

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Humangenetik

Direktor der Einrichtung: Prof. Dr. med. Christian Kubisch

**Spinozerebelläre Ataxie Typ 2: Untersuchung des Proteininteraktions-
musters von Ataxin-2**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin /Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Jan-Luca Eden
aus Emden

Hamburg 2021

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 31.03.2023

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Roland Bender

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Stefan Kindler

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis.....	7
1 Einleitung	8
1.1 Spinozerebelläre Ataxie Typ 2.....	8
1.1.1 Einteilung, Geschichte und Epidemiologie	8
1.1.2 Symptomatik	8
1.1.3 Diagnostik	10
1.2 Das ATXN2-Gen.....	10
1.3 Ataxin-2.....	11
1.3.1 Domänen	12
1.3.2 Funktionen.....	13
1.4 Interaktionspartner von Ataxin-2	15
1.5 Pathophysiologie der Spinozerebellären Ataxie Typ 2	16
1.6 Mögliche Therapieansätze der Spinozerebellären Ataxie Typ 2.....	17
1.7 Arbeitshypothese und Fragestellung	19
2 Material und Methoden	20
2.2 Material	20
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Nährmedien und Seren	20
2.1.3 Weitere Lösungen	21
2.1.4 Bakterienstämme und Zelllinien	23
2.1.5 Vektoren.....	23
2.1.6 Restriktionsenzyme	27
2.1.7 Kits	29
2.1.8 Sequenzprimer.....	29
2.1.9 Antikörper	30
2.1.9.1 Primäre Antikörper.....	30
2.1.9.2 Sekundäre Antikörper	31
2.1.10 Chemilumineszenz-Substrat.....	31
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien	32
2.2.1.2 Isolierung der Plasmid-DNA.....	32
2.2.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	33
2.2.1.4 Kontrolle der Plasmid-DNA.....	33
2.2.2 Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.2.1 Zellkultur HEK293-Zellen	34

2.2.2.2 Transfektion	35
2.2.3 Proteinchemische Methoden	35
2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten.....	35
2.2.3.2 Proteingewinnung (Affinitätspräzipitation)	36
2.2.3.3 Bestimmung der Proteinmenge der Lysate	37
2.2.3.4 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE	37
2.2.3.5 Proteintransfer mittels <i>Western Blot</i>	38
2.2.3.6 Immunologische Proteindetektion.....	38
3 Ergebnisse	40
3.1 Kontrolle der DNA.....	40
3.1.1 Analyse der Plasmide mittels Gelelektrophorese	40
3.1.2 Analyse der Plasmide mittels Sanger-Sequenzierung	42
3.2 Western Blots	43
3.2.1 Bisherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kindler	43
3.2.2 Kontrolle der Affinitätspräzipitation	43
3.2.3 Analyse möglicher Interaktionspartner	46
3.2.3.1 PABP1	46
3.2.3.2 LSM12.....	48
3.2.3.3 EDC3.....	50
3.2.3.4 IMP1	51
3.2.3.5 MOV10	53
3.2.3.6 COPβI.....	55
3.2.4 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	56
4 Diskussion	57
4.1 Ataxin-2.....	57
4.2 Posttranskriptionelle RNA-Prozesse	57
4.3 RNA-Transport	62
4.4 Vesikulärer Transport.....	63
4.5 Zusammenfassung	65
4.6 Ausblick	66
5 Zusammenfassung.....	67
6 Abkürzungsverzeichnis	69
7 Literaturverzeichnis.....	72
8 Danksagung.....	77
9 Lebenslauf.....	78
10 Erklärung an Eides statt.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Symptome der SCA2 auf einer Zeitachse von der asymptomatischen bis zur schwer-ataktischen Phase	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung von Ataxin-2 inklusive bekannter Domänen	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Grundvektors pN22-EGFP-C1 und des Vektors pN22-EGFP-Q22 mit der vollständigen kodierenden Region des humanen Ataxin-2.....	26
Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten Fusionsproteine	26
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vektoren mit eingezeichneten Schnittstellen der Restriktionsenzyme.	29
Abbildung 6: Gelelektrophorese zur Auftrennung der Plasmidformen geschlossen ringförmig (<i>supercoiled</i>), offen ringförmig und linear in 1%igem Agarose-Gel	40
Abbildung 7: Schematische Darstellung des erwarteten Bandenmusters der Gelelektrophorese der verdauten Plasmide	41
Abbildung 8: Gelelektrophorese zur Auftrennung der Restriktionsfragmente	42
Abbildung 9: <i>Western Blot</i> zum Nachweis des EGFP-Anteils der Fusionsproteine in Affinitätspräzipitaten.....	44
Abbildung 10: Schematische Darstellung der verwendeten und im <i>Western Blot</i> nachgewiesenen Fusionsproteine	45
Abbildung 11: <i>Western Blot</i> zum Nachweis von PABP1 in verschiedenen Affinitätspräzipitaten.	46
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Fusionsproteine unter Angabe möglicher Interaktionsregionen mit PABP1	47
Abbildung 13: <i>Western Blot</i> zum Nachweis von LSM12 in verschiedenen Affinitätspräzipitaten	48
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Fusionsproteine unter Angabe möglicher Interaktionsregionen mit LSM12	49
Abbildung 15: <i>Western Blot</i> zum Nachweis von EDC3 in verschiedenen Affinitätspräzipitaten ...	50
Abbildung 16: <i>Western Blot</i> zum Nachweis von IMP1 in verschiedenen Affinitätspräzipitaten	51
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Fusionsproteine unter Angabe möglicher Interaktionsregionen mit IMP1	52
Abbildung 18: <i>Western Blot</i> zum Nachweis von MOV10 in verschiedenen Affinitätspräzipitaten.	53
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Fusionsproteine unter Angabe möglicher Interaktionsregionen mit MOV10	54

Abbildung 20: <i>Western Blot</i> zum Nachweis von COP β I in verschiedenen Affinitätspräzipitaten ..	55
Abbildung 21: Schematische Darstellung möglicher gemeinsamer Funktionen von Ataxin-2 und PABP1.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Nährmedien und Seren	20
Tabelle 2: Übersicht über weitere verwendete Lösungen	21
Tabelle 3: Mengen der Einzelkomponenten (in ml) der Lösungen für PA-Laufgele (je 30 ml Lösungsvolumen).....	22
Tabelle 4: Mengen der Einzelkomponenten (in ml) der Lösungen für PA-Sammelgele (je 5 ml Lösungsvolumen).....	22
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien	23
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Vektoren	25
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Kits	29
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Sequenzprimer.....	29
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper	30
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper	31
Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Chemilumineszenz-Substrate	31
Tabelle 12: Tabellarische Zusammenfassung des Bindungsmusters von Ataxin-2	56

1 Einleitung

1.1 Spinozerebelläre Ataxie Typ 2

1.1.1 Einteilung, Geschichte und Epidemiologie

Die Spinozerebellären Ataxien (SCA) gehören zur Gruppe der autosomal-dominanten zerebellären Ataxien Typ I und sind durch eine Reihe von Symptomen, u.a. durch die namensgebende Ataxie, gekennzeichnet. Derzeit werden sie in 47 Subtypen unterteilt, bei denen jeweils ein anderes Gen mutiert ist (Sullivan et al., 2019). Die SCA 1, 2, 6, 7 und 17, welche die Mehrzahl der SCA-Patienten abbilden, gehören neben anderen Erkrankungen, wie etwa Chorea Huntington und dem Fragilen X-Syndrom, zur Gruppe der Trinukleotidexpansionserkrankungen (Mumenthaler & Mattle, 2012). Die Erstbeschreibung einer SCA erfolgte 1971 durch Wadia und Swami (Wadia & Swami, 1971). Nachfolgend konnte zunächst keine genauere Einteilung der SCA erfolgen und es wurden teils Eigennamen für autosomal-dominante zerebelläre Ataxien vergeben. Erst später stellte sich heraus, dass Mutationen in verschiedenen Genloci zu mehreren klar abgrenzbaren SCA-Subtypen führen, die sich in der Symptomatik jeweils leicht unterscheiden. Die Entdeckung des mutierten Genlocus der SCA2 erfolgte 1993 (Gispert et al., 1993). Der Subtyp 2 ist der zweithäufigste unter den SCA nach der SCA3 (auch Machado-Joseph-Erkrankung) und vor der SCA6 (Velázquez-Pérez et al., 2017). Jedoch variiert dessen Häufigkeit stark in Abhängigkeit von geographischer Lage und ethnischer Zugehörigkeit. So gibt es beispielsweise in Kuba (Velázquez Pérez et al., 2009), Mexiko (Alonso et al., 2007) oder Südafrika (Bryer et al., 2003) eine außergewöhnlich hohe Prävalenz. Besonders in der ostkubanischen Region Holguin liegt die Erkrankungsrate mit 40 von 100.000 Einwohnern deutlich über dem globalen Durchschnitt von 4 bis 6 von 100.000 Menschen (Velázquez-Pérez et al., 2017). Dies wird auf einen Gründereffekt der Population zurückgeführt (Velázquez Pérez et al., 2009).

1.1.2 Symptomatik

Das Symptombild der SCA2 ist durch die Beteiligung verschiedener zentraler neuronaler Strukturen breit gefächert. Die Ursache der charakterisierenden Beschwerden

liegt in der Schädigung des Kleinhirns (Louis et al., 2018). Diese ruft das sogenannte zerebelläre Syndrom mit Gangataxie, Intentionstremor, zerebellärer Dysarthrie, Dysmetrie und Dysdiadochokinese hervor, das auch bei zerebellärer Schädigung anderer Genese auftreten kann (Durr, 2010). Zu dieser Symptomatik kommt es aber im Verlauf der Krankheit erst nach einiger Zeit (Abbildung 1).

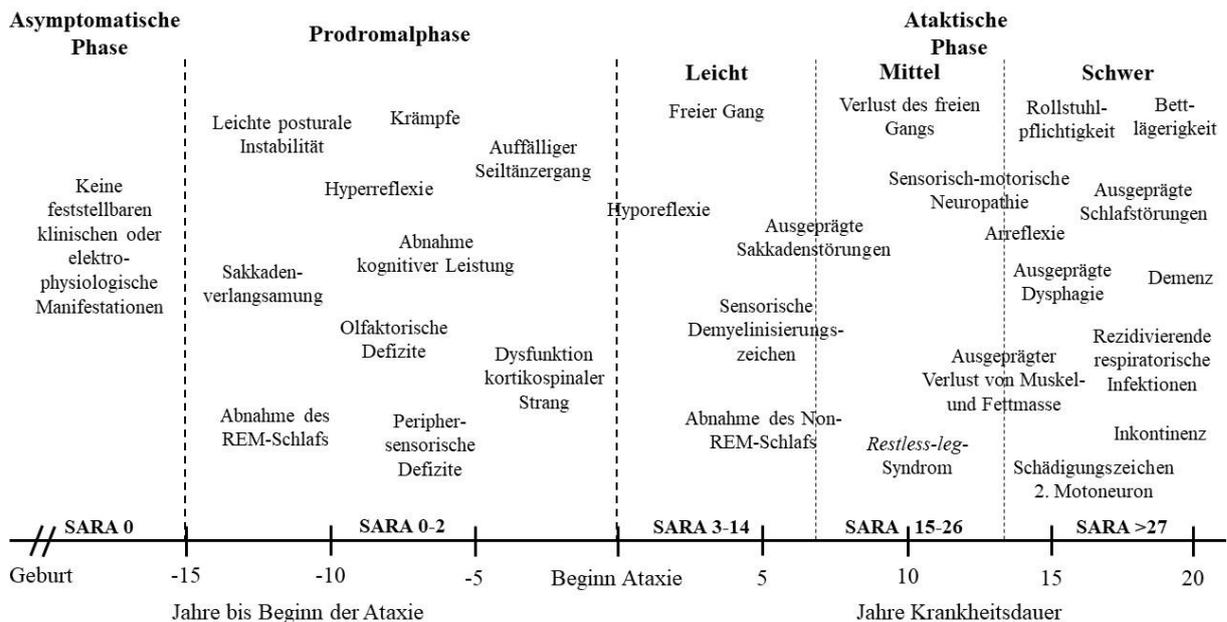


Abbildung 1: Einteilung der Symptome der SCA2 auf einer Zeitachse von der asymptomatischen bis zur schwer-ataktischen Phase. Die Symptome ordnen sich vor (- X Jahre) oder nach (+ X Jahre) dem Beginn der Ataxie ein. Zusätzlich ist der zugehörige SARA-Wert (siehe 1.1.3) angegeben. Verändert nach Velázquez-Pérez (Velázquez-Pérez et al., 2017).

Die Manifestation der Erkrankung beginnt mit einer prodromalen Phase. Diese ist durch verschiedene nicht-ataktische Symptome wie Störungen des Schlafs (Abnahme des REM-Schlafs, *Restless-leg syndrome*) (Velázquez-Pérez et al., 2011) oder des pyramidalen Systems (Faszikulationen), aber auch durch Dysfunktionen des kortikospinalen Strangs (Areflexie, pathologische Reflexe), der peripheren Sensorik (Hypo- und Parästhesien), des autonomen Nervensystems (u.a. Blasenfunktionsstörungen) und seltener auch durch die Abnahme der kognitiven Leistung gekennzeichnet. Eine Sakkadenverlangsamung (Okulomotorik) als Zeichen der Hirnstammschädigung tritt bei bis zu 85% der Patienten auf und ist somit ebenfalls charakteristisch für die SCA2 (Schmitz-Hübsch et al., 2008). Die folgende ataktische Phase beginnt mit Standunsicherheiten, die in ihrer Schwere im Verlauf zunehmen. Auch die

anderen oben genannten zerebellären Symptome prägen sich nun aus. In der neurologischen Untersuchung zeigen sich unter anderem Auffälligkeiten im Finger-Nase- und Knie-Hacke-Versuch, ein Rückprallphänomen und ein positiver Unterberger-Tretversuch. Daneben verschlechtern sich auch die Funktionen der Systeme zunehmend, die bereits in der prodromalen Phase betroffen waren. Insgesamt schreitet die Symptomlast ab dem Krankheitsbeginn kontinuierlich fort und nach durchschnittlich 15 bis 25 Jahren verliert der Patient seine Gehfähigkeit (Velázquez-Pérez et al., 2017).

1.1.3 Diagnostik

Zur sicheren Diagnose der SCA2 ist eine genetische Testung unumgänglich. Auch wenn für die Erkrankung keine ursächliche Therapie zugelassen ist, ist eine gesicherte Diagnose von großem Wert. Neben der für Patienten häufig wichtigen Zuordnung ihrer Symptome zu einer umschriebenen Krankheit ist es beispielsweise für Erwachsene mit Kindern oder Kinderwunsch von entscheidender Bedeutung, eine genetische Erkrankung auszuschließen oder zu bestätigen. Insbesondere zur Abgrenzung von anderen, behandelbaren zerebellären Schädigungen sollte eine vollständige neurologische Diagnostik mit Anamnese, Untersuchung und Bildgebung erfolgen, auch wenn sich in der Computer- und der Magnetresonanztomographie keine spezifischen Zeichen für eine SCA finden lassen (Whaley et al., 2011). Zur strukturierten klinischen Beurteilung wurde eine Skala entwickelt, die den Patienten anhand der Symptomatik Punkte zuordnet, woraus sich ein zwischen 0 und 40 Punkten liegender Gesamtwert (*Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)-Score*; siehe auch Abbildung 1) ergibt (Schmitz-Hübsch et al., 2006).

1.2 Das ATXN2-Gen

Ursache der SCA2 sind Mutationen im *ATXN2*-Gen, welches das Protein Ataxin-2 kodiert. Es liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 12 an Position 24.12 (12q24.12), beinhaltet 25 Exons und ist insgesamt 1474 Kilobasen (kb) lang (Gispert et al., 1993).

ATXN2 enthält im ersten Exon eine aus CAG-Tripletts bestehende repetitive Region. Im Wildtyp-Gen umfasst diese meist 22 oder 23 Tripletts. Wenn der repetitive Abschnitt auf eine Größe von mehr als 29 Tripletts expandiert, gilt dies als pathologisch (Geschwind et al., 1997). Ein Umfang von 30 bis 32 CAG-Tripletts führt nicht zur SCA2, stellt ein erhöhtes Risiko für Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) sowie für ein Parkinson-Syndrom dar (Ross et al., 2011). Bei einer Expansion auf 33 oder mehr CAG-Trinukleotide kommt es zur Ausprägung der SCA2 (Fernandez et al., 2000). Am häufigsten sind bei Erkrankten 37 bis 39 Tripletts umfassende repetitive Genabschnitte (Pulst, 1993). Es liegt eine inverse Korrelation zwischen der Länge der repetitiven Region und dem Manifestationsalter der Erkrankung vor. Das mittlere Manifestationsalter liegt in etwa im dritten und vierten Lebensjahrzehnt. Ein Teil der Patienten erkrankt bereits im Kindes- oder Jugendalter (Giuffrida et al., 1999). Ein expandiertes Allel ist grundsätzlich instabil und die Länge der repetitiven Region kann bei der Transmission zur nächsten Generation ab- oder zunehmen, wobei eine Zunahme deutlich häufiger ist (Filla et al., 1999). Eine Weitergabe der Mutation durch den Vater führt im Durchschnitt zu stärkeren Expansionen als die Weitergabe über die mütterliche Seite (Pulst, 2018). Ein Faktor, der in der Vererbung des *ATXN2*-Gens eine Rolle spielen könnte, sind sogenannte CAA-Unterbrechungen, bei denen sich CAA-Tripletts in den repetitiven CAG-Strang einfügen. Es wird vermutet, dass diese, wie bei der SCA1, eine stabilisierende Wirkung auf das *ATXN2*-Gen haben. Es ist also möglich, dass diese Unterbrechungen das Risiko einer Expansion der repetitiven Region im *ATXN2*-Gen und somit auch das der Ausbildung einer SCA2 vermindern (Choudhry et al., 2001).

1.3 Ataxin-2

Das Genprodukt des *ATXN2*-Gens ist Ataxin-2. In seiner Wildtyp-Form weist Ataxin-2 eine Masse von 140 Kilodalton (kDa) auf. Seltener kann es auch in einer 123 kDa messenden Isoform vorliegen, was durch einen alternativen Translationsstart bedingt ist (Sahba et al., 1998). Wildtyp-Ataxin-2 besteht aus ca. 1312 Aminosäuren (Pulst et al., 1996) und wird ubiquitär exprimiert, wobei dessen Konzentration in den Purkinje-Zellen (PC) des Kleinhirns und im Nervensystem allgemein höher als in anderen Geweben des Körpers ist. Zudem steigt die Konzentration in den PC mit

zunehmendem Alter an (Huynh et al., 1999). Innerhalb der Zelle befindet sich das Protein präferentiell im Zytoplasma, kann aber auch in den Kern transportiert werden. Im Zytoplasma kann es mit zellulären Komponenten, wie dem rauen endoplasmatischen Retikulum, sogenannten *processing bodies* (PB) und mit Stressgranula (SG) assoziieren (Jiménez-López & Guzmán, 2014). Ataxin-2 bzw. dessen Orthologe anderer Spezies treten auch bei evolutionär deutlich früheren Organismen wie beispielsweise Hefen und Algen auf, was auf lebenswichtige Funktionen dieses Proteins schließen lässt (Jiménez-López & Guzmán, 2014).

1.3.1 Domänen

Ataxin-2 besitzt mehrere funktionelle Domänen, deren Aufgaben in Teilen bekannt sind (Abbildung 2). N-terminal gelegen ist die Polyglutamin (Poly(Q)) -Domäne, welche durch eine Region aus repetitiven CAG-Triplets kodiert wird (siehe 1.2). Bei Menschen der Allgemeinbevölkerung hat die Poly(Q)-Domäne eine durchschnittliche Länge von 23 unmittelbar aufeinanderfolgenden Glutaminen. C-terminal hiervon liegen eine *Like Sm-* (LSm) sowie eine *LSm-associated domain* (LSmAD). Diese Domänen finden sich vor allem bei Proteinen aus der LSm-Familie. Diese LSm-Proteine, bei denen das Protein meist ausschließlich aus einer einzelnen LSm-Domäne besteht, lagern sich mit fünf bis sechs anderen LSm-Proteinen als Quartärstruktur in einer Ringform, dem sogenannten Torus, zusammen. So sie sind in der Lage, RNA zu binden (Kambach et al., 1999). Neben der LSm- und LSmA-Domäne wurden in Ataxin-2 zwei *SRC homology 3 domain binding motifs 1* und *2* beschrieben. Diese Prolin-reichen Regionen können mit *SRC homology 3*-Domänen anderer Proteine interagieren. Das C-terminal gelegene *poly (A)-binding protein interacting motif 2* (PAM2) ist hoch konserviert und ermöglicht eine Interaktion mit dem *polyalanine-binding protein 1* (PABP1, auch PABPC1) (Tharun, 2008).

