wirkung in anderen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen bereits nachgewiesen wurde, validiert. Die Ergebnisse der Validierung des Assays weisen das etablierte FRET-Assay als robustes Screening-System mit hoher Sensitivität und hoher Datenreproduzierbarkeit aus, eine Voraussetzung für seinen Einsatz in Screeningverfahren mit mittlerem und hohem Durchsatz. Das Modell kann auch in HCS-Verfahren benutzt werden und kann aufgrund der hier verwendeten bildgebenden Verfahren (Imaging) zusätzliche Informationen über den Wirkmechanismus potentieller Wirkstoffe liefern. Insgesamt ist das entwickelte zelluläre FRET-Assay eine wichtige Ergänzung vorhandener Modelle zur Identifizierung und Untersuchung potentieller Wirkstoffe, die auf die Aggregation von Huntingtin wirken. Die Kombination mit dem anschließenden Vitalitätstest stellt eine zusätzliche Verbesserung dar und erlaubt es, toxische Substanzen sofort zu identifizieren.

Mit Hilfe des zellulären FRET-Assays können in Zukunft nicht nur chemische Substanzen getestet werden, sondern auch cDNA- und siRNA-Banken mit dem Ziel, neue zelluläre Zielproteine zu identifizieren, die an der Regulation des Aggregationsprozesses beteiligt sind.