Ataxin-2: Domänenstruktur und Interaktionsbereiche

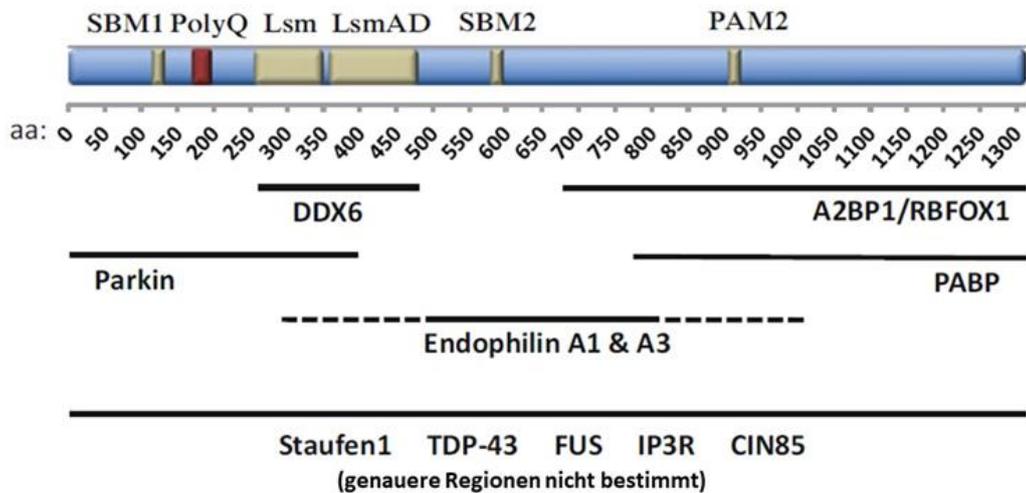


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Ataxin-2 inklusive bekannter Domänen. Als Referenz werden die durchnummerierten Aminosäuren von humanem Ataxin-2 verwendet. Darunter Angabe einiger wahrscheinlicher Interaktionspartner mit Kennzeichnung der für sie vermutlich notwendigen Bindungsregionen durch waagerechte Linien. Verändert nach Scoles und Pulst (Scoles & Pulst, 2018).

1.3.2 Funktionen

Ataxin-2 werden Funktionen in einer Reihe von zellulären Prozessen zugeschrieben. Es wird insbesondere von Aufgaben im RNA-Stoffwechsel, hier bspw. in Zusammenhang mit SG und PB berichtet.

Wie für die anderen Mitglieder der LSM-Proteinfamilie wird für Ataxin-2 vermutet, dass es über seine LSM-Domäne direkt mit RNA-Molekülen interagieren kann (Yokoshi et al., 2014). Proteinen bzw. Domänen der LSM-Familie werden verschiedene Funktionen im RNA-Stoffwechsel zugeschrieben. Sie sind in Komplexen am mRNA-Abbau im Nukleus und Zytoplasma, am Prozess des Spleißens und der 3'-Prozessierung von mRNA beteiligt (Tharun, 2008). Yokoshi et al. (2014) fanden heraus, dass Ataxin-2 vor allem an AU-reiche Regionen in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) von mRNA-Molekülen bindet. Darüber hinaus vermuten sie als Folge der Interaktion eine Stabilisierung der Ziel-mRNA und eine davon abhängig gesteigerte Produktion der durch diese kodierten Proteine. Weiterhin geben sie an, dass die Poly(Q)-Expansion im Rahmen der SCA2 diese Aktivität einschränkt

(Yokoshi et al., 2014). Neben der LSM-Domäne sind auch für die PAM2-Domäne Funktionen im RNA-Stoffwechsel beschrieben. So interagiert diese mit der MLLE-Domäne von PABP1. Dieses kann über mehrere RNA-Bindungsdomänen mit dem Polyalanin (Poly(A)) -Schwanz von mRNA-Molekülen interagieren und hat eine Funktion in der Translation, bei mRNA-Stabilisierung und -Kernexport. Daher wird vermutet, dass Ataxin-2 PABP1-vermittelt wie auch PABP1-unabhängig Einfluss auf verschiedene Prozesse des RNA-Metabolismus nehmen könnte (Kahvejian et al., 2005).

Die Entstehung von SG ist Teil der Stressantwort von Zellen. Sie gehören zur Gruppe der Ribonukleotidprotein-Granula (RNP-Granula), da sie sich aus mRNA und Proteinen zusammensetzen. Sie bilden sich in der Zelle ausschließlich unter Einwirkung von Stress, beispielsweise in Form von Hitze oder Nährstoffmangel. Bei den von ihnen beinhalteten mRNA-Molekülen wird die Translationsinitiation unterbrochen, um unter Stress die Proteinbiosynthese teilweise herunterzufahren. Es wird davon ausgegangen, dass die Synthese nicht überlebensnotwendiger Proteine selektiv mittels Assemblierung ihrer mRNA-Moleküle in SG unterdrückt wird. (Riggs et al., 2020). Ralser et al. zeigten eine Ko-Lokalisation von Ataxin-2 und PABP1 in SG, was es möglich erscheinen lässt, dass diese Proteine hier eine translationsmodulierende Aufgabe gemeinsam wahrnehmen (Ralser et al., 2005). Darüber hinaus wird Ataxin-2 eine Rolle in der Bildung von SG zugeschrieben, da ein Ataxin-2-*Knockdown*¹ in *Human embryonic kidney 293* (HEK293) -Zellen zu einer verminderten Bildung von SG führt (Nonhoff et al., 2007).

Eine weitere zelluläre Struktur, mit der Ataxin-2 assoziiert, sind PB. Wie SG gehören PB zur Gruppe der RNP-Granula. Im Gegensatz zu SG sind sie auch in nicht unter Stress stehenden Zellen vorhanden, nehmen aber an Größe und Anzahl unter Stress zu. Sie haben eine enge funktionelle Beziehung zu den Komponenten des RNA-Abbausystems und dienen wahrscheinlich präferentiell dem RNA-Abbau. Beispielsweise konnte das vermutlich am sogenannten *Decapping* beteiligte Protein *enhancer of mRNA-decapping protein 3* (EDC3, auch LSM16) in PB nachgewiesen werden

¹ *Knockdown*: starke Verminderung der Proteinkonzentration durch den Einsatz von *small interfering RNA* (siRNA)

(Fenger-Grøn et al., 2005). Beim *Decapping* wird eine Struktur am 5'-Ende von mRNA-Molekülen entfernt, was neben anderen Vorgängen den mRNA-Abbau einleitet. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass den PB eher eine translationsmodulierende als eine ausschließlich mRNA abbauende Funktion zukommen könnte (Riggs et al., 2020). In einer Untersuchung konnte festgestellt werden, dass Neuroblastoma und HEK293-Zellen mit einer vermehrten Expression von Ataxin-2 eine verminderte Anzahl an PB aufwiesen. Folglich besteht ein möglicher Einfluss von Ataxin-2 auf die Bildung bzw. die Stabilität sowohl von SG als auch von PB. Auch die Ko-Lokalisation und direkte Interaktion von Ataxin-2 mit einigen ihrer Komponenten weisen darauf hin (Nonhoff et al., 2007).

1.4 Interaktionspartner von Ataxin-2

Für Ataxin-2 sind mehrere Interaktionspartner beschrieben, die wiederum Funktionen in verschiedenen zellulären Prozessen erfüllen. Abbildung 2 (1.1.3) zeigt einige beschriebene Interaktionspartner und zusätzlich, an welche Regionen sie innerhalb von Ataxin-2 binden. Der am meisten untersuchte Bindungspartner von Ataxin-2 ist PABP1, bei dem eine Interaktion als gesichert gilt (Ralser et al., 2005; Tharun, 2008). Auch das *ataxin-2 binding protein 1*, ebenfalls bekannt als *RNA binding protein fox-1 homolog 1*, konnte über ein *yeast-two-hybrid-assay*² als Bindungspartner von Ataxin-2 identifiziert werden. Es besitzt eine konservierte RNA-Bindungsdomäne, weshalb auch für dieses Protein eine Verbindung zum RNA-Metabolismus vermutet wird (Shibata et al., 2000). Genauso in *yeast-two-hybrid-assays*² konnte eine direkte Interaktion zwischen Ataxin-2 und der Hauptkomponente von PB, der *DEAD box helicase 6*, festgestellt werden (Nonhoff et al., 2007). Für die Proteine *Staufen-1* (STAU1) und *TAR DNA-binding protein of 43 kDa* (TDP-43) wurde der Nachweis einer Interaktion mit Ataxin-2 mittels Immunopräzipitation und spezifischer Antikörper erbracht. Außerdem konnte eine Bindung von STAU1 mit doppelsträngiger RNA und eine Ko-

² *Yeast-two-hybrid-assay*: In *Saccharomyces cerevisiae* existiert das Protein GAL4, welches über einen N-terminalen Anteil DNA-Sequenzen spezifisch bindet und über einen C-terminalen Anteil essentiell für den Start der Transkription ist. Somit sind beide Anteile für eine korrekte Transkription notwendig. Nun stellt man zwei Fusionsproteine her: Protein A wird mit dem N-terminalen, Protein B mit dem C-terminalen Anteil fusioniert. Wenn nun eine direkte Interaktion zwischen den Proteinen A und B vorliegt, finden auch die GAL4-Teile wieder zueinander und können ihre Funktion ausführen. Die Produktion der von GAL4 angesteuerten Enzyme des Galaktose-Stoffwechsels dient daher als indirekter Marker für die direkte Proteininteraktion. (Fields & Song, 1989)

Lokalisation von STAU1 und TDP-43 mit Ataxin-2 in SG gezeigt werden (Paul S, 2018; Elden et al., 2010). Da auch PABP1 und RNA in SG nachgewiesen werden konnten, kann ein Zusammenspiel der fünf Proteine im RNA-Metabolismus und möglicherweise auch der Modulation von SG vermutet werden. Ein weiterer möglicher Interaktionspartner von Ataxin-2 ist *regulator of G-Protein signaling 8* (RGS8)-mRNA, für die ein Nachweis mittels RNA-Immunopräzipitation erfolgte (Dansithong et al., 2015). Ein Bindungspartner, der ausschließlich mit der pathologisch verlängerten Ataxin-2-Variante interagiert, ist der Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP3) -Rezeptor. In Zusammenhang mit dem IP3-Rezeptor und RGS8 besteht eine Hypothese zur Pathophysiologie (siehe 1.5) der SCA2 (Liu et al., 2009).

1.5 Pathophysiologie der Spinozerebellären Ataxie Typ 2

Die Pathophysiologie der SCA2 ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. In der Forschung existieren zahlreiche Hypothesen zu den Mechanismen der möglichen Dysfunktion des pathologisch veränderten Ataxin-2.

Beobachtet wurde, wie auch bei den veränderten Proteinen anderer Poly(Q)-Erkrankungen, eine Aggregation des mutierten und in seiner Konformation veränderten Ataxin-2, möglicherweise mit anderen Proteinen (Seidel et al., 2012). Diese Aggregate lagern sich in Granulationen zusammen, welche möglicherweise zur Pathophysiologie der Erkrankung beitragen (Takeuchi & Nagai, 2017). Auf welche Weise dies geschieht, ist weiterhin unklar. Seidel et al. zeigten an Post-mortem-Hirngewebe von SCA2-Patienten, dass eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Neurodegeneration und dem Vorliegen von Aggregaten und Granulationen besteht (Seidel et al., 2017). Ob hier nun allerdings eine Kausalität oder nur eine Korrelation vorliegt, ließ sich bislang nicht feststellen.

Liu et al. zeigten 2009, dass pathologisch verändertes Ataxin-2 Einfluss auf die Kalzium-Homöostase von PC nimmt. Der Degeneration dieser Zellen des Kleinhirns wird eine zentrale Bedeutung in der Pathophysiologie der SCA2 zugeordnet. Es wurde festgestellt, dass pathologisch verändertes Ataxin-2, im Gegensatz zu Wildtyp-Ataxin-2, an die C-terminale Region des stark in PC exprimierten IP3-Rezeptors in der Membran des endoplasmatischen Retikulums bindet (Liu et al., 2009). Diese

Bindung führt dazu, dass die IP3-Rezeptor-Aktivierung durch dessen Liganden IP3 in Gegenwart von verändertem Ataxin-2 verstärkt wird und entsprechend über den Ryanodin-Rezeptor (RyR) vermehrt Kalzium ins Zytoplasma gelangt (Liu et al., 2009). In diesem Zusammenhang könnte auch die nachgewiesene Interaktion zwischen RGS8-mRNA und Ataxin-2 stehen (Dansithong et al., 2015). RGS8 gilt als Inhibitor des metabotropen Glutamatrezeptors, der durch seine Aktivität indirekt ebenfalls die intrazytoplasmatische Kalzium-Konzentration erhöht (Dansithong et al., 2015). Möglicherweise durch die Interaktion von Ataxin-2 mit der RGS8-mRNA liegt dessen Genprodukt bei der SCA2 vermindert vor und erzeugt somit eine Disinhibition des metabotropen Glutamatrezeptors, die zu vermehrter Kalzium-Freisetzung aus dem ER beiträgt. In einer folgenden Untersuchung an Mäusen, die in ihren PC Ataxin-2 mit 58 Glutaminen in der Poly(Q)-Domäne exprimierten (ATXN2-Q58-Mäuse), konnte gezeigt werden, dass eine Virus-abhängige dauerhafte Reduktion der IP3-Level eine Verbesserung der motorischen Koordination hervorrief (Kasumu et al., 2012).

Bezüglich seiner Funktion in der Modulation von SG und PB konnte nicht nachgewiesen werden, dass Ataxin-2 und expandiertes Ataxin-2 verschiedenartigen Einfluss auf diese RNP-Granula nehmen. Es konnte nur gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Ataxin-2-Konzentration und der Präsenz von SG besteht. Allerdings werden insbesondere SG und PB bzw. deren Dysregulation in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, bspw. bei der ALS, eine pathophysiologische Rolle zugewiesen (Wolozin & Ivanov, 2019). Daher ist auch diese mögliche physiologische Funktion von Ataxin-2 ein Ansatzpunkt für die Aufklärung der Pathogenese der SCA2.

1.6 Mögliche Therapieansätze der Spinozerebellären Ataxie Typ 2

Nach gegenwärtigem Stand gibt es keine kurativ wirksame Therapie der SCA2. Im Vordergrund stehen weiterhin symptomatische und supportive Maßnahmen, wie etwa Physiotherapie (Mumenthaler & Mattle, 2012).

Ein Ansatz zur Therapie der kausalen Pathomechanismen beruht auf sogenannten Antisense Oligonukleotiden. Nach diesem Prinzip, das bei anderen Erkrankungen

bereits angewendet wird, werden dem Patienten RNA-Oligonukleotide verabreicht, die komplementär zu der mRNA eines Zielproteins sind. Bei der SCA2 ist es das pathologisch veränderte Ataxin-2. Am Menschen wurde dieser Ansatz für die SCA2 noch nicht getestet. Scoles et al. konnten in einem ATXN2-Q127-Mausmodell zeigen, dass Injektionen von zuvor *in vitro* getesteten Antisense Oligonukleotiden die Konzentration des veränderten Ataxin-2 deutlich senkten und sich die motorischen Dysfunktionen der Mäuse besserten. Zur Umgehung der Blut-Hirn-Schranke mussten die Injektionen intraventrikulär erfolgen (Scoles et al., 2017). Eine Alternative zu dieser risikobehafteten Applikationsart stellten Ashizawa et al. 2019 vor. Sie zeigten, dass das Liposom *DCL64* Oligonukleotide aufnahm, die Blut-Hirn-Schranke überwinden und danach unter anderem in den PC des Kleinhirns nachgewiesen werden konnten (Ashizawa et al., 2019).

Die Blockade des Kalziums aus dem endoplasmatischen Retikulum freisetzenden RyR ist ein weiterer Ansatz, um einen möglichen Pathomechanismus der SCA2 zu unterbinden. Liu et al. zeigten, dass sich unter Gabe des RyR-Inhibitors Dantrolen in einem ATXN2-Q58-Mausmodell die Motorik der behandelten Mäuse besser entwickelte als die der Kontrollgruppe (Liu et al., 2009).

In der Literatur sind weitere Therapieansätze für die SCA2 beschrieben. Die Aktivierung von Kalium-Kanälen in der Membran von PC durch Riluzol führte in einer kleinen, heterogenen Patientengruppe mit verschiedenen hereditären zerebellären Ataxieformen zu leicht verbesserten motorischen Fähigkeiten (Romano et al., 2015). Ein anderes Prinzip verfolgen Asada et al. (2014). Sie zeigten, dass die *Cyclin-dependent kinase 5* Ataxin-2 phosphoryliert und damit dessen proteasomalen Abbau induziert (Asada et al., 2014), was die Konzentration von Ataxin-2 reduzieren und damit dessen angenommene toxische Wirkung bei der SCA2 abschwächen könnte. Dies könnte als therapeutischer Ansatz geeignet sein, da es in anderen Polyglutamin-Erkrankungen, wie bspw. Chorea Huntington, die Toxizität der Erkrankung in Neuronen abschwächt (Anne et al., 2007). Eine verstärkte Aktivierung der *Cyclin-dependent kinase 5* könnte somit therapeutisch auch bei der SCA2 wirksam sein. Dieser und weitere Ansätze sind allerdings bisher nicht über das Stadium der theoretischen Eignung hinausgekommen und müssen somit zunächst abgewartet werden.

1.7 Arbeitshypothese und Fragestellung

Trotz intensiver Forschung ist die intrazelluläre Funktion von Ataxin-2 bisher nicht eindeutig geklärt. Auch eine kurativ wirksame Therapie für die SCA2, bei der Ataxin-2 im Mittelpunkt des Forschungsinteresses steht, ist bisher nicht gefunden worden. Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, Interaktionspartner von Ataxin-2 zu identifizieren und damit dessen intrazelluläre Funktionsweisen genauer zu ergründen. Dazu soll Desoxyribonukleinsäure (DNA) von verschiedenen Ataxin-2-Varianten mittels eines Plasmids in humane Zellen eingebracht, die exprimierten Proteine über Affinitätspräzipitation aufgereinigt und danach die Interaktionspartner durch *Western Blot* unter Verwendung spezifischer Antikörper identifiziert werden. Über die nachgewiesenen Interaktionspartner sollen sich Rückschlüsse auf die Beteiligung und eventuelle Modulation intrazellulärer Prozesse durch Ataxin-2 ziehen lassen. Außerdem soll ein Vergleich der Bindungsmuster zwischen den unterschiedlich aufgebauten Ataxin-2-Varianten stattfinden, um die für die Bindungen erforderlichen Anteile des Proteins einzugrenzen. Weiterhin sollen Wildtyp- und Ataxin-2-Varianten mit expandierter Poly(Q)-Domäne auf ihre Bindungspartner hin untersucht werden, um über mögliche Unterschiede weiteres Licht auf die Pathophysiologie der SCA2 werfen zu können.

2 Material und Methoden

2.2 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Hersteller aller Chemikalien sind, wenn nicht anders angegeben, die Firmen Merck (Darmstadt), Roche (Penzberg), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Die Materialien wurden in höchstmöglicher Qualität bezogen.

2.1.2 Nährmedien und Seren

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Nährmedien und Seren

Name	Inhalt	Hersteller
<i>lysogeny broth</i> (LB) -Medium	1% Tryptone, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl pH 7,4	Arbeitsgruppe (AG) Kindler
<i>Dulbecco 's modified eagle medium (high-glucose)</i> (DMEM) -Kulturmedium		Gibco (Thermo Fisher Scientific), Dublin, Irland
10% fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>), hitzeinaktiviert		Sigma Aldrich

2.1.3 Weitere Lösungen

Tabelle 2: Übersicht über weitere verwendete Lösungen

Name	Inhalt	Verwendung
PBS (<i>phosphate-buffered saline</i>)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,76 mM KH ₂ PO ₄	Zellkultur
PBST (<i>phosphate-buffered saline + Tween 20</i>)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,76 mM KH ₂ PO ₄ , 0,3% Tween 20	<i>Western Blot</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS) - <i>Running</i>	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS	SDS-PAGE
Transferpuffer	20% Methanol, 192 mM Glycin, 25 mM Tris pH 8,3, 0,5% SDS	<i>Western Blot</i>
Radioimmunopräzipitationsassay (RIPA) -Puffer	10 mM Tris(hydroxymethyl) -aminomethan/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1% Natriumdeoxycholate, 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche))	Zellyse
Dilution-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA	Affinitätspräzipitation
Laemmli-Puffer	62,5M Tris/HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% 2-Mercaptoethanol, 1 mg/ml Bromphenolblau	Affinitätspräzipitation
Polyacrylamidgele (Mengen je nach PA-Gehalt des Gels, siehe Tab. X)	Doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O), 30% Acrylamid-Stammlösung (0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1), 1,5 M Tris pH 8,8, 10% SDS, 10% Ammoniumpersulfat, Tetramethylethylendiamin	SDS-PAGE

Tabelle 3: Mengen der Einzelkomponenten (in ml) der Lösungen für PA-Laufgele (je 30 ml Lösungsvolumen)

Komponente	8%-PA-Gel	10%-PA-Gel	12%-PA-Gel
ddH ₂ O	13,9	11,9	9,9
30% Acrylamid-Mix	8	10	12
1,5M Tris (pH 8,8)	7,5	7,5	7,5
10% SDS	0,3	0,3	0,3
10% Ammoniumpersulfat	0,3	0,3	0,3
Tetramethylethyldiamin	0,018	0,012	0,012

Tabelle 4: Mengen der Einzelkomponenten (in ml) der Lösungen für PA-Sammelgele (je 5 ml Lösungsvolumen)

Komponente	5%-PA-Sammelgel
ddH ₂ O	3,4
30% Acrylamid-Mix	0,83
1M Tris (pH 6,8)	0,63
10% SDS	0,05
10% Ammoniumpersulfat	0,05
Tetramethylethyldiamin	0,005

2.1.4 Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien

	Name	Hersteller
Bakterienstamm	Escherichia coli XL1-Blue	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Zelllinie	HEK-293-Zellen	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

2.1.5 Vektoren

Der Vektor pN22-EGFP-C1 (Abbildung 3) beruht auf dem bei Clontech Lab. (Mountain View, CA, USA) erhältlichen Vektor pEGFP-C1 und enthält zusätzlich einen Abschnitt, der 22 Aminosäurereste des N-Proteins des Bakteriophagen Lambda kodiert, sodass die vom ursprünglichen endogenen grün-fluoreszierenden Protein (EGFP) abgeleitete Variante N22-EGFP (hier nur als EGFP bezeichnet, Abbildung 4) kodiert wird. Bei den anderen Plasmiden wurden verschiedene Abschnitte der humanen Ataxin-2 komplementären DNA (cDNA) stromabwärts der EGFP-kodierenden Region in pN22-EGFP-C1 eingefügt. Die vollständige Ataxin-2 cDNA ist in pN22-EGFP-hAtx2-Q22 (Abbildung 3) enthalten (GenBank Zugangsnummer U70323.1, Nukleotide 1-3936). Entsprechend kodiert dieses Plasmid ein Fusionsprotein aus dem oben beschriebenen N22-EGFP und dem humanen Ataxin-2 mit einer 22 Aminosäurereste umfassenden Poly(Q)-Domäne, hier EGFP-Ataxin-2 (Abbildung 4) bezeichnet. pN22-EGFP-hAtx2-Q81 kodiert ein Fusionsprotein, das 59 weitere Glutamine, insgesamt also 81 Glutamine, in der Poly(Q)-Domäne aufweist, EGFP-Q81-Ataxin-2 (GenBank Zugangsnummer U70323.1: Nukleotide 1-3936, 177 weitere Nukleotide zwischen Nukleotid 561 und 562; Zugangsnummer AAB19200.1: 59 weitere Aminosäuren zwischen Aminosäure 187 und 188). pN22-EGFP-hAtx2-Q22-β3 kodiert ein Fusionsprotein (EGFP-β3-Ataxin-2), das an drei Stellen einen Aminosäureaustausch aufweist. Die Nukleotide 1066 bis 1074 wurden von TTGGTACTT (GenBank Zugangsnummer U70323.1) zu AAGGAAAAG verändert. Die Aminosäuren 302 und 304 wurden entsprechend jeweils von Leucin zu Lysin und die Aminosäure 303 von Valin zu Glutaminsäure verändert (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1). pN22-hAtx2-Q22-F920A weist Veränderungen an den Nukleotiden 2919 bis 2921 (TTC zu GCC) auf (GenBank Zugangsnummer U70323.1). Im kodierten

Fusionsprotein (EGFP-F920A-Ataxin-2) ist entsprechend die Aminosäure 920 innerhalb der PAM2-Domäne (Miroci et al., 2012) von Phenylalanin zu Alanin verändert (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1). pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-590 enthält einen Teil der humanen Ataxin-2 cDNA (GenBank Zugangsnummer U70323.1, Nukleotide 1771-3936) und kodiert ein Fusionsprotein (EGFP-Δ1-590-Ataxin-2), welches die Aminosäuren 591 bis 1312 enthält (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1). Auch pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-509 enthält einen Teil der humanen Ataxin-2 cDNA (GenBank Zugangsnummer U70323.1, Nukleotide 1528-3936) und kodiert ein Fusionsprotein (EGFP-Δ1-509-Ataxin-2), welches die Aminosäuren 510 bis 1312 enthält (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1). pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ67-245 enthält ebenfalls einen Teil der humanen Ataxin-2 cDNA (GenBank Zugangsnummer U70323.1, Nukleotide 1 bis 198 und 246-3936) und kodiert ein Fusionsprotein (EGFP-Δ67-245-Ataxin-2), welches die Aminosäuren 1 bis 66 und 246 bis 1312 enthält (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1). Auch pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-813 enthält einen Teil der humanen Ataxin-2 cDNA (GenBank Zugangsnummer U70323.1, Nukleotide 2440-3936) und kodiert ein Fusionsprotein (EGFP-Δ1-813-Ataxin-2), welches die Aminosäuren 814 bis 1312 enthält (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1). Zuletzt enthält auch pN22-EGFP-hAtx2LSm einen Teil der humanen Ataxin-2 cDNA (GenBank Zugangsnummer U70323.1, Nukleotide 925-1587) und kodiert das Fusionsprotein (EGFP-Ataxin-2-LSm-Domäne), welches die Aminosäuren 309 bis 529 enthält (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1).

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Vektoren

Eukaryotische Expressionsvektoren	Kodiertes Protein	Veränderungen	Sequenzprimer
pN22-EGFP-hAtx2-Q22 (#4)	EGFP-Ataxin-2	-	EGFP-1S Atx2-32S SVPA2
pN22-EGFP-hAtx2-Q81 (#15)	EGFP-Q81-Ataxin-2	-	EGFP-1S Atx2-32S SVPA2
pN22-EGFP-hAtx2-Q22-β3 (#22)	EGFP-β3-Ataxin-2	#22: <i>Single-nucleotide polymorphism</i> an Position 2117 (GGC>GGT → bleibt „G“)	EGFP-1S Atx2-32S Atx2-34S SVPA2
pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A (#17)	EGFP-F920A-Ataxin-2	-	EGFP-1S Atx2-32S Atx-37S SVPA2
pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-590 (#2)	EGFP-Δ1-590-Ataxin-2	-	EGFP-1S SPVA2
pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-509 (#7)	EGFP-Δ1-509-Ataxin-2	-	EGFP-1S SVPA2
pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ67-245 (#14)	EGFP-Δ67-245-Ataxin-2	-	EGFP-1S SVPA2
pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-813 (#19)	EGFP-Δ1-813-Ataxin-2	-	EGFP-1S SVPA2
pN22-EGFP-hAtx2-LSm (#8)	EGFP-Ataxin-2-LSm-Domäne	-	EGFP-1S SVPA2
pN22-EGFP-C1	EGFP	-	CMV-3S SVPA2

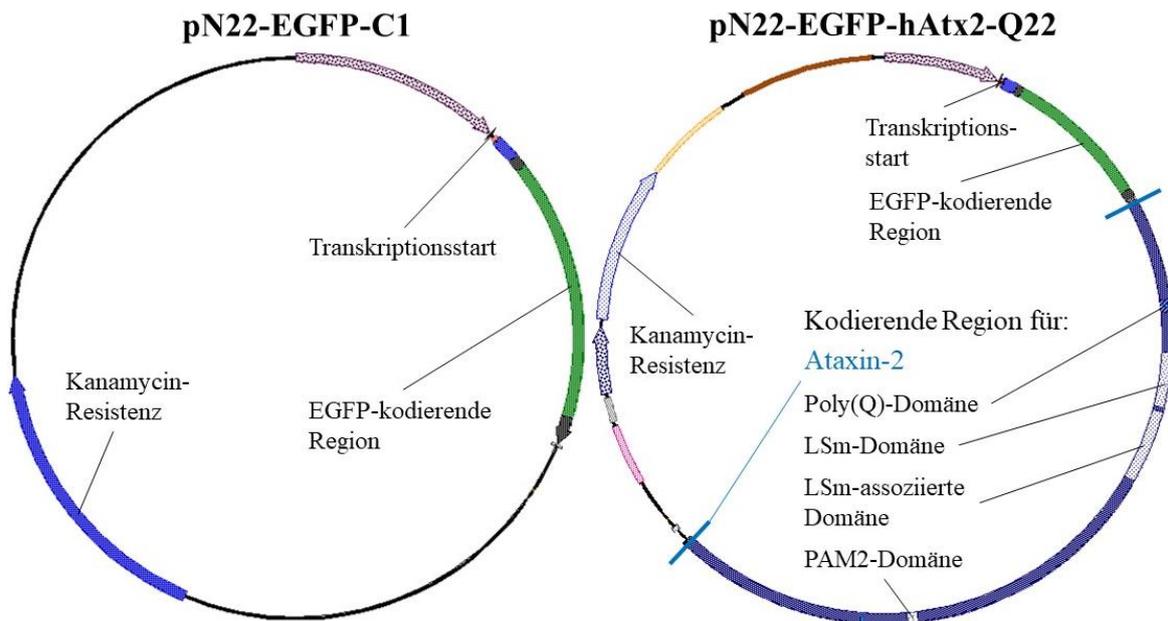


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Grundvektors pN22-EGFP-C1 und des Vektors pN22-EGFP-Q22 mit der vollständigen kodierenden Region des humanen Ataxin-2. Eingezeichnet sind für diese Untersuchung relevante Regionen.

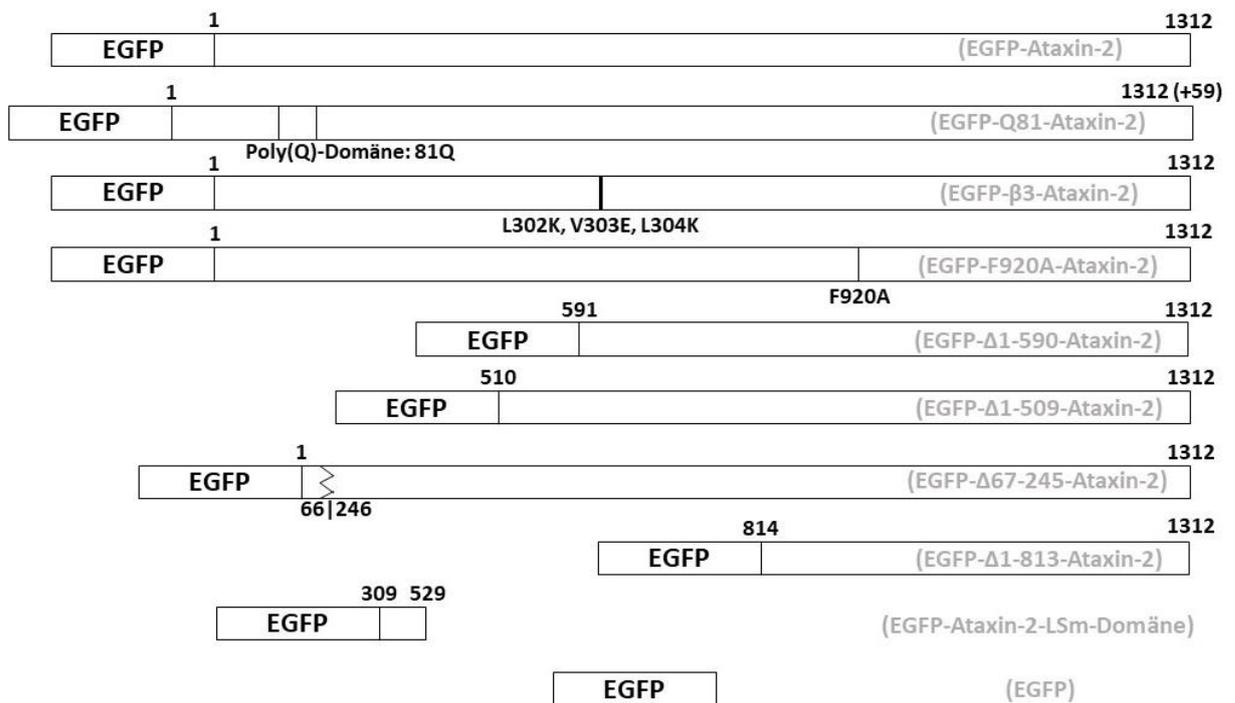
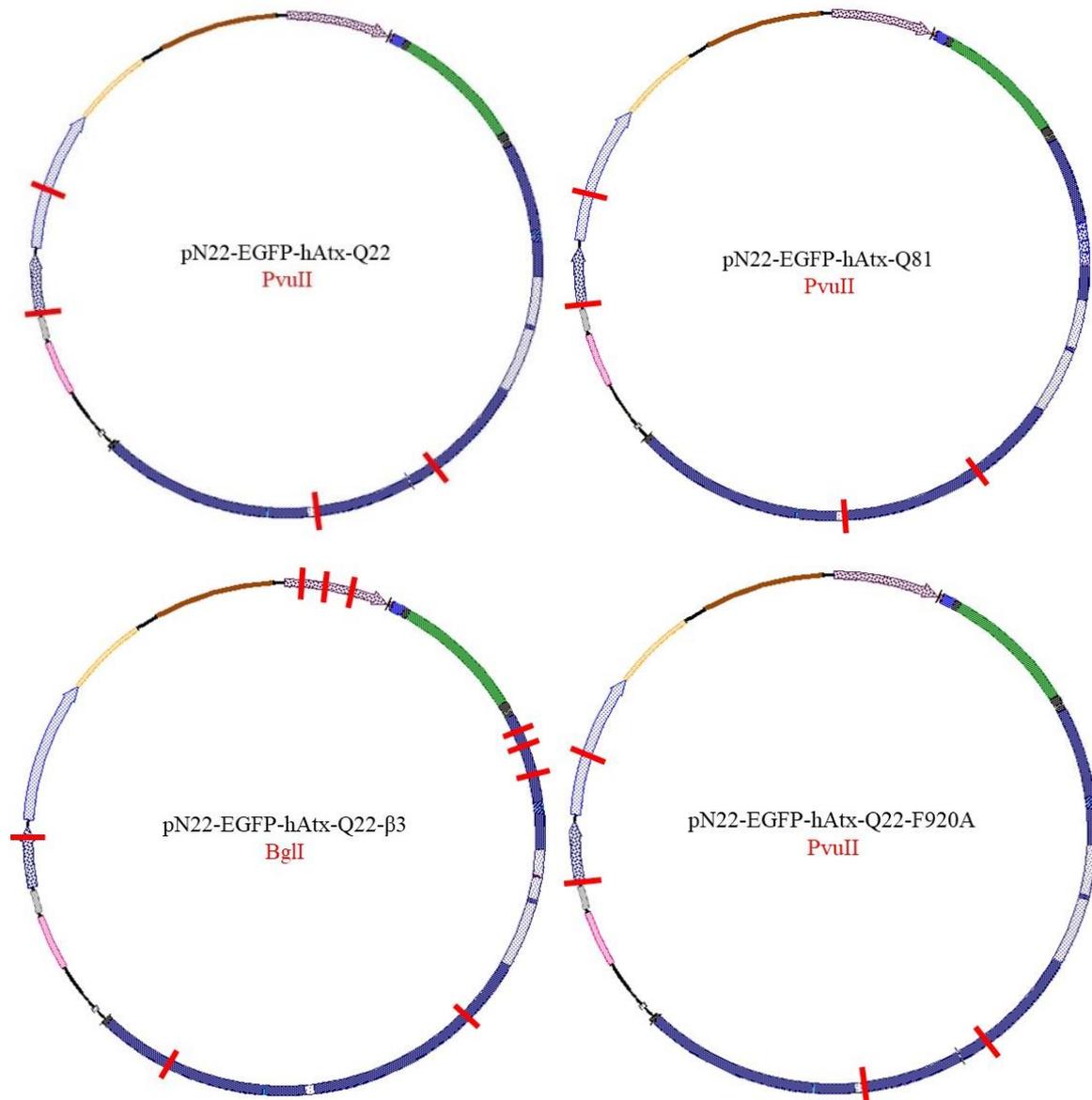


Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten Fusionsproteine. Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäure-Position innerhalb des menschlichen Ataxin-2. Dies enthält 1312 Aminosäuren (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1). Das Fusionsprotein Q81-Ataxin-2 enthält 59 zusätzliche Aminosäuren innerhalb der Poly(Q)-Domäne.

2.1.6 Restriktionsenzyme

Es wurden die Restriktionsenzyme BamHI, BglII, EcoRI, NcoI, NdeI und PvuII der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet. Abbildung 5 zeigt die Stellen, an denen das jeweilige Restriktionsenzym das Plasmid schneidet.



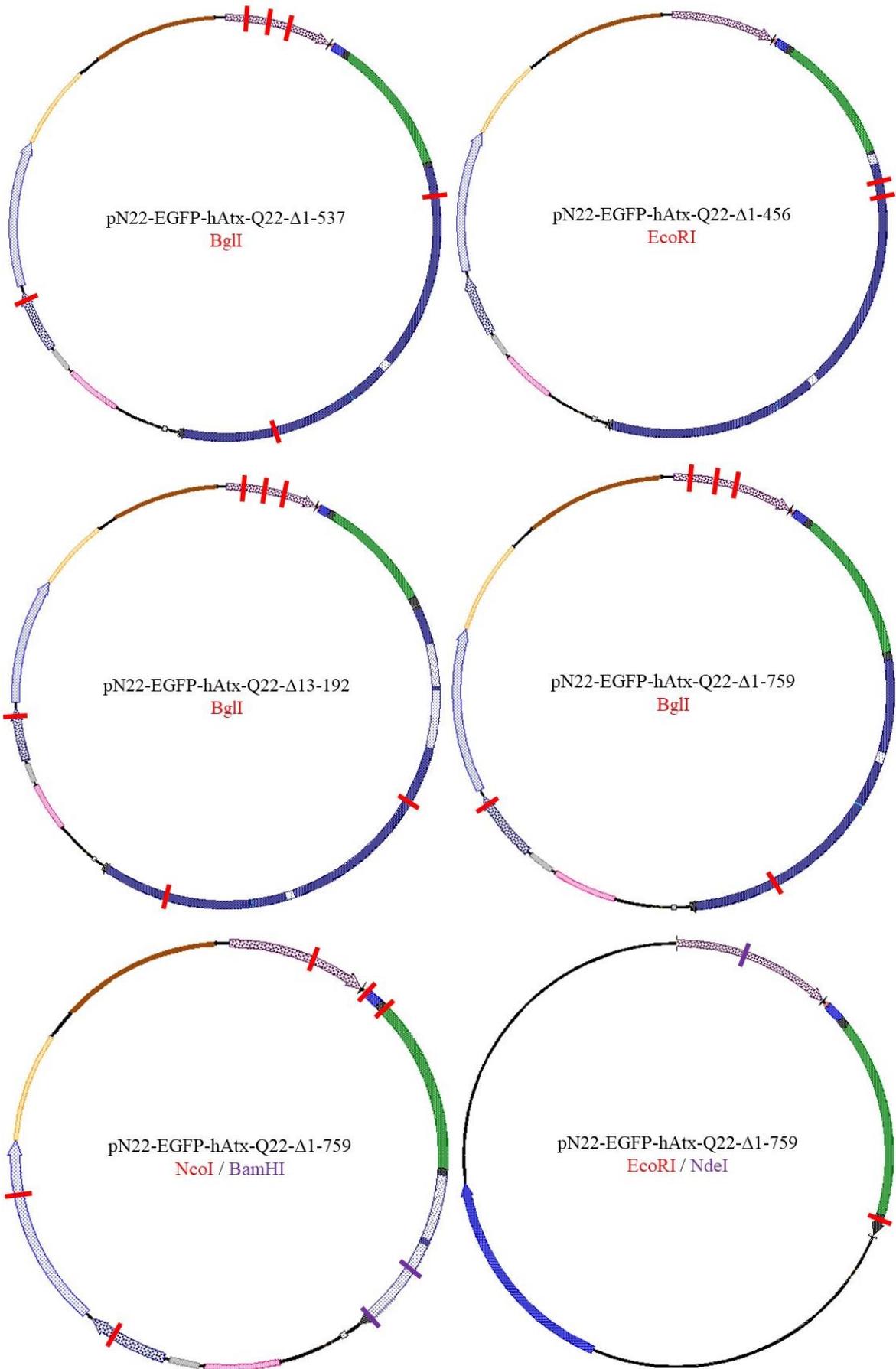


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vektoren mit eingezeichneten Schnittstellen der Restriktionsenzyme.

2.1.7 Kits

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Kits

Name	Hersteller
NucleoBond® Xtra plasmid purification	Macherey-Nagel, Düren
Molecular Probes™ Quant-iT™ Qubit™ Protein-Assay	Thermo Fisher Scientific
BigDye™ Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing (#4337458)	Thermo Fisher Scientific

2.1.8 Sequenzprimer

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Sequenzprimer

Sequenz-Primer	Erkennungssequenz
Atx32S	CGGCGGCTCCTTGGTCTC
Atx34S	CTCCAAATGTGAAGTACAAGTG
Atx37S	CCCAATGAAACATCACCTAGC
CMV-3S	GGTAGGCGTGTACGGTGG
EGFP-1S	GGTAGGCGTGTACGGTGG
SVPA2	ATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAG

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Primäre Antikörper

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper

Antigen (<i>Spezies</i>)	Verdün- nung	Lösung	Größe des de- tektierten Proteins im <i>Western Blot</i>	Hersteller
COP β I (<i>rabbit</i>)	1:2000	5% Milch/PBST	120	Bethyl Labo- ratories Inc, Montgomery, TX, USA
α -GFP (<i>mouse</i>)	1:2500	5% Milch/PBST	27	Covance, Princeton, NJ, USA
α -IMP1 (<i>rabbit</i>)	1:1000	5% bovines Serumalbumin/ PBST	72	AG Kindler
α -LSM12 (<i>rabbit</i>)	1:590	5% Milch/PBST	20	Sigma Aldrich
α -EDC3 (<i>mouse</i>)	1:100	5% Milch/PBST	56	Abnova, Hei- delberg
α -MOV10 (<i>rabbit</i>)	1:1000	5% Milch/PBST	125	Abcam, Cambridge, UK
α -PABP1 (<i>rabbit</i>)	1:1000	5% Milch/PBST	80	Evita Mohr, UKE, Inst. f. Neuroanato- mie, Hamburg

2.1.9.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper

Name	Verdünnung	Hersteller
<i>Enhanced chemoluminescence (ECL)TM Anti-mouse IgG (horseradish peroxidase linked whole antibody)</i> Schaf	1:2000	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
<i>ECLTM Anti-rabbit IgG (horseradish peroxidase linked whole antibody)</i> Esel	1:2000	GE Healthcare

2.1.10 Chemilumineszenz-Substrat

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Chemilumineszenz-Substrate

Name	Hersteller
<i>WesternBrightTM ECL</i>	Advansta, Menlo Park, CA, USA
<i>WesternBrightTM Peroxide</i>	Advansta

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien

Ansatz

- 100 µl kompetente Bakterien (Escherichia coli XL1-Blue)
- 20 µl 5x KCM (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl₂)
- 0,2 µl Plasmid-DNA
- 79,8 µl ddH₂O
- 1 ml LB-Medium

Durchführung

Die Herstellung der kompetenten Bakterien erfolgte nach der Methode nach Walhout (Walhout et al., 2000). Danach wurden die Zellen bei -80°C gelagert. Die E. coli-Suspension wurde zur Transformation auf Eis aufgetaut. Separat wurden 5x KCM, Plasmid-DNA und ddH₂O gemischt. Danach wurden beide Ansätze zusammengegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Erwärmung bei 37°C für fünf Minuten. Dann wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C und 1100 rpm im Thermomixer belassen. Danach wurden 70 µl der Lösung mittels eines mit 70% Ethanol (EtOH) desinfizierten Drigalskispaltels auf kanamycinhaltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Pro Konstrukt wurde am nächsten Tag ein Klon der transformierten Bakterien mittels einer Pipettenspitze gepickt. Diese wurde in 2 ml kanamycinhaltiges (125 µg/ml) LB-Medium gelegt und bei 37°C und 200 rpm für sechs Stunden im Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde diese Vorkultur in eine Hauptkultur mit 300 ml kanamycinhaltigem (25 µg/ml) LB-Medium überführt. Die Hauptkultur wurde über Nacht (>16 Stunden) bei 37°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert.

2.2.1.2 Isolierung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien erfolgte mit dem *NucleoBond® Xtra plasmid purification*-Kit. Dieses wurde nach den

Herstellerangaben verwendet. Nach der Gewinnung der DNA mittels Affinitätsäulen wurde das getrocknete DNA-Pellet in 500 µl Tris-EDTA (TE) -Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.2.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in den Plasmid-Lösungen wurde anschließend in einer geeigneten Verdünnungsstufe im *NanoDrop 100*-Photometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Hierzu wurde die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die ermittelten DNA-Konzentrationen erlaubten eine Angleichung der Konzentrationen in den Plasmid-Lösungen der verschiedenen Konstrukte auf jeweils 1 µg/µl.

2.2.1.4 Kontrolle der Plasmid-DNA

Die Qualität der Plasmid-DNA wurde mit drei Verfahren beurteilt.

1 Gelelektrophorese unverdauter Plasmide

Für jedes Konstrukt wurde ein Ansatz mit 9 µl ddH₂O, 2 µl 6x DNA-Ladepuffer und 1 µl Plasmid-DNA hergestellt. Diese 12 µl wurden in die Taschen eines 1%igen Agarosegels, welches mit 2 µl Ethidiumbromidlösung versetzt wurde, einpipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V für etwa 20 Minuten in 1x Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer. Mittels Ultraviolett-Licht konnten im Anschluss das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid und damit die Banden der in verschiedenen Formen (geschlossen ringförmig, offen ringförmig und linear) vorliegenden Plasmid-DNA sichtbar gemacht werden. Als Größenmarker diente die *GeneRuler DNA-Ladder 1 kb* (Thermo Fisher Scientific).

2 Gelelektrophorese verdauter Plasmide

Für jedes Konstrukt wurde ein Ansatz mit 7 µl ddH₂O, 1 µl dem Konstrukt entsprechendem Restriktionsenzym, 1 µl dem Restriktionsenzym entsprechendem Puffer und 1 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) hergestellt. Diese 10 µl wurden für 90 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert. Bei Bedarf wurde ein zweiter Ansatz mit einem weiteren Enzym und entsprechendem Puffer dem ersten Ansatz hinzugefügt und noch einmal für 90 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Gelelektrophorese wie in 1) beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

3 Sequenzierung

Für jedes Konstrukt wurde unter Verwendung des *BigDye*TM *Terminator*-Kits (Thermo Fisher Scientific) ein Ansatz mit 6 µl ddH₂O, 2 µl 5x Sequenz-Puffer, 1 µl BDT-Enzymmix, 0,5 µl Primer und 0,5 µl DNA (1 µg/µl) hergestellt. In diesem Ansatz wurde die DNA anhand folgenden Schemas für die Sequenzierung vorbereitet:

- 5 Minuten 96°C
- 29 Zyklen je:
 - 30 Sekunden 96°C
 - 15 Sekunden 55°C
 - 4 Minuten 60°C
- 4 Minuten 72°C
- Abkühlung auf 4°C

Im Anschluss wurden zu diesem 10 µl-Ansatz 10 µl ddH₂O, 2 µl 3M Natriumacetat pH 5,2 und 50 µl 100% EtOH hinzugegeben und gevortext. Einer Zentrifugation (30 Minuten, 4°C und 3.000 xg) und einem Dekantieren folgte eine Zugabe von 100 µl 70% EtOH. Nach einem leichten Invertieren erfolgte wiederum eine Zentrifugation (30 Minuten, 3000 xg, Raumtemperatur), ein Dekantieren und eine Abnahme des restlichen Überstands. Nach der Zugabe von 20 µl HiDiTM Formamid (Thermo Fisher Scientific, #4440753) folgte die Sequenzierung der DNA.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur HEK293-Zellen

Es wurden HEK293-Zellen verwendet, die bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert wurden. Nährmedium war DME-Medium mit 10% fetalem Kälberseum. Es erfolgte eine regelmäßige Passagierung der Zellen zur Gewährleistung eines normalen Wachstums. Hierbei wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die Kulturplatte mit 10 ml

PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde 1 ml 1% Trypsin in PBS auf die Platte gegeben und für etwa 1 Minute bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Trypsinierung mittels frischen Nährmediums gestoppt und die abgelösten Zellen in geeigneter Verdünnung auf neue Platten mit Nährmedium verteilt.

2.2.2.2 Transfektion

Die Transfektion erfolgte, wenn die Kulturplatten zu etwa 60% bewachsen waren. Dazu wurde zunächst ein Transfektionsmedium erstellt. Hierbei wurden pro ml DMEM 10 µl 1 µg/µl-Plasmid-DNA und 20 µl *TurboFectTM* (Thermo Fisher Scientific) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde je 1 ml dieses Ansatzes auf eine Kulturplatte gegeben. Pro Konstrukt wurden 2 Platten transfiziert. Nach einer Inkubation der Platten für 48 Stunden im Brutschrank (37°C) wurde die Transfektionsdichte mittels eines Mikroskops untersucht. Dabei erfolgte eine Anregung des in allen Fusionsproteinen vorhandenen EGFP mit Ultraviolett-Licht, was eine sichtbare grüne Fluoreszenz hervorrief.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Nach der oben genannten Inkubation der transfizierten Zellen erfolgte die Herstellung der Zelllysate. Dazu wurden die Platten zunächst zweimalig mit 5 ml kaltem PBS gewaschen. Danach wurden auf jede Platte 2 ml RIPA-Puffer gegeben und die Platten unter Schwenken 15 Minuten auf Eis permeabilisiert. Dann wurde das entstandene Lysat in 2 ml-Eppendorf-Tubes überführt und noch einmal 30 Minuten unter regelmäßiger Vermischung mittels Pipette auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation (1 Stunde, 16100 xg, 4°C) und die Überführung des klaren Überstandes in ein 15 ml-Falcon-Gefäß. Hierbei wurden die Lysate der gleichen Konstrukte gepoolt. Je 160 µl der Lysate wurden als *Input* abgenommen, mit 40 µl 5x Laemmli 5 Minuten bei 95°C gekocht und im Anschluss bei -20°C gelagert. Weiterhin wurden jeweils 10 µl des Lysats als Material zur Bestimmung des Proteingehalts abgenommen, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Proteingewinnung (Affinitätspräzipitation)

Die Isolierung der EGFP-markierten Proteine aus den HEK293-Zellen erfolgte mit der *GFP-Trap*®-Methode (ChromoTek, Planegg-Martinsried, Deutschland).

Tiere der *Camelidae*-Familie (bspw. Kamele, Lamas, Dromedare) weisen eine spezielle Klasse von Antikörpern, sogenannte Schwere Ketten-Antikörper, auf. Diese besitzen im Gegensatz zu humanen Antikörpern keine leichten Ketten und beinhalten sogenannte *variable heavy homodimer* (V_{HH}) -Domänen, welche ein sehr geringes Molekulargewicht aufweisen (Hamers-Casterman et al., 1993). GFP spezifisch bindende V_{HH} -Domänen werden für die *GFP-Trap*® als Einzeldomänenantikörper zur Beschichtung einer monovalenten Agarose-Matrix (*Beads*) verwendet. Nach der Bindung des GFP-Teils durch die spezifischen V_{HH} -Domänen erfolgt die Auftrennung mittels Zentrifugation.

In einem ersten Schritt wurden je Konstrukt 50 μ l *Bead-Slurry* (*GFP-Trap*®-Matrix) dreimalig mit Dilution-Puffer unter Zuhilfenahme von Zentrifugation (2 Minuten, 2700 xg, 4°C) gewaschen. Danach wurden die *Beads* in Dilution-Puffer suspendiert und mit je 2 μ l Hefe tRNA, bovinem Serumalbumin und Glykogen pro 40 μ l eingesetztem *Bead-Slurry* versetzt. Diese *Bead*-Suspension wurde nach etwa 90-minütiger Inkubation auf dem Rotator (langsame Rotation, 4°C) zentrifugiert (2 Minuten, 2700 xg, 4°C) und nach Abnahme des Überstands in 500 μ l RIPA-Puffer suspendiert. Anschließend wurde diese Suspension den auf oben genannte Weise (2.2.3.1) hergestellten Zelllysaten hinzugefügt. Je 2 ml Lysat wurden zusätzlich 3 ml Dilution-Puffer dazugegeben. Danach folgte eine Inkubation auf dem Rotator (2 Stunden, langsame Rotation, 4°C).

Nach der Inkubation erfolgte die Zentrifugation (2 Minuten, 2000 xg, 4°C) zur Trennung der *Beads*, an welche die GFP-markierten Proteine gebunden hatten, vom übrigen Zelllysate. Dann folgte ein sechsmaliges Waschen der *Bead*-Suspension mit Dilution-Puffer. Abschließend wurde die Suspension mit 200 μ l 2x Laemmli eluiert, zum Lösen der Immunkomplexe 10 Minuten bei 95°C gekocht und bei -20°C gelagert. Die weitere Analyse erfolgte mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und *Western Blot*.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinmenge der Lysate

Zur Bestimmung der Proteinmenge in den *Inputs* für die SDS-PAGE erfolgte eine Analyse der je 10 µl entnommenen Lysats mit dem *Molecular Probes™ Quant-iT™ Qubit™ Protein-Assay-Kit* (Thermo Fisher Scientific). Dazu wurde zunächst eine Arbeitslösung aus 199 µl *Qubit™*-Puffer und 1 µl *Qubit™*-Reagenz je analysierter Probe hergestellt. Dann wurden zur Eichung des Geräts drei Standards (Standards 1, 2 und 3) erstellt, die aus je 10 µl dem Kit entnommener Standard-Lösung und 190 µl Arbeitslösung bestanden. Die eigentliche Analyse der Proben bestand aus zwei Durchläufen. Zum einen erfolgte eine Analyse der unverdünnten Lysate, bei denen je Konstrukt 1 µl Lysat mit 199 µl Arbeitslösung zusammengegeben wurden. Zum anderen erfolgte eine 1:10-Verdünnung jedes Lysats mit ddH₂O. Von diesem Ansatz wurden ebenfalls je 1 µl mit 199 µl Arbeitslösung zusammengegeben. Alle Ansätze wurden 2 bis 3 Sekunden gevortext und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgte eine Messung mit dem *Qubit® 2.0 Fluorometer*. Anhand der Ergebnisse der Messungen wurden jede 160 µl Lysat, die mit 40 µl 5x Laemmli gemischt worden waren, mit weiterem 5x Laemmli auf die Konzentration des Lysats gebracht, das die niedrigste Proteinkonzentration aufwies.

2.2.3.4 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE

Die Proteinauftrennung erfolgte gelelektrophoretisch mit PA-Gelen in einer SDS-Lösung. Zunächst wurde anhand der zu untersuchenden Proteine der PA-Gehalt des Laufgels zwischen 8% und 12% festgelegt (Sambrook & Russell, 2001). Für kleinere Proteine wurden die höherprozentigen, für größere die niedrigprozentigen Gele verwendet. Dann wurden die entsprechenden Komponenten (Tabelle 3) zusammenpipettiert. Anschließend wurde dieser Ansatz zwischen zwei Glasplatten gegossen und für etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur zur Polymerisation belassen. Zur Vermeidung von Luftblasen wurden über das polymerisierende Gel einige ml 70% EtOH gegeben, welche im Anschluss wieder abgelassen werden konnten. Im Anschluss wurde über das polymerisierte Laufgel ein 5% PA enthaltendes Sammelgel aus denselben Komponenten (Tabelle 4) gegossen, in welches mittels Kämmen Taschen eingefügt wurden. Die Glasplatten mit dem enthaltenen Gel wurden unter Verwendung des *Mini PROTEAN® Tetra Cell Systems* (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) in die

SDS-Lösung gestellt und die zu untersuchenden Proben in die Taschen zugegeben. Zur Kontrolle der Affinitätspräzipitation wurden zunächst jeweils 20 µl des Lysats (*Input*) und des Affinitätspräzipitats verwendet. In den folgenden SDS-PAGE wurden je 50 µl für die Analyse der Lysate und je 25 µl für die der Präzipitate einpipettiert. Als Marker wurden 7 µl der *PageRuler, prestained Protein Ladder Plus* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Als Spannungsgerät wurde das *Tetra Cell System* (BioRad Laboratories) genutzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V, 3 A und 300 W für etwa 3 Stunden (Ausubel et al., 2002).

2.2.3.5 Proteintransfer mittels *Western Blot*

Zum immunologischen Nachweis erfolgte nach ausreichender elektrophoretischer Auftrennung der *Inputs* und Präzipitate der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran. Die PA-Gele wurden aus der SDS-Lösung entnommen und mit einer Nitrocellulose-Membran zwischen zwei Blätter *Whatman*-Papier gelegt. Dieses wurde mittels zweier Schwämme unter gleichmäßigem Druck in einer Klemme in eisgekühlten Transferpuffer gestellt. Durch einen Rührfisch wurde eine gleichmäßige Temperaturverteilung im Transferpuffer gewährleistet. Ebenfalls unter Verwendung des BioRad-Systems erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Laufgel auf die Nitrocellulose-Membran bei 100 V, 3 A und 300 W für 90 Minuten. Nach dem Transfer wurde die Membran mindestens 15 Minuten in Ponceau S-Lösung (Sigma Aldrich) gelegt, um den Transfer der Proteinbanden zu kontrollieren, und vor den nächsten Schritten mit ddH₂O gewaschen.

2.2.3.6 Immunologische Proteindetektion

Zur genaueren Untersuchung der Banden erfolgte als nächstes die Inkubation mit verschiedenen Antikörpern, die gegen vermutete Proteine auf der Membran gerichtet waren. Dazu wurde diese zunächst in 10%iger Milchlösung in PBST 60 Minuten auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen eingeführt, in dem sich etwa 3 ml Lösung des primären Antikörpers (Tabelle 9) befanden. Dann erfolgte eine Rotation der Reaktionsgefäße über Nacht (4°C).

Am nächsten Tag wurde die Membran aus dem Röhrchen entnommen und dreimalig mit PBST gewaschen. Dann erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit einem

sekundären Antikörper (Tabelle 10) in 10 ml PBST, welche von erneutem dreimaligem Waschen in PBST gefolgt wurde. Im Anschluss wurde die Nitrocellulose-Membran vollständig mit zuvor vermischter Hell- und Dunkelreagenz (*Western-BrightTM Peroxide* und *ECL- Chemiluminscent Detection Reagents*, Advansta; je 150 µl, Tabelle 11) benetzt und 5 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Abschließend wurde die Chemilumineszenz über den *Molecular Imager ChemiDOC XRS* (BioRad Laboratories) mit verschiedener Belichtungszeit aufgezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Kontrolle der DNA

3.1.1 Analyse der Plasmide mittels Gelelektrophorese

Um zu untersuchen, ob nach der Aufreinigung DNA vorlag und ob es sich dabei um Plasmid- und nicht etwa genomische DNA der Bakterien handelte, wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung der TE-Pufferlösung (siehe 2.2.1.2-.4) ohne Enzymverdau durchgeführt. Es zeigten sich für die meisten Plasmide zwei Banden, die auf die geschlossen ringförmige (*supercoiled*, etwas schneller im Gel laufend) und offen ringförmige Form der Plasmid-DNA zurückgehen. Bei den Plasmiden pN22-EGFP-hAtx2LSm und pN22-EGFP-C1 zeigt sich eine dritte Bande, die auf die lineare Form der Plasmid-DNA zurückgeführt werden kann (Abbildung 6).

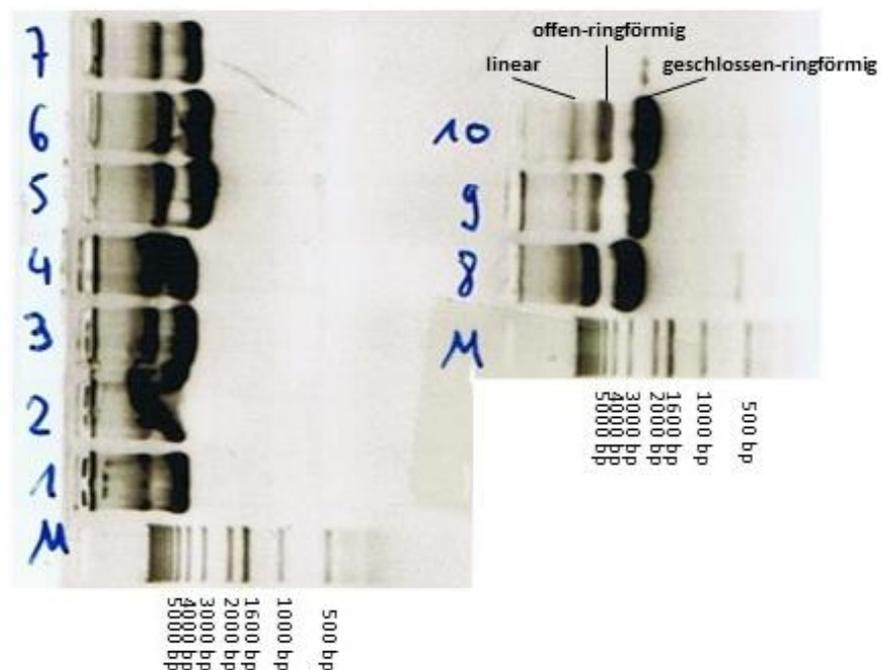


Abbildung 6: Gelelektrophorese zur Auftrennung der Plasmidformen geschlossen ringförmig (*supercoiled*), offen ringförmig und linear in 1%igem Agarose-Gel. In aufsteigender Nummerierung stellen sich (1) pN22-EGFP-hAtx2-Q22, (2) pN22-EGFP-hAtx2-Q81, (3) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-

β3, (4) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A, (5) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-590, (6) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-509, (7) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ67-245, (8) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-813, (9) pN22-EGFP-hAtx2LSm sowie (10) pN22-EGFP-C1 dar. Als Marker diente die *GeneRuler DNA-Ladder 1 kb* (Thermo Fisher Scientific). bp: Basenpaare

Um die Plasmid-DNA auf größere Deletionen oder Verunreinigungen hin zu untersuchen, erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung nach einem Verdau durch Restriktionsenzyme. Die Enzyme schneiden die Plasmide so, dass sich in der Auftrennung ein für jedes Plasmid spezifisches Muster ergibt, welches mit sich aus diesem Restriktionsverhalten ableitenden Vorlagen (Abbildung 5 (2.1.6) und 7) abgeglichen werden kann. Im Vergleich der Bandenmuster der elektrophoretischen Auftrennung (Abbildung 8) mit der Vorlage zeigen sich keine Unterschiede. Für die hier eingesetzten Plasmide ergibt sich somit kein Hinweis auf eine Veränderung. Geringfügige Veränderungen an den Plasmiden, etwa durch kleinere Deletionen oder Punktmutationen, rufen in dieser Methode meist keine Veränderungen des Bandenmusters hervor.

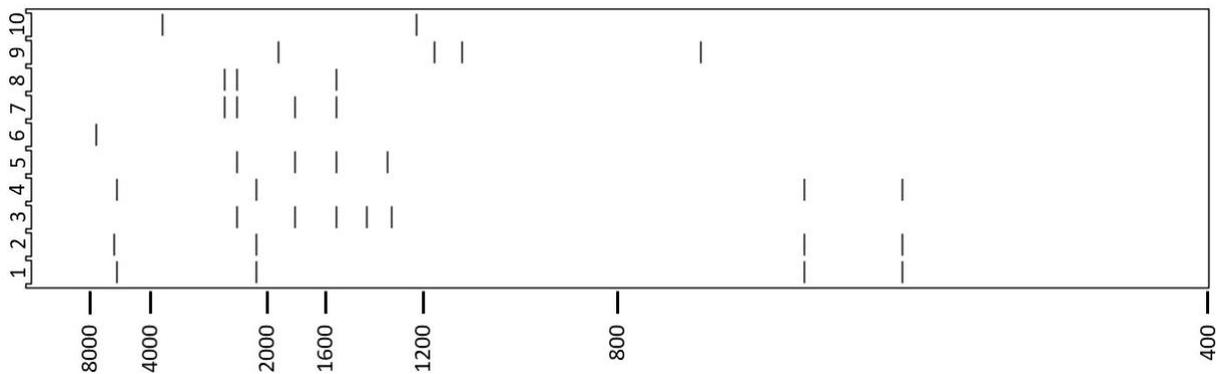


Abbildung 7: Schematische Darstellung des erwarteten Bandenmusters der Gelelektrophorese der verdauten Plasmide. Die Prognose basiert auf den bekannten Schnittstellen der Restriktionsenzyme und Größen der eingesetzten Vektoren. In aufsteigender Nummerierung stellen sich die Plasmide (verwendeten Restriktionsenzyme) (1) pN22-EGFP-hAtx2-Q22 (PvuII), (2) pN22-EGFP-hAtx2-Q81 (PvuII), (3) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-β3 (BglII), (4) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A (PvuII), (5) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-590 (BglII), (6) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-509 (EcoRI), (7) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ67-245 (BglII), (8) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-813 (BglII), (9) pN22-EGFP-hAtx2LSm (NcoI/BamHI) sowie (10) pN22-EGFP-C1 (NdeI/EcoRI) dar.

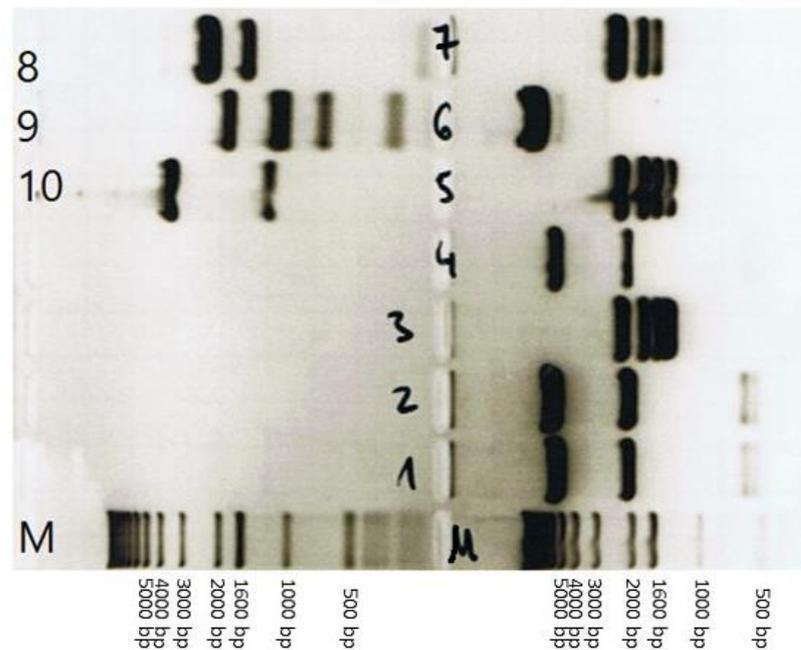


Abbildung 8: Gelelektrophorese zur Auftrennung der Restriktionsfragmente. Für jedes Plasmid stellen sich mehrere Banden dar, die je nach ihrer Größe im Gel fortgeschritten sind. In aufsteigender Nummerierung stellen sich die Plasmide (verwendeten Restriktionsenzyme) (1) pN22-EGFP-hAtx2-Q22 (PvuII), (2) pN22-EGFP-hAtx2-Q81 (PvuII), (3) pN22-EGFP-hAtx2-Q22- β 3 (BglII), (4) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A (PvuII), (5) pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-590 (BglII), (6) pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-509 (EcoRI), (7) pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 67-245 (BglII), (8) pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-813 (BglII), (9) pN22-EGFP-hAtx2LSm (NcoI/BamHI) sowie (10) pN22-EGFP-C1 (NdeI/EcoRI) dar. Als Marker diente die *GeneRuler DNA-Ladder 1 kb* (Thermo Fisher Scientific).

3.1.2 Analyse der Plasmide mittels Sanger-Sequenzierung

Zur Untersuchung der Plasmid-DNA auf kleinere Deletionen oder Punktmutationen erfolgte eine Sanger-Sequenzierung. In der Untersuchung zeigten keine Hinweise auf Veränderungen der Sequenzen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass keine Mutationen in den transformierten Bakterien aufgetreten sind und die Plasmide der Sequenz entsprechen, die für Ataxin-2 bekannt ist.

3.2 Western Blots

3.2.1 Bisherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kindler

Um das Spektrum an möglichen Interaktionspartnern von Ataxin-2 einzugrenzen, erfolgte vor Durchführung der vorliegenden Arbeit eine massenspektrometrische Analyse des Affinitätspräzipitats von EGFP-Ataxin-2 aus HEK293-Zellen durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Kindler. Sie nutzten dazu ebenfalls das *GFP-Trap*®-Protokoll. Dabei fanden sie über 80 Proteine, vor allem aus dem Bereich des DNA/ RNA-Metabolismus, aber auch Komponenten des Zytoskeletts und Chaperone.

Für diese Arbeit wurden mehrere dieser über Massenspektrometrie nachgewiesenen putativen Interaktionspartner ausgewählt. Für diese sollte untersucht werden, ob es Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen Wildtyp- und Ataxin-2 mit expandierter Poly(Q)-Domäne gibt. Weiterhin sollte anhand möglicherweise unterschiedlichen Bindungsverhaltens mehrerer Ataxin-2-Varianten untersucht werden, welche Regionen innerhalb von Ataxin-2 für die Interaktion mit verschiedenen anderen Proteinen verantwortlich sind. Dazu wurden Fusionsproteine mit einem EGFP- und einem Ataxin-2-Anteil (siehe 2.1.6) in humanen Zellen exprimiert und die Expressionsrate mittels Mikroskopie über den EGFP-Anteil kontrolliert. Bei ausgeprägter Expression, die sich durch kräftiges grünes Leuchten in den Zellen zeigte, erfolgte die Affinitätspräzipitation und die Untersuchung mittels *Western Blot* und spezifischen Antikörpern.

3.2.2 Kontrolle der Affinitätspräzipitation

Die Präzipitation erfolgte mithilfe der *GFP-Trap*®. Hierbei binden Einzeldomänenantikörper GFP und GFP-enthaltende Fusionsproteine an eine Agarose-Matrix und können anschließend mittels Zentrifugation aufgereinigt werden. Um zu kontrollieren, ob hierbei ausreichend Protein präzipitiert werden konnte, wurde zunächst ein *Western Blot* mit Analyse durch einen monoklonalen Maus-Antikörper gegen EGFP durchgeführt (Abbildung 10). Für jeden Ansatz konnte der Nachweis von EGFP und damit eine ausreichende Aufreinigung nachgewiesen werden. Allein für das Plasmid pN22-EGFP-C1 konnte kein Nachweis erbracht werden. Dies geht jedoch darauf zurück, dass sie aufgrund ihrer geringeren Masse zu diesem Zeitpunkt bereits außerhalb

des Gels ist. Die längere Laufzeit war zur besseren Auftrennung der übrigen Banden notwendig. Diese stellen sich der Größe des Proteins entsprechend dar. So ist beispielsweise die Bande des Fusionsproteins EGFP-Ataxin-2 (Spur 1) etwas weiter im Gel fortgeschritten als die von EGFP-Q81-Ataxin-2 (2), da letzteres 59 Glutamine mehr beinhaltet und eine entsprechend größere Masse aufweist. Die kleinste Ataxin-2-Variante (9) besteht ausschließlich aus der LSm-Domäne und ist somit im Gel am weitesten fortgeschritten.

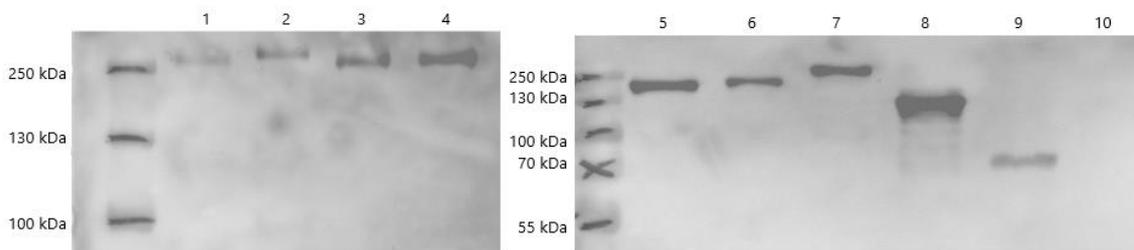


Abbildung 9: *Western Blot* zum Nachweis des EGFP-Anteils der Fusionsproteine in Affinitätspräzipitaten. Es zeigte sich eine Reaktion des spezifischen Antikörpers auf Proteine mit unterschiedlichen Massen. In aufsteigender Nummerierung stellen sich die durch die Plasmide (1) pN22-EGFP-hAtx2-Q22, (2) pN22-EGFP-hAtx2-Q81, (3) pN22-EGFP-hAtx2-Q22- β 3, (4) pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A, (5) pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-590, (6) pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-509, (7) pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 67-245, (8) pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-813, (9) pN22-EGFP-hAtx2LSm sowie (10) pN22-EGFP-C1 kodierte Proteine dar. Es wurden jeweils 20 μ l geladen. Als Proteinmarker diente die *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas).

Insgesamt konnte in jeder Spur das entsprechende Fusionsproteine nachgewiesen werden. Somit kann von einer ausreichenden Affinitätspräzipitation ausgegangen werden.

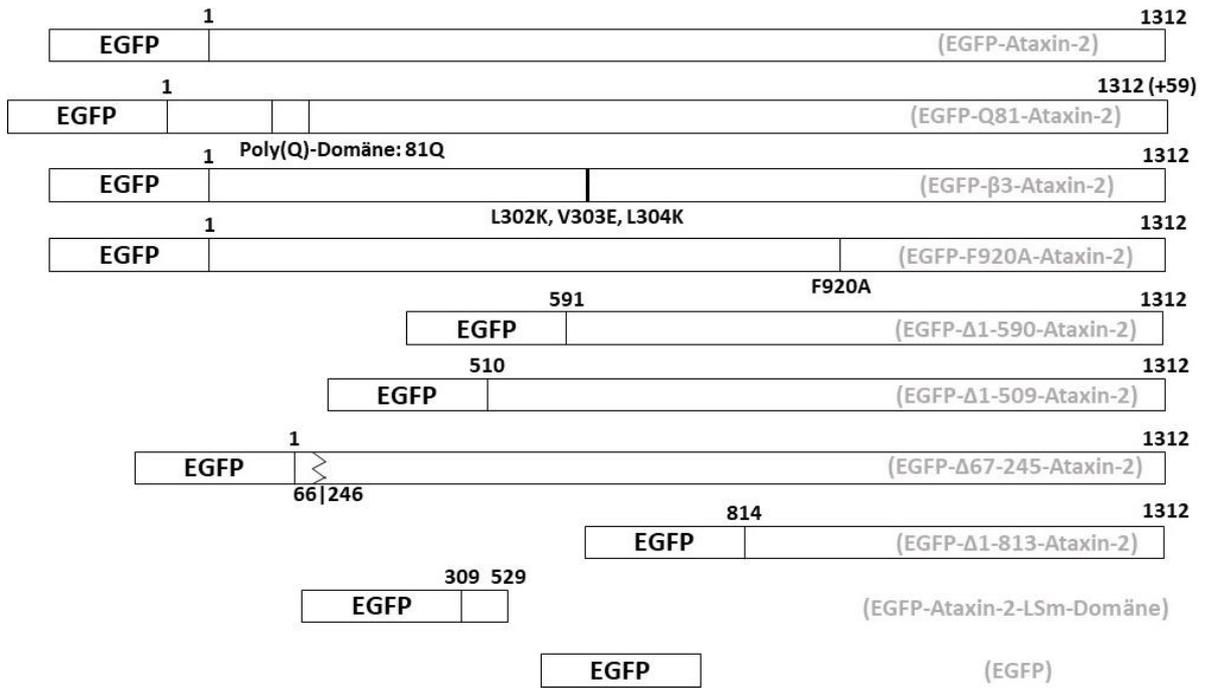


Abbildung 10: Schematische Darstellung der verwendeten und im *Western Blot* nachgewiesenen Fusionsproteine. Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäure-Position innerhalb des menschlichen Ataxin-2. Dies enthält 1312 Aminosäuren. Das Fusionsprotein Q81-Ataxin-2 enthält 59 zusätzliche Aminosäuren innerhalb der Poly(Q)-Domäne.

3.2.3 Analyse möglicher Interaktionspartner

3.2.3.1 PABP1

Zur Untersuchung des Interaktionsmusters von PABP1 mit den unterschiedlichen Ataxin-2-Varianten wurde ein *Western Blot* mit einem spezifischen Antikörper gegen PABP1 durchgeführt (Abbildung 11). Die bereits in der Massenspektrometrie (3.2.1) identifizierte Interaktion von Ataxin-2 und PABP1 konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nachgewiesen werden. Für EGFP-Ataxin-2 und EGFP-Q81-Ataxin-2 zeigte sich eine Bestätigung der Interaktion durch den erfolgreichen Nachweis mit dem spezifischen Antikörper. Weiterhin konnte für die Fusionsproteine EGFP- β 3-, Δ 1-590-, Δ 1-509-, Δ 67-245- und Δ 1-813-Ataxin-2 eine Interaktion nachgewiesen werden. Für die übrigen Fusionsproteine ließ sich keine Bindung demonstrieren. Die Poly(Q)-Expansion hat vermutlich keinen Einfluss auf die Bindung, da sich kaum Unterschiede zwischen der EGFP-Ataxin-2 und EGFP-Q81-Ataxin-2, welches eine expandierte Poly(Q)-Domäne beinhaltet, darstellen. Auch die Punktmutation im Plasmid pN22-EGFP-hAtx2- β 3 scheint keinen Einfluss auf die Bindung zu haben, im Gegensatz zu den Punktmutationen im Plasmid pN22-EGFP-hAtx2-F920A. Für das Fusionsprotein dieses Plasmids konnte kein spezifischer Nachweis durch den Antikörper erbracht werden. Es kann also vermutet werden, dass die F920A-Punktmutation die Bindung von PABP1 an Ataxin-2 verhindert. Das Fusionsprotein EGFP-Ataxin-2-LSm-Domäne zeigte ebenfalls keine spezifische Interaktionsfähigkeit mit PABP1. PABP1 bindet zudem nicht an EGFP. Insgesamt kann die für die Bindung erforderliche Region auf die Aminosäuren 814 bis 1312 des Wildtyp-Ataxin-2 (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1) eingegrenzt werden (Abbildung 12).

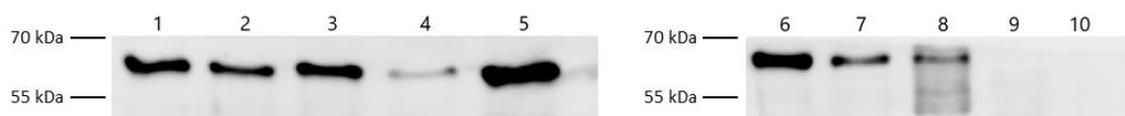


Abbildung 11: *Western Blot* zum Nachweis von PABP1 in verschiedenen Affinitätspräzipitaten. Es zeigten sich als Reaktion des spezifischen Antikörpers auf ein Protein Banden bei ca. 80 kDa Masse. Die Spuren enthalten die Affinitätspräzipitate der von den Plasmiden pN22-EGFP-hAtx2-Q22 (1),

pN22-EGFP-hAtx2-Q81 (2), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-β3 (3), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A (4), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-590 (5), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-509 (6), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ67-245 (7), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-Δ1-813 (8), pN22-EGFP-hAtx2LSm (9) sowie pN22-EGFP-C1 (10) kodierte Fusionsproteine. Als Proteinmarker diente die *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas).

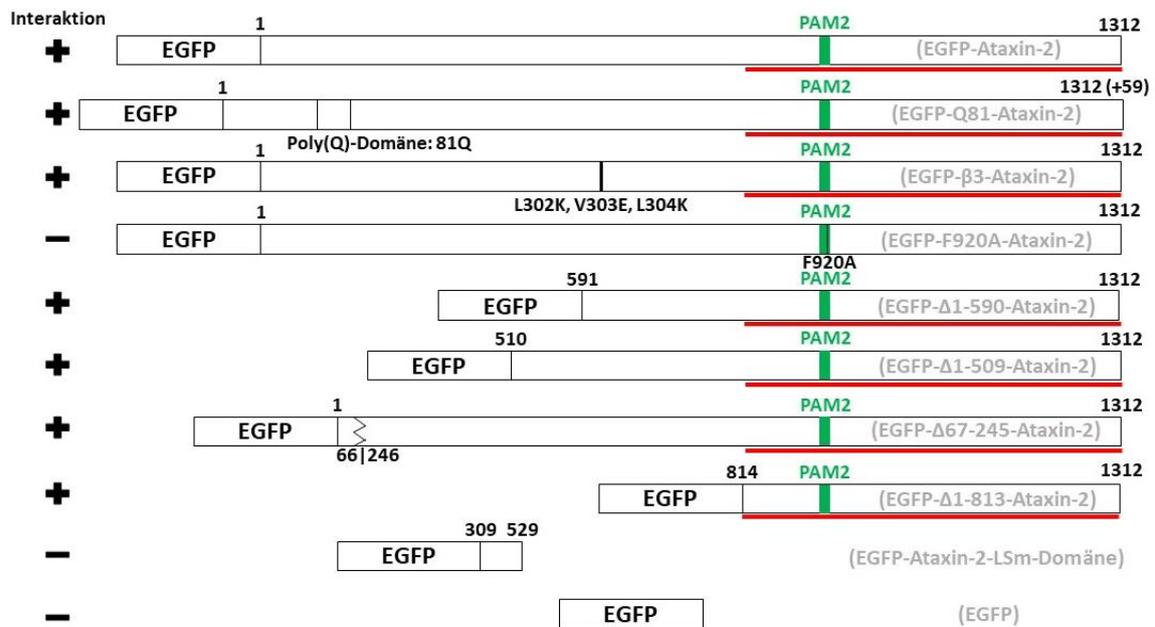


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Fusionsproteine unter Angabe möglicher Interaktionsregionen mit PABP1. Links ist das Ergebnis des *Western Blots* für PABP1 angegeben, wobei eine spezifische Interaktion vorhanden (+) oder nicht vorhanden (-) war. Die Nummerierungen der Aminosäuren beziehen sich auf die 1312 des Wildtyp-Ataxin-2. Das Fusionsprotein mit der expandierten Poly(Q)-Domäne weist entsprechend 59 zusätzliche Aminosäuren auf. Grün eingezeichnet ist die PAM2-Domäne. Mit einem roten Strich markiert ist die maximal notwendige Bindungsregion an PABP1 auf Basis der Ergebnisse des *Western Blots*.

3.2.3.2 LSM12

Für die Untersuchung des Interaktionsmusters von *protein LSM12 homolog* (LSM12) mit den unterschiedlichen Ataxin-2-Varianten wurde ein *Western Blot* mit einem spezifischen Antikörper gegen LSM12 durchgeführt (Abbildung 13). In der Massenspektrometrie der Arbeitsgruppe Kindler (3.2.1) zeigte sich eine mögliche Interaktion beider Proteine, die in dieser Arbeit mit dem *Western Blot* bestätigt werden konnte. Für die Fusionsproteine EGFP-Ataxin-2, -Q81-Ataxin-2, - Δ 67-245-Ataxin-2 und EGFP-Ataxin-2-LSm-Domäne konnte eine Interaktion nachgewiesen werden. Für die übrigen Fusionsproteine konnte kein Nachweis erbracht werden. Die Poly(Q)-Expansion scheint keinen Einfluss auf die Interaktion zu haben, da für die beiden Fusionsproteine EGFP-Ataxin-2 und EGFP-Q81-Ataxin-2 kein Unterschied im Bindungsverhalten nachgewiesen werden konnte. Die Punktmutationen in den Plasmiden pN22-EGFP-hAtx2- β 3 und -F920A verhinderten eine Interaktion der entsprechenden Fusionsproteine mit LSM12. Insgesamt kann die für die Bindung erforderliche Region auf die Aminosäuren 309 bis 529 (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1) des Wildtyp-Ataxin-2 eingegrenzt werden (Abbildung 14), wobei auch die Interaktion mit Fusionsproteinen, die Veränderungen in der Aminosäuresequenz außerhalb dieser Region aufweisen, gestört ist.



Abbildung 13: *Western Blot* zum Nachweis von LSM12 in verschiedenen Affinitätspräzipitaten. Es zeigten sich als Reaktion des spezifischen Antikörpers auf ein Protein Banden bei ca. 20 kDa Masse. Die Spuren enthalten die Affinitätspräzipitate der von den Plasmiden pN22-EGFP-hAtx2-Q22 (1), pN22-EGFP-hAtx2-Q81 (2), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- β 3 (3), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A (4), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-590 (5), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-509 (6), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 67-245 (7), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-813 (8), pN22-EGFP-hAtx2LSm (9) sowie pN22-EGFP-C1 (10) kodierten Fusionsproteine. Als Proteinmarker diente die *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas).

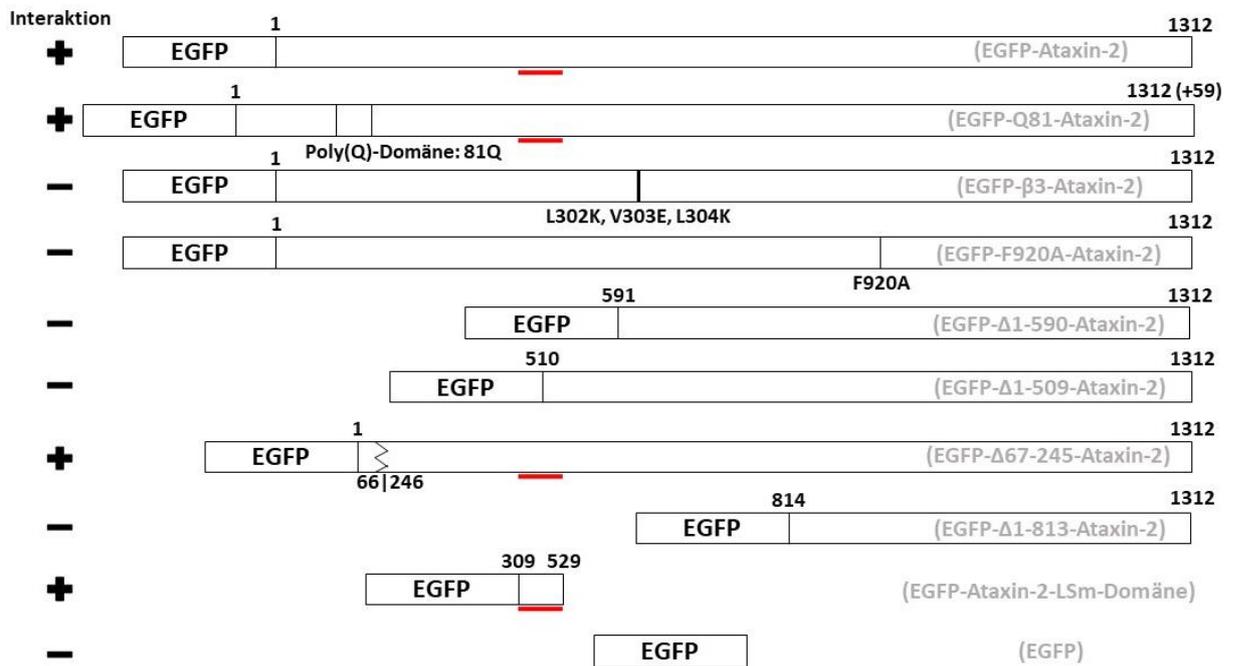


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Fusionsproteine unter Angabe möglicher Interaktionsregionen mit LSM12. Links ist das Ergebnis des *Western Blots* für LSM12 angegeben, wobei eine spezifische Interaktion vorhanden (+) oder nicht vorhanden (-) war. Die Nummerierungen der Aminosäuren beziehen sich auf die 1312 des Wildtyp-Ataxin-2. Das Fusionsprotein mit der expandierten Poly(Q)-Domäne weist entsprechend 59 zusätzliche Aminosäuren auf. Mit einem roten Strich markiert ist die maximal notwendige Bindungsregion an LSM12 auf Basis der Ergebnisse des *Western Blots*.

3.2.3.3 EDC3

Für die Untersuchung des Interaktionsmusters von EDC3 mit den unterschiedlichen Ataxin-2-Varianten wurde ein *Western Blot* mit einem spezifischen Antikörper gegen EDC3 durchgeführt (Abbildung 15). In der Massenspektrometrie (3.2.1) konnte dieses Protein nicht als Interaktionspartner von Ataxin-2 nachgewiesen werden. Auch im *Western Blot* ist keine spezifische Interaktion nachzuweisen. Der Antikörper zeigt eine Reaktion in jedem der Präzipitate, daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier um eine unspezifische Bindungsreaktion, bspw. infolge einer unspezifischen Präzipitation. Danach kann für Ataxin-2 und EDC3 keine spezifische Interaktion demonstriert werden.



Abbildung 15: *Western Blot* zum Nachweis von EDC3 in verschiedenen Affinitätspräzipitaten. Es zeigten sich als Reaktion des Antikörpers auf ein Protein Banden bei ca. 56 kDa Masse. Die Spuren enthalten die Affinitätspräzipitate der von den Plasmiden pN22-EGFP-hAtx2-Q22 (1), pN22-EGFP-hAtx2-Q81 (2), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- β 3 (3), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A (4), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-590 (5), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-509 (6), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 67-245 (7), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-813 (8), pN22-EGFP-hAtx2LSm (9) sowie pN22-EGFP-C1 (10) kodierte Fusionsproteine. Als Proteinmarker diente die *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas).

3.2.3.4 IMP1

Zur Untersuchung des Interaktionsmusters des *Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1* (IMP1, auch IGF2BP1 oder ZBP1) mit den unterschiedlichen Ataxin-2-Varianten wurde ein *Western Blot* mit einem spezifischen Antikörper gegen IMP1 durchgeführt (Abbildung 16). In der Massenspektrometrie (3.2.1) konnte dieses Protein nicht als Interaktionspartner von Ataxin-2 nachgewiesen werden. Im vorliegenden *Western Blot* konnte eine spezifische Interaktion für die Fusionsproteine EGFP-Ataxin-2, EGFP-Q81-Ataxin-2, EGFP- β 3-, -F920A-, - Δ 1-590-, - Δ 1-509-, - Δ 67-245- und - Δ 1-813-Ataxin-2 gezeigt werden. Für EGFP-Ataxin-2-LSm-Domäne und EGFP konnte keine spezifische Interaktion nachgewiesen werden. Die Poly(Q)-Expansion konnte nicht als Einflussfaktor für die Bindung von Ataxin-2 und IMP1 identifiziert werden, da für beide Ataxin-2-Varianten eine spezifische Interaktion demonstriert werden konnte. Auch die durch die Punktmutationen in den Plasmiden der Fusionsproteinen EGFP- β 3 und -F920A-Ataxin-2 hervorgerufenen Veränderungen hatten keinen feststellbaren Einfluss auf die Interaktion. Insgesamt betrachtet kann die für die Interaktion mit IMP1 erforderliche Region innerhalb von Ataxin-2 auf die Aminosäuren 814 bis 1312 des Wildtyp-Ataxin-2 (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1) eingegrenzt werden (Abbildung 17).

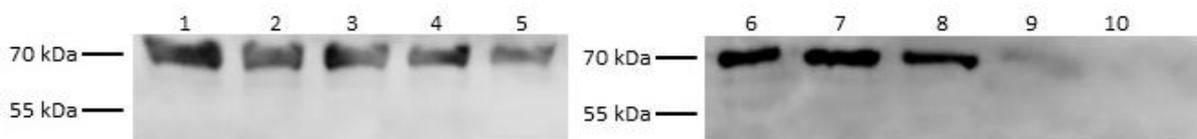


Abbildung 16: *Western Blot* zum Nachweis von IMP1 in verschiedenen Affinitätspräzipitaten. Es zeigten sich als Reaktion des Antikörpers auf ein Protein Banden bei ca. 72 kDa Masse. Die Spuren enthalten die Affinitätspräzipitate der von den Plasmiden pN22-EGFP-hAtx2-Q22 (1), pN22-EGFP-hAtx2-Q81 (2), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- β 3 (3), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A (4), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-590 (5), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-509 (6), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 67-245 (7), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-813 (8), pN22-EGFP-hAtx2LSm (9) sowie pN22-EGFP-C1 (10) kodierte Fusionsproteine. Als Proteinmarker diente die *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas).

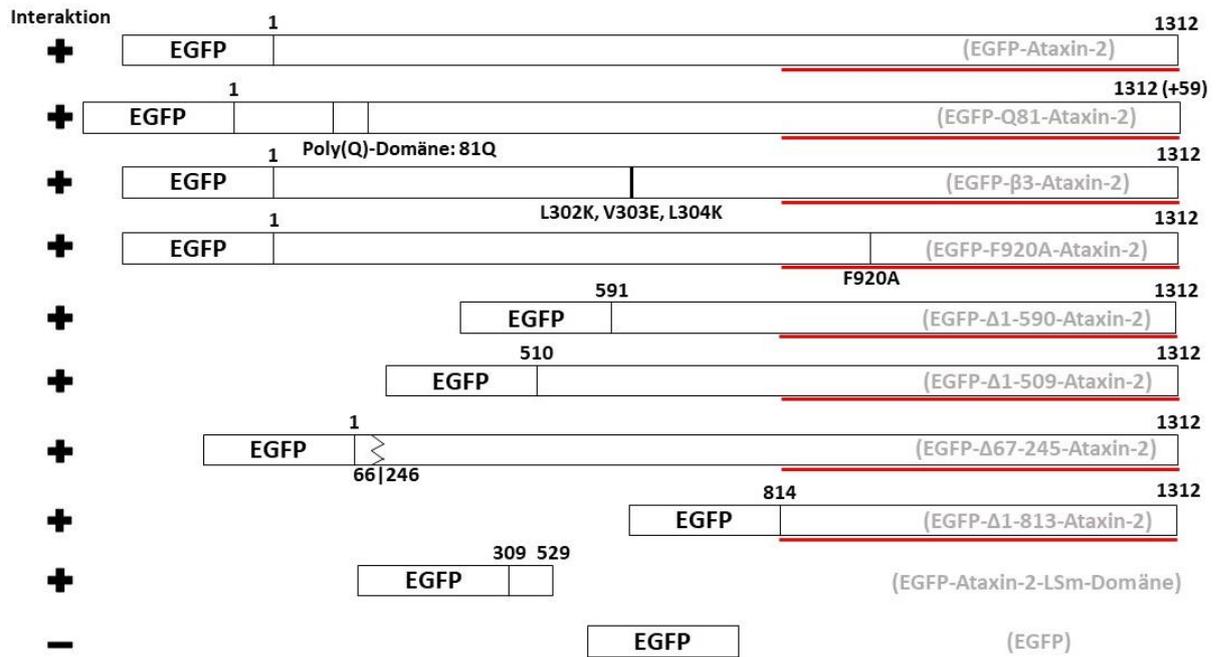


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Fusionsproteine unter Angabe möglicher Interaktionsregionen mit IMP1. Links ist das Ergebnis des *Western Blots* für IMP1 angegeben, wobei eine spezifische Interaktion vorhanden (+) oder nicht vorhanden (-) war. Die Nummerierungen der Aminosäuren beziehen sich auf die 1312 des Wildtyp-Ataxin-2. Das Fusionsprotein mit der expandierten Poly(Q)-Domäne weist entsprechend 59 zusätzliche Aminosäuren auf. Mit einem roten Strich markiert ist die maximal notwendige Bindungsregion an IMP1 auf Basis der Ergebnisse des *Western Blots*.

3.2.3.5 MOV10

Zur Untersuchung des Interaktionsmusters des *Moloney leukemia virus 10 protein* (MOV10) mit den unterschiedlichen Ataxin-2-Varianten wurde ein *Western Blot* mit einem spezifischen Antikörper gegen MOV10 durchgeführt (Abbildung 18). In der von der Arbeitsgruppe Kindler durchgeführten Massenspektrometrie (3.2.1) konnte dieses Protein nicht als putativer Interaktionspartner von Ataxin-2 identifiziert werden. Im *Western Blot* konnte eine Interaktion für die Fusionsproteine EGFP-Ataxin-2, -Q81-, - β 3-, -F920A-, - Δ 1-590-, - Δ 1-509-, - Δ 67-245- und - Δ 1-813-Ataxin-2 gezeigt werden. Für EGFP und EGFP-Ataxin-2-LSm-Domäne konnte keine spezifische Interaktion demonstriert werden. Die Poly(Q)-Expansion im Fusionsprotein EGFP-Q81-Ataxin-2 sowie die die Punktmutationen in den Plasmiden pN22-EGFP-hAtx2- β 3 und -F920A scheinen keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten zu haben, da sich keine Unterschiede zum EGFP-Ataxin-2 zeigen. Insgesamt kann die für die Bindung notwendige Region auf die Aminosäuren 814 bis 1312 des Wildtyp-Ataxin-2 (GenBank Zugangsnummer AAB19200.1) eingegrenzt werden (Abbildung 19).

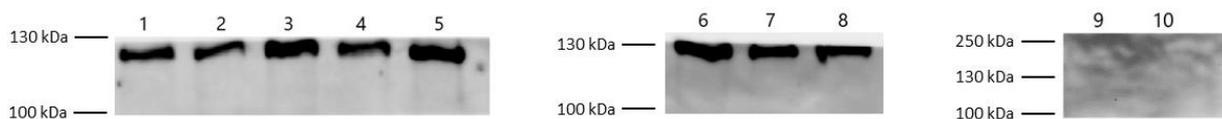


Abbildung 18: *Western Blot* zum Nachweis von MOV10 in verschiedenen Affinitätspräzipitaten. Es zeigten sich als Reaktion des spezifischen Antikörpers auf ein Protein Banden bei ca. 125 kDa Masse. Die Spuren enthalten die Affinitätspräzipitate der von den Plasmiden pN22-EGFP-hAtx2-Q22 (1), pN22-EGFP-hAtx2-Q81 (2), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- β 3 (3), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A (4), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-590 (5), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-509 (6), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 67-245 (7), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-813 (8), pN22-EGFP-hAtx2LSm (9) sowie pN22-EGFP-C1 (10) kodierte Fusionsproteine. Als Proteinmarker diente die *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas).

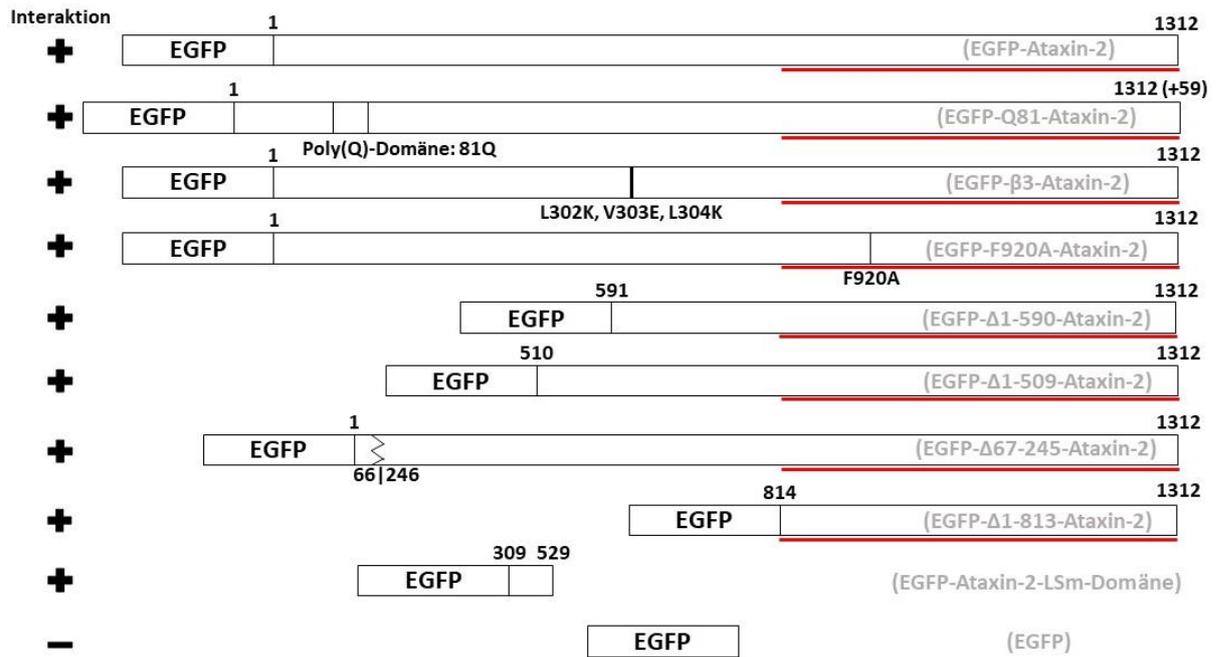


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Fusionsproteine unter Angabe möglicher Interaktionsregionen mit MOV10. Links ist das Ergebnis des *Western Blots* für MOV10 angegeben, wobei eine spezifische Interaktion vorhanden (+) oder nicht vorhanden (-) war. Die Nummerierungen der Aminosäuren beziehen sich auf die 1312 des Wildtyp-Ataxin-2. Das Fusionsprotein mit der expandierten Poly(Q)-Domäne weist entsprechend 59 zusätzliche Aminosäuren auf. Mit einem roten Strich markiert ist die maximal notwendige Bindungsregion an MOV10 auf Basis der Ergebnisse des *Western Blots*.

3.2.3.6 COP β I

Für die Untersuchung des Interaktionsmusters der Untereinheit β von *Coatomer protein 1* (COP β I) mit verschiedenen Ataxin-2-Varianten erfolgte ein *Western Blot* mit einem spezifischen Antikörper gegen COP β I (Abbildung 20). In der Massenspektrometrie der Arbeitsgruppe Kindler (3.2.1) konnte COP β I nicht als putativer Interaktionspartner von Ataxin-2 identifiziert werden. Auch im vorliegenden *Western Blot* ist keine spezifische Interaktion demonstrierbar. Der Antikörper zeigt eine Reaktion in jedem der Präzipitate. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier um eine unspezifische Bindungsreaktion, bspw. infolge einer unspezifischen Präzipitation. Somit kann für Ataxin-2 und COP β I hier keine spezifische Interaktion nachgewiesen werden.

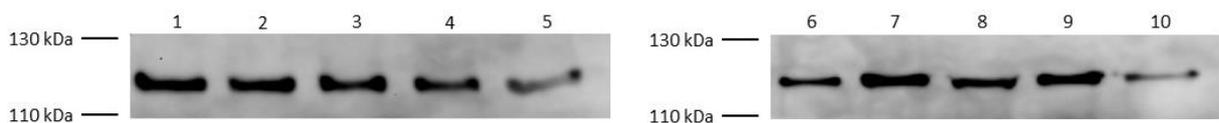


Abbildung 20: *Western Blot* zum Nachweis von COP β I in verschiedenen Affinitätspräzipitaten. Es zeigten sich als Reaktion des spezifischen Antikörpers auf ein Protein Banden bei ca. 120 kDa Masse. Die Spuren enthalten die Affinitätspräzipitate der von den Plasmiden pN22-EGFP-hAtx2-Q22 (1), pN22-EGFP-hAtx2-Q81 (2), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- β 3 (3), pN22-EGFP-hAtx2-Q22-F920A (4), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-590 (5), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-509 (6), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 67-245 (7), pN22-EGFP-hAtx2-Q22- Δ 1-813 (8), pN22-EGFP-hAtx2LSm (9) sowie pN22-EGFP-C1 (10) kodierten Fusionsproteine. Als Proteinmarker diente die *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas).

3.2.4 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Abschließend zeigt Tabelle 12 eine Zusammenfassung der Ergebnisse der *Western Blot*-Analysen. Für die putativen Bindungspartner PABP1, LSM12, IMP1 und MOV10 konnten jeweils Interaktionen mit verschiedenen Ataxin-2-Varianten nachgewiesen werden. Bei EDC3 und COP β I konnte kein Nachweis einer spezifischen Interaktion erbracht werden.

Tabelle 12: Tabellarische Zusammenfassung des Bindungsmusters von Ataxin-2

	PABP1	LSM12	EDC3	IMP1	MOV10	COP β I
EGFP-Ataxin-2	+	+	-	+	+	-
EGFP-Q81-Ataxin-2	+	+	-	+	+	-
EGFP-β3-Ataxin-2	+	-	-	+	+	-
EGFP-F920A-Ataxin-2	-	-	-	+	+	-
EGFP-Δ1-590-Ataxin-2	+	-	-	+	+	-
EGFP-Δ1-509-Ataxin-2	+	-	-	+	+	-
EGFP-Δ67-245-Ataxin-2	+	+	-	+	+	-
EGFP-Δ1-813-Ataxin-2	+	-	-	+	+	-
EGFP-Ataxin-2-LSm-Domäne	-	+	-	-	-	-
EGFP	-	-	-	-	-	-

+ : spezifische Interaktion; - : keine spezifische Bindungsreaktion

4 Diskussion

4.1 Ataxin-2

Über die Poly(Q)-Expansion des Ataxin-2 wird wahrscheinlich die Spinozerebelläre Ataxie Typ 2 in einem dominant-negativen Pathomechanismus ausgelöst. Trotzdem ist weiterhin nicht genau bekannt, wie die entscheidenden Pathomechanismen verlaufen. Dies liegt unter anderem daran, dass die intrazellulären Funktionen von Ataxin-2 noch nicht ausreichend aufgeklärt sind. Es sind bereits einige Interaktionspartner von Ataxin-2 beschrieben, über die versucht wurde, ein klareres Bild dieser Funktionen von Ataxin-2 zu zeichnen. Die Arbeitsgruppe Kindler hat eine massenspektrometrische Charakterisierung des Proteininteraktionsspektrums eines mittels *GFP-Trap*®-Protokoll erstellten Präzipitats eines EGFP-Ataxin-2-Fusionsproteins vorgenommen. Basierend auf den dort identifizierten putativen und in der Literatur beschriebenen Bindungspartnern sowie deren Funktionen wurden in dieser Arbeit die Interaktionsmuster von sechs Ataxin-2-Bindungspartnern untersucht. Hierdurch können Hypothesen zur Einbettung von Ataxin-2 in die bekannten zellulären Vorgänge dieser Proteine aufgestellt und überprüft werden. Das bisher vermutete Hauptaufgabenfeld liegt im mRNA-Metabolismus im Rahmen von PB, SG und den dazugehörigen RNA-Ab- und Umbaumechanismen. Auch die untersuchten Proteine PABP1, LSM12, EDC3 und MOV10 werden unter anderem diesem Bereich zugeordnet. Insbesondere für COP β I, aber auch für IMP1, werden Funktionen bei der gezielten Bewegung von RNA innerhalb der Zelle beschrieben.

4.2 Posttranskriptionelle RNA-Prozesse

PABP1 ist das am intensivsten erforschte unter den analysierten Proteinen. In der AG Kindler konnte es bereits über die massenspektrometrische Untersuchung des Ataxin-2-Präzipitats (4.1) als möglicher Bindungspartner von Ataxin-2 identifiziert werden. Eine spezifische Interaktion mit Ataxin-2 wurde über ein *Yeast-two-hybrid-assay* sowie über Ko-Immunopräzipitation unter Zuhilfenahme rekombinanter Proteine nachgewiesen werden (Ralser et al., 2005). Darüber hinaus konnte eine Ko-Lokalisation mittels Immunofluoreszenz im Zytoplasma gezeigt werden (Ralser et al., 2005). Die Ergebnisse von Ralser et al. konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da

sich auch mit der hier genutzten *EGFP-Tag*-Methode und Ko-Immunopräzipitation eine Interaktion nachweisen ließ. Weiterhin konnte eine Bestätigung der Eingrenzung der notwendigen Region innerhalb des Ataxin-2 auf die sogenannte PAM2-Domäne gezeigt werden. Somit kann man eine *in vivo*-Interaktion zwischen den beiden Proteinen als sehr wahrscheinlich ansehen. PABP1 kommen zahlreiche Aufgaben in der Modulation der Proteinbiosynthese zu. So wird über eine Interaktion mit dem *eukaryotic translation initiation factor 4γ* (eIF4G) eine Regulation der Translationsinitiation und über den *eukaryotic translation termination factor 3* abschließend der Translationstermination angenommen (Derry et al., 2006; Eliseeva et al., 2013). Außerdem wird PABP1 die Regulation der Poly(A)-Nuklease 2, die den Abbau des Poly(A)-Schwanzes an mRNA durchführt, zugeschrieben (Mangus et al., 2004). In Zusammenhang mit den Bindungen an eIF4G und die Poly(A)-Nuklease steht wahrscheinlich auch die mögliche Interaktion von Ataxin-2 mit Komponenten des Argonauten (AGO) -Systems (Nonhoff et al., 2007). Wie Abbildung 21 zeigt, könnten Ataxin-2 und PABP1 sowie möglicherweise auch Proteine der AGO-Familie diese Funktionen sowohl in translationsfördernder als auch -inhibierender Weise gemeinsam erfüllen (Velázquez-Pérez et al., 2017). Ein Ansatz, auf welche Weise die translationsfördernde Wirkung von PABP1 zurückgeführt werden könnte, ist die Inhibition des sogenannten *Decappings*, also des Abtrennens einer Kappenstruktur vom 5'-Ende einer mRNA, über das unter anderem der mRNA-Abbau eingeleitet wird. Dies zeigen Untersuchungen in Hefe-Modellorganismen (Caponigro & Parker, 1995). Ein anderer, möglicherweise für die Translationsinitiation bedeutenderer, Mechanismus könnte jedoch die mRNA-Zyklisierung sein (Shirokikh & Preiss, 2018). Ob aber auch Ataxin-2 in diese stabilisierenden Mechanismen eingebunden ist, bleibt vorerst unklar. Auf der anderen Seite werden translationshemmende Funktionen für PABP1 beschrieben. Wie viele der translationsinhibierenden Prozesse steht diese mögliche Wirkung wahrscheinlich in Zusammenhang mit bestimmten zytoplasmatischen Strukturen, wie SG. Daher könnte als ein Ansatz zur Klärung der PABP1-Funktion eine stressinduzierte Translationsinhibition durch die Assemblierung der genannten Komponenten in SG vermutet werden (Nonhoff et al., 2007). Insofern ist nicht geklärt, ob PABP1, und im Zusammenspiel damit Ataxin-2, einen überwiegend translationsfördernden oder -inhibierenden Einfluss haben.

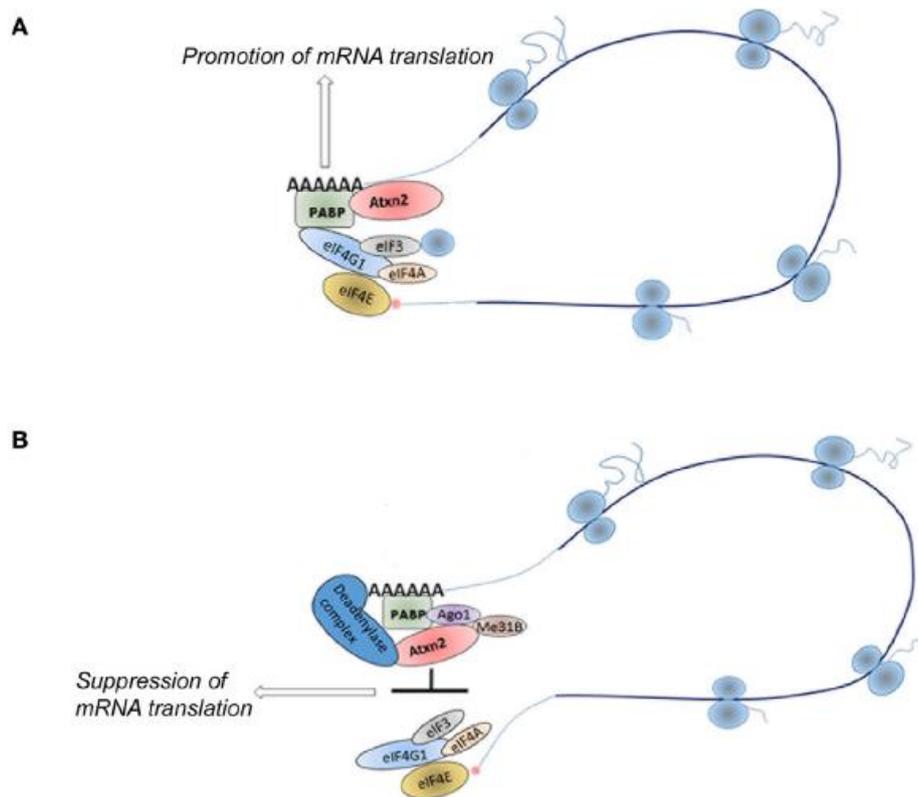


Abbildung 21: Schematische Darstellung möglicher gemeinsamer Funktionen von Ataxin-2 und PABP1. Eine Bindung mit Translationsinitiationsfaktoren, u.a. eIF4G, führt zur Förderung der Translation, während eine Interaktion mit deadenylierenden bzw. mit dem RNA-Abbau assoziierten Proteinen (AGO) eher einen Abbau der mRNA und damit eine Unterbindung der weiteren Translation hervorruft. Verändert nach Velázquez-Pérez (Velázquez-Pérez et al., 2017).

Die genauen Konsequenzen der Bindung von Ataxin-2 an PABP1 für dessen Wirkung sind nicht ausreichend aufgeklärt. Daher ist aktuell ausschließlich ein Rückschluss von den bekannten Funktionen von PABP1 auf mögliche Beteiligungen des Ataxin-2 an diesen Prozessen möglich. Zur Aufklärung dieser möglichen Mechanismen wäre eine weitere funktionelle Analyse, bspw. unter Störung der Protein-Protein-Interaktion von PABP1 und Ataxin-2, sinnvoll.

LSM12 konnte durch die Arbeitsgruppe Kindler ebenfalls in der Massenspektrometrie (4.1) als möglichen Bindungspartner von Ataxin-2 nachgewiesen werden. Nach der Website *uniprot.org* sowie der recherchierten Literatur ist bisher keine spezifische Interaktion zwischen den Proteinen LSM12 und Ataxin-2 nachgewiesen worden. Swisher et al. zeigten 2010 jedoch, dass eine Interaktion in *Saccharomyces cerevisiae* zwischen den entsprechenden Orthologen (Hefe-) LSM12 und *PAB1-binding protein 1* (Ataxin-2-Ortholog) stattfindet (Swisher & Parker, 2010). In der

vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung des *Western Blot*-Assays eine Interaktion der humanen Proteine nachgewiesen werden. Humanes LSM12 ist auch in Bezug auf seine allgemeine Funktion bisher weitestgehend unerforscht. Über das Hefe-Ortholog LSM12 ist bekannt, dass es Teil von SG ist, jedoch nicht Voraussetzung für die Bildung derer unter Glukose-Entzug (Swisher & Parker, 2010). Als Teil von SG ist zu vermuten, dass auch die Aufgaben des LSM12 im Bereich des RNA-Metabolismus liegen. Da auch Ataxin-2 im Menschen Teil von SG ist (Nonhoff et al., 2007), liegt die Verbindung zu LSM12 nahe, sodass die weitere Suche nach den entsprechenden Funktionen hierauf aufbauend erfolgen muss. Da Proteine im RNA-Metabolismus durchaus evolutionär konservierte Strukturen und Funktionen aufweisen, ist es – in Zusammenschau der Interaktion in Hefe und der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Bindung – nicht unwahrscheinlich, dass eine tatsächliche *in vivo*-Interaktion der Proteine vorliegt.

Das Protein **EDC3**, auch LSM16, wurde durch die massenspektrometrische Analyse der Arbeitsgruppe Kindler (siehe 4.1) nicht als möglicher Ataxin-2-Bindungspartner identifiziert. Auch die Website *uniprot.org* sowie die recherchierte Literatur lieferten keine Hinweise auf eine nachgewiesene Interaktion der Proteine. Als möglicher Interaktionspartner kommt EDC3 infrage, da es wie Ataxin-2 vermutlich Funktionen im RNA-Metabolismus erfüllt. So zeigten Fenger-Grøn et al., dass EDC3 Teil von PB, stark mit dem RNA-Abbau assoziierten intrazellulären Strukturen, ist. Wahrscheinlich besitzt es sogar eine Funktion in der Assemblierung von PB. In derselben Untersuchung wiesen Fenger-Grøn et al. auch nach, dass EDC3 wahrscheinlich über das *Decapping* Einfluss auf zumindest einige RNA-Abbauwege nimmt und diese fördert (Fenger-Grøn et al., 2005). Für die PB-Formation und die RNA-Bindung des EDC3 scheint eine Dimerisierung zweier EDC3-Proteine notwendig zu sein. Eine Mutation in der vermutlich für die Dimerisierung entscheidenden Domäne stört nicht nur die Dimerisierung an sich, sondern auch die RNA-Bindung, obwohl diese über eine andere Domäne vermittelt wird. Durch die Mutation wird in letzter Konsequenz auch die vermutete Funktion des EDC3 als Assemblierungsprotein gestört (Ling et al., 2008). Über den Einfluss einer möglichen Interaktion zwischen Ataxin-2 und EDC3 auf die beschriebenen Metabolismen kann nur gemutmaßt werden. Die

Tatsache, dass Ataxin-2 aber ebenfalls in PB nachgewiesen werden konnte und auch eine translationsmodulierende Funktion zu haben scheint, ist jedoch ein Indiz, das eine *in vivo*-Interaktion der beiden Proteine wahrscheinlicher macht.

MOV10 konnte ebenfalls in der massenspektrometrischen Analyse des Präzipitats (4.1) nicht gefunden werden. Auch über *uniprot.org* sowie die durchsuchte Literatur ließ sich keine nachgewiesene Bindung zu Ataxin-2 finden. Wie bei EDC3 liegt die Begründung für eine mögliche Interaktion in den intrazellulären Mechanismen, in die MOV10 involviert ist. So ist es wahrscheinlich in seiner Funktion als 5'-3'-Helikase am RNA-Abbau beteiligt. Als ein solches Enzym bindet es zunächst an die 3'-UTR, verdrängt dort möglicherweise andere RNA-bindende Proteine und entwindet dann Sekundärstrukturen so, dass andere Enzyme binden und ihre Funktion erfüllen können. Dazu gehört die Hauptkomponente eines bestimmten RNA-Abbauweges, *Regulator of nonsense transcripts 1*, mit der MOV10 interagiert, um sich am RNA-Abbau zu beteiligen (Gregersen et al., 2014). Darüber hinaus konnten Meister et al. zeigen, dass MOV10 Teil von PB ist, was sich mit der zuvor beschriebenen Funktion deckt, da PB präferentiell dem RNA-Abbau dienen (Meister et al., 2005). Weiterhin gibt es Hinweise auf die Beteiligung von MOV10 am sogenannten *RNA-Silencing*. Dieser Prozess besteht in der si- und *microRNA* (miRNA)-vermittelten Inhibition der Translation. Die Hybridisierung von si-/ bzw. miRNA und dessen Ziel-RNA erfolgt in Komplexen mit begleitenden Proteinen. Zu diesen gehört MOV10 und auch das mit ihm interagierende AGO2. SiRNA-vermittelte *Knockdowns* dieser beiden Proteine führten bestätigend zu einer vermehrten Translation von Reportergenen (Meister et al., 2005). Welchen Einfluss die mögliche Bindung von Ataxin-2 und MOV10 auf diese Vorgänge haben könnte, bleibt vorerst unklar. Es gibt Hinweise darauf, dass Ataxin-2 eine Funktion im *Silencing*-Prozess erfüllt, auch wenn diese Untersuchungen zumeist an der Fruchtfliege *Drosophila* durchgeführt wurden und sich hauptsächlich auf eine Interaktion der *Drosophila*-Orthologe von Ataxin-2 und AGO1, ebenfalls einer Komponente des miRNA-vermittelten *Silencing*, stützen (Lee et al., 2018). Trotzdem sind dies, die Lokalisation in PB und die Beteiligung am RNA-Abbau Argumente, die für eine *in vivo*-Interaktion von MOV10 und Ataxin-2 sprechen. Insgesamt könnten dies und die vermuteten Funktionen von Ataxin-2 darauf hinweisen,

dass MOV10 Ataxin-2 in seiner translationsinhibierenden bzw. RNA-abbauenden Wirkung verstärkt oder die Arten, wie Ataxin-2 diese Aufgaben wahrnehmen kann, erweitert, auch wenn in dieser Arbeit keine spezifische Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden konnte.

4.3 RNA-Transport

Das Protein **IMP1**, in der Literatur auch IGF2BP1 oder ZBP1, wurde im Massenspektrometer nicht als möglicher Interaktionspartner von Ataxin-2 identifiziert. Wie bei den vorhergehenden Proteinen zeigen sich weder auf *uniprot.org* noch in der recherchierten Literatur Nachweise für eine Bindung zu Ataxin-2. Dem Protein werden mehrere Funktionen in verschiedenen intrazellulären Prozessen zugeschrieben. Es wurde vermutet, dass IMP1 eine zentrale Rolle bei der Lokalisation einiger mRNA innerhalb von Neuronen spielt. Danach bildet es RNP-Granula, ähnlich PB oder SG, jedoch mit einer anderen Proteinzusammensetzung. Diese Granula scheinen mithilfe von Motorproteinen entlang des Zytoskeletts an bestimmte Orte innerhalb des Somas und vor allem des Axons bewegt zu werden. Die Aufgabe der Assemblierung besteht im Schutz vor Degradation und auch vor vorzeitiger Translation der beinhalteten mRNA. Dass keine Translation auf dem Weg an den Bestimmungsort stattfindet, führten die Autoren auf das Fehlen notwendiger Translationsinitiationsfaktoren zurück (Jønson et al., 2007). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass der Bestimmungsort bei derartigen RNA-Transporten in einem sogenannten *Zipcode* (dt., etwa Postleitzahl), einem konservierten Lokalisierungselement in der 3'UTR kodiert wird (Kislauskis et al., 1994). Die in den RNP-Granula mit IMP1 enthaltenen mRNA kodieren Jønson et al. zufolge Proteine mit Funktionen im sekretorischen Pfad, dem ER und dem Golgi-Apparat. Eine spezielle mRNA, die über die genannten Mechanismen von IMP1 beeinflusst wird, kodiert das Protein β -Aktin. Dessen mRNA wird besonders in wachsende Axone transportiert, um dort translatiert zu werden und das resultierende Protein β -Aktin für den Aufbau des Zytoskeletts zu nutzen. Dieser Vorgang ist bei den Spinalen Muskelatrophien möglicherweise gestört (Donlin-Asp et al., 2017). Dabei handelt es sich um eine Gruppe von teils hereditären neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen das zweite Motoneuron geschädigt wird. Ursächlich für die Erkrankung ist eine Mutation im Gen des *survival muscle neuron protein*

(Mumenthaler & Mattle, 2012). Möglicherweise trägt dieser Mechanismus also auch einen Teil zur Genese der Neurodegeneration bei der SCA2 bei, auch wenn hier vorwiegend die PC des Cerebellums geschädigt werden. Nichtsdestotrotz sind dies und die Tatsache, dass Ataxin-2 und IMP1 an RNP-Granula beteiligt sind, Hinweise auf eine mögliche *in vivo*-Interaktion der beiden Proteine. Allerdings müsste noch eine Ko-Lokalisation dort gezeigt werden, um ein Vorhandensein in denselben Granula zu bestätigen, was eine Interaktion wahrscheinlicher zu machen würde.

4.4 Vesikulärer Transport

Auch **COP β** wurde in der Massenspektrometrie nicht nachgewiesen (siehe 4.1). Ebenfalls finden sich hier weder auf *uniprot.org* noch in der recherchierten Literatur Hinweise auf eine Interaktion mit Ataxin-2. Das *coatamer protein 1* (COPI), dessen Untereinheit COP β ist, besitzt Funktionen im Verlauf des sekretorischen Pfades und im vesikulären Transport. Ein siRNA-vermittelter Knockdown der Proteinkonzentration von COP β verursacht Störungen im System des Golgi-Apparats. Vermutlich ist COPI an den Transporten zwischen den einzelnen Kompartimenten innerhalb des Golgi-Apparats sowie zwischen Golgi und ER beteiligt. So können sich mehrere Komponenten, unter anderem das sogenannte Trans-Golgi-Netzwerk und Recycling Endosomen, scheinbar nicht mehr korrekt formieren. Diese lagern sich stattdessen ungeordnet zusammen. Es findet wahrscheinlich kein geordneter vesikulärer Transport zwischen den Kompartimenten statt (Styers et al., 2008). Außerdem steht das COPI-Transportsystem vermutlich in Zusammenhang mit den oben bereits geschilderten Vorgängen des mRNA-Transports in neuronale Ausläufer. Zum einen konnten Peter et al. eine Ko-Immunopräzipitation von COPI sowohl mit β -Aktin-mRNA als auch mit dem *survival muscle neuron protein* durchführen (Peter et al., 2011). Zum anderen konnte eine andere Arbeitsgruppe das Vorhandensein von zwei Untereinheiten des COPI, $-\alpha$ und $-\beta$, in solchen neuronalen Ausläufern nachweisen (Todd et al., 2013). Eine Beteiligung am mRNA-Transport scheint unter Beachtung dieser Nachweise also möglich. Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des RNA-Transports an der Pathophysiologie der SCA2 scheint zu sein, dass das Gen eines mit COPI interagierenden Proteins, *protein kinase-like protein SCY1*, in Mäusen verändert ist, die eine spinocerebelläre Schädigung aufweisen (Burman et al., 2008). Ein

Muster wie es in ähnlicher Form auch bei der SCA2 auftritt. In dieselbe Richtung weist ein Mausmodell mit einer mutierten Form der γ -Untereinheit des COPI. Diese Mäuse weisen eine Ataxie infolge einer PC-Schädigung auf, welche auch im Mittelpunkt der vermuteten Pathogenese der SCA2 stehen (Xu et al., 2010). Basierend auf den beschriebenen, von COPI und dessen Untereinheit COP β I vermutlich beeinflussten, intrazellulären Mechanismen sowie den ähnlichen neurodegenerativen Schädigungsmustern infolge von Mutationen in Proteinen, die mit dem COPI-System interagieren, lässt sich die Vermutung aufstellen, dass eine Interaktion zwischen Ataxin-2 und COP β I vorliegen könnte, die zur Pathophysiologie der SCA2 beiträgt, auch wenn in dieser Arbeit keine spezifische Interaktion nachgewiesen werden konnte.

4.5 Zusammenfassung

Die in der vorliegenden Arbeit analysierten putativen Interaktionspartner von Ataxin-2 geben mithilfe der recherchierten Literatur Hinweise darauf, auf welche zellulären Mechanismen Ataxin-2 Einfluss haben könnte. Insgesamt ergibt sich das Bild eines stark mit dem RNA-Metabolismus assoziierten Proteins. Zum einen erfüllt es Funktionen in der Translationsregulation. Hier kann eine Beteiligung als gesichert gelten, allerdings lässt sich noch nicht abschließend sagen, auf welche Weise es genau wirkt und inwieweit es selektiv die Translationsinitiation fördert oder inhibiert. Zum anderen ist auch eine Aufgabe im mRNA-Abbau wahrscheinlich, da mehrere der nachgewiesenen Interaktionspartner hier Funktionen erfüllen bzw. eine Lokalisation in mit dem mRNA-Abbau assoziierten Strukturen zeigen. Darüber hinaus ist eine Beteiligung am mRNA-Transport insbesondere in Neuronen möglich. Diese könnte möglicherweise auch einen Teil der Pathophysiologie der SCA2 darstellen, da sich bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen hier ebenfalls Störungen gezeigt haben. Es ergaben sich im Hinblick auf die Pathophysiologie der SCA2 jedoch keine direkten Hinweise durch die Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und der vorliegenden Literatur, da für die meisten der analysierten putativen Interaktionspartner kaum Untersuchungen in Zusammenhang mit der SCA2 und Ataxin-2 vorlagen.

4.6 Ausblick

Auf Basis der vorliegenden Arbeit und insbesondere der hier analysierten Interaktionspartner können weitere Forschungen erfolgen. So ist sicherlich von Interesse, ob die gezeigten Interaktionen auch unter Verwendung anderer Präzipitationssysteme als dem *GFP-Trap*®-Protokoll reproduzierbar sind, um mögliches unspezifisches Bindungsverhalten auszuschließen. Darüber hinaus könnten andere Ataxin-2-Varianten verwendet werden, um die für die Bindungen erforderlichen Regionen genauer eingrenzen zu können. Außerdem könnten Funktionsanalysen oder etwaige Ko-Lokalisationsuntersuchungen von Ataxin-2 mit seinen möglichen Bindungspartnern auch in anderen Zellkultur-Systemen erfolgen. Um der Pathophysiologie der SCA2 näherzukommen, wäre es hier sinnvoll auf neuronale Zellen zurückzugreifen. Mit dieser Methode könnte auch der mRNA-Transport gezielt in den Fokus genommen werden. Weiterhin wäre es interessant, die Art und Dauer der Bindungen genauer zu untersuchen, um Rückschlüsse auf die tatsächliche Relevanz der Interaktionen für zelluläre Vorgänge ziehen zu können.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2) ist eine seltene autosomal-dominant vererbte neurologische Erkrankung. Sie ist unter anderem durch Gangataxie, Intentionstremor, zerebelläre Dysarthrie und weitere, nicht-zerebelläre Symptome, wie etwa Schlafstörungen, gekennzeichnet. Auslöser der Erkrankung ist wahrscheinlich eine Trinukleotidexpansion im *ATXN2*-Gen, welche in dessen Genprodukt Ataxin-2 die Erweiterung einer repetitiven Region auslöst. Es wird angenommen, dass dies eine Veränderung der Funktion des Ataxin-2 hervorruft, die toxische Effekte erzeugt. Es ist jedoch weder die genaue Pathophysiologie noch die Funktion von Ataxin-2 im gesunden Organismus vollständig aufgeklärt. In der vorliegenden Arbeit sollte das Interaktionsmuster von Ataxin-2 mit putativen Bindungspartnern analysiert werden, um Rückschlüsse auf dessen Beteiligung an zellulären Vorgängen ziehen zu können.

Methoden: Es wurden Expressionsvektoren verschiedener Ataxin-2-Varianten in HEK293-Zellen eingebracht, die exprimierten Proteine über Affinitätspräzipitation aufgereinigt und danach die Interaktionspartner durch *Western Blot* unter Verwendung spezifischer Antikörper identifiziert.

Ergebnisse: Für die putativen Interaktionspartner PABP1, LSM12, IMP1 und MOV10 konnte eine Bindung an Ataxin-2 nachgewiesen werden. In der Analyse der Bindungsmuster mit veränderten Ataxin-2-Varianten zeigten sich Abweichungen, die Rückschlüsse auf die für die jeweilige Interaktion notwendige Region erlaubten. Es ergaben sich keine Abweichungen im Bindungsmuster derjenigen Ataxin-2-Variante, die dem Ataxin-2 von SCA2-Patienten entsprach.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die Vermutungen, dass Ataxin-2 am RNA-Metabolismus, insbesondere an der Translationsregulation, dem mRNA-Abbau und dem mRNA-Transport beteiligt ist. Für die Pathophysiologie der SCA2 ergeben sich aus den Interaktionsmustern keine neuen Hinweise.

Abstract

Background: Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is a rare autosomal-dominant inherited neurological disease. It is characterized by gait ataxia, intention tremor, cerebellar dysarthria and further non-cerebellar symptoms like e.g. sleep disorders. The disease is probably caused by trinucleotide expansion in the *ATXN2* gene, which triggers the extension of a poly(Q) region in its gene product ataxin-2. It is assumed that this causes a change in the function of ataxin-2, which generates toxic effects. However, neither the exact pathophysiology nor the function of ataxin-2 in the healthy organism is fully understood. In the present work the interaction pattern of ataxin-2 with putative interaction partners was analyzed in order to draw conclusions on its involvement in cellular processes.

Methods: Plasmid DNA of different ataxin-2 variants was introduced into HEK293 cells. Expressed proteins were purified using affinity precipitation and interaction partners were detected by *Western Blot* using specific antibodies.

Results: A binding to ataxin-2 could be demonstrated for the putative interaction partners PABP1, LSM12, IMP1, and MOV10. The analysis of binding patterns of modified ataxin-2 variants allowed for the identification of interaction domains. There were no deviations in the binding patterns of wildtype and mutant ataxin-2 variants.

Conclusion: The results of the present work support assumptions, that ataxin-2 is involved in RNA metabolism, in particular in translation regulation, mRNA decay and mRNA transport. There are no new indications for the pathophysiology of the SCA2 emerging from the interaction patterns.

6 Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3'-untranslatierte Region
AG	Arbeitsgruppe
AGO	Argonauten
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATXN2-Q127	Ataxin-2 mit 127 Glutaminreste in der Polyglutamindomäne
ATXN2-Q58	Ataxin-2 mit 58 Glutaminreste in der Polyglutamindomäne
BDT	BigDye™ Terminator
Bspw.	beispielsweise
Ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COPI	<i>Coatomer protein 1</i>
COPβI	<i>Coatomer protein 1</i> Untereinheit β
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco 's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDC3	<i>enhancer of mRNA-decapping protein 3</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(E)GFP	(endogenes) grün-fluoreszierendes Protein
eIF4γ	<i>eukaryotic translation initiation factor 4γ</i>
EtOH	Ethanol
g	Erdschwerebeschleunigung
HEK293	<i>human embryonic kidney 293</i>
IMP1	<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1</i>
IP3	Inositol-1, 4, 5-triphosphat
kb	Kilobase
KCM-Puffer	Puffer mit Kalium-, Kalzium- und Magnesiumchlorid
kDa	Kilodalton

LB	<i>lysogeny broth</i>
LSm	<i>Like Sm</i>
LSM12	<i>protein LSM12 homolog</i>
LSm-AD	<i>Like Sm-associated domain</i>
miRNA	<i>micro-Ribonukleinsäure</i>
MOV10	<i>Moloney leukemia virus 10 protein</i>
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
PA	Polyacrylamid
PABP1	<i>poly(A)-binding protein 1</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM2	<i>poly (A)-binding protein interacting motif 2</i>
PB	<i>processing body</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate-buffered saline + Tween 20</i>
PC	Purkinje-Zelle
Poly(A)	Polyalanin
Poly(Q)	Polyglutamin
REM	<i>rapid eye movement</i>
RGS8	<i>regulator of G-Protein signaling 8</i>
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleotidprotein
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SARA	<i>score for the assessment of</i>
SCA	Spinozerebelläre Ataxie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Stressgranulum
siRNA	<i>small interfering-Ribonukleinsäure</i>
STAU1	Staufen-1

TDP-43	<i>TAR DNA-binding protein of 43 kDa</i>
TE	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure
tRNA	<i>transfer</i> -Ribonukleinsäure
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
V _H H	<i>variable heavy homodimer</i>

7 Literaturverzeichnis

- Al-Ramahi I, Pérez A M, Lim J, Zhang M, Sorensen R, de Haro M, Branco J, Pulst S M, Zoghbi H Y und Botas J. 2007. 'dAtaxin-2 mediates expanded Ataxin-1-induced neurodegeneration in a Drosophila model of SCA1', *PLoS Genet*, 3(12): e234. 10.1371/journal.pgen.0030234
- Alonso E, Martínez-Ruano L, De Biase I, Mader C, Ochoa A, Yescas P, Gutiérrez R, White M, Ruano L, Fragoso-Benítez M et al. 2007. 'Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population', *Mov Disord*, 22(7): 1050-1053. 10.1002/mds.21470
- Anne S L, Saudou F und Humbert S. 2007. 'Phosphorylation of Huntingtin by Cyclin-Dependent Kinase 5 Is Induced by DNA Damage and Regulates Wild-Type and Mutant Huntingtin Toxicity in Neurons', *The Journal of Neuroscience*, 27(27): 7318-7328. 10.1523/jneurosci.1831-07.2007
- Asada A, Yamazaki R, Kino Y, Saito T, Kimura T, Miyake M, Hasegawa M, Nukina N und Hisanaga S. 2014. 'Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates and induces the degradation of ataxin-2', *Neurosci Lett*, 563(112-117). 10.1016/j.neulet.2014.01.046
- Ashizawa A T, Holt J, Faust K, Liu W, Tiwari A, Zhang N und Ashizawa T. 2019. 'Intravenously Administered Novel Liposomes, DCL64, Deliver Oligonucleotides to Cerebellar Purkinje Cells', *Cerebellum*, 18(1): 99-108. 10.1007/s12311-018-0961-2
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A und Struhl K. 2002. *Short Protocols in Molecular Biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology* (John Wiley & Sons: New York). ISBN: 978-0-471-25092-0
- Bryer A, Krause A, Bill P, Davids V, Bryant D, Butler J, Heckmann J, Ramesar R und Greenberg J. 2003. 'The hereditary adult-onset ataxias in South Africa', *J Neurol Sci*, 216(1): 47-54. 10.1016/s0022-510x(03)00209-0
- Burman J L, Bourbonniere L, Philie J, Stroh T, Dejgaard S Y, Presley J F und McPherson P S. 2008. 'Scyl1, mutated in a recessive form of spinocerebellar neurodegeneration, regulates COPI-mediated retrograde traffic', *J Biol Chem*, 283(33): 22774-22786. 10.1074/jbc.M801869200
- Caponigro G und Parker R. 1995. 'Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast', *Genes & Development*, 9(19): 2421-2432. 10.1101/gad.9.19.2421
- Choudhry S, Mukerji M, Srivastava A K, Jain S und Brahmachari S K. 2001. 'CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms', *Hum Mol Genet*, 10(21): 2437-2446. 10.1093/hmg/10.21.2437
- Dansithong W, Paul S, Figueroa K P, Rinehart M D, Wiest S, Pflieger L T, Scoles D R und Pulst S M. 2015. 'Ataxin-2 regulates RGS8 translation in a new BAC-SCA2 transgenic mouse model', *PLoS Genet*, 11(4): e1005182. 10.1371/journal.pgen.1005182
- Derry M C, Yanagiya A, Martineau Y und Sonenberg N. 2006. 'Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71(537-543). 10.1101/sqb.2006.71.061
- Donlin-Asp P G, Fallini C, Campos J, Chou C C, Merritt M E, Phan H C, Bassell G J und Rossoll W. 2017. 'The Survival of Motor Neuron Protein Acts as a Molecular Chaperone for mRNP Assembly', *Cell Rep*, 18(7): 1660-1673. 10.1016/j.celrep.2017.01.059
- Durr A. 2010. 'Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond', *Lancet Neurol*, 9(9): 885-894. 10.1016/s1474-4422(10)70183-6
- Elden A C, Kim H J, Hart M P, Chen-Plotkin A S, Johnson B S, Fang X, Armakola M, Geser F, Greene R, Lu M M et al. 2010. 'Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS', *Nature*, 466(7310): 1069-1075. 10.1038/nature09320
- Eliseeva I A, Lyabin D N und Ovchinnikov L P. 2013. 'Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation', *Biochemistry (Mosc)*, 78(13): 1377-1391. 10.1134/s0006297913130014
- Fenger-Grøn M, Fillman C, Norrild B und Lykke-Andersen J. 2005. 'Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping', *Mol Cell*, 20(6): 905-915. 10.1016/j.molcel.2005.10.031

- Fernandez M, McClain M E, Martinez R A, Snow K, Lipe H, Ravits J, Bird T D und La Spada A R. 2000. 'Late-onset SCA2: 33 CAG repeats are sufficient to cause disease', *Neurology*, 55(4): 569-572. 10.1212/wnl.55.4.569
- Fields S und Song O. 1989. 'A novel genetic system to detect protein-protein interactions', *Nature*, 340(6230): 245-246. 10.1038/340245a0
- Filla A, De Michele G, Santoro L, Calabrese O, Castaldo I, Giuffrida S, Restivo D, Serlenga L, Condorelli D F, Bonuccelli U et al. 1999. 'Spinocerebellar ataxia type 2 in southern Italy: a clinical and molecular study of 30 families', *J Neurol*, 246(6): 467-471. 10.1007/s004150050385
- Geschwind D H, Perlman S, Figueroa C P, Treiman L J und Pulst S M. 1997. 'The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia', *Am J Hum Genet*, 60(4): 842-850.
- Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L, Scheufler K, Riley B, Allotey R, Nothers C et al. 1993. 'Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1', *Nat Genet*, 4(3): 295-299. 10.1038/ng0793-295
- Giuffrida S, Lanza S, Restivo D A, Saponara R, Valvo S C, Le Pira F, Trovato Salinaro A, Spinella F, Nicoletti A und Condorelli D F. 1999. 'Clinical and molecular analysis of 11 Sicilian SCA2 families: influence of gender on age at onset', *Eur J Neurol*, 6(3): 301-307. 10.1046/j.1468-1331.1999.630301.x
- Gregersen L H, Schueler M, Munschauer M, Mastrobuoni G, Chen W, Kempa S, Dieterich C und Landthaler M. 2014. 'MOV10 Is a 5' to 3' RNA helicase contributing to UPF1 mRNA target degradation by translocation along 3' UTRs', *Mol Cell*, 54(4): 573-585. 10.1016/j.molcel.2014.03.017
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa E B, Bendahman N und Hamers R. 1993. 'Naturally occurring antibodies devoid of light chains', *Nature*, 363(6428): 446-448. 10.1038/363446a0
- Huynh D P, Del Bigio M R, Ho D H und Pulst S M. 1999. 'Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2', *Ann Neurol*, 45(2): 232-241. 10.1002/1531-8249(199902)45:2<232::aid-ana14>3.0.co;2-7
- Jiménez-López D und Guzmán P. 2014. 'Insights into the evolution and domain structure of Ataxin-2 proteins across eukaryotes', *BMC Res Notes*, 7(453). 10.1186/1756-0500-7-453
- Jønson L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen L K, Hansen T, Borup R, Johnsen A H, Christiansen J und Nielsen F C. 2007. 'Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules', *Mol Cell Proteomics*, 6(5): 798-811. 10.1074/mcp.M600346-MCP200
- Kahvejian A, Svitkin Y V, Sukarieh R, M'Boutchou M N und Sonenberg N. 2005. 'Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms', *Genes Dev*, 19(1): 104-113. 10.1101/gad.1262905
- Kambach C, Walke S, Young R, Avis J M, de la Fortelle E, Raker V A, Lührmann R, Li J und Nagai K. 1999. 'Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs', *Cell*, 96(3): 375-387. 10.1016/s0092-8674(00)80550-4
- Kasumu A W, Liang X, Egorova P, Vorontsova D und Bezprozvanny I. 2012. 'Chronic suppression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated calcium signaling in cerebellar purkinje cells alleviates pathological phenotype in spinocerebellar ataxia 2 mice', *J Neurosci*, 32(37): 12786-12796. 10.1523/jneurosci.1643-12.2012
- Kislauskis E H, Zhu X und Singer R H. 1994. 'Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype', *J Cell Biol*, 127(2): 441-451. 10.1083/jcb.127.2.441
- Lee J, Kim M, Itoh T Q und Lim C. 2018. 'Ataxin-2: A versatile posttranscriptional regulator and its implication in neural function', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 9(6): e1488. 10.1002/wrna.1488
- Ling S H, Decker C J, Walsh M A, She M, Parker R und Song H. 2008. 'Crystal structure of human Edc3 and its functional implications', *Mol Cell Biol*, 28(19): 5965-5976. 10.1128/mcb.00761-08

- Liu J, Tang T S, Tu H, Nelson O, Herndon E, Huynh D P, Pulst S M und Bezprozvanny I. 2009. 'Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 2', *J Neurosci*, 29(29): 9148-9162. 10.1523/jneurosci.0660-09.2009
- Louis E D, Kuo S H, Tate W J, Kelly G C, Gutierrez J, Cortes E P, Vonsattel J G und Faust P L. 2018. 'Heterotopic Purkinje Cells: a Comparative Postmortem Study of Essential Tremor and Spinocerebellar Ataxias 1, 2, 3, and 6', *Cerebellum*, 17(2): 104-110. 10.1007/s12311-017-0876-3
- Mangus D A, Evans M C, Agrin N S, Smith M, Gongidi P und Jacobson A. 2004. 'Positive and negative regulation of poly(A) nuclease', *Mol Cell Biol*, 24(12): 5521-5533. 10.1128/mcb.24.12.5521-5533.2004
- Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen P Y, Urlaub H, Lührmann R und Tuschl T. 2005. 'Identification of novel argonaute-associated proteins', *Curr Biol*, 15(23): 2149-2155. 10.1016/j.cub.2005.10.048
- Miroci H, Schob C, Kindler S, Ölschläger-Schütt J, Fehr S, Jungenitz T, Schwarzacher S W, Bagni C und Mohr E. 2012. 'Makorin ring zinc finger protein 1 (MKRN1), a novel poly(A)-binding protein-interacting protein, stimulates translation in nerve cells', *J Biol Chem*, 287(2): 1322-1334. 10.1074/jbc.M111.315291
- Mumenthaler M und Mattle H. 2012. *Neurologie* (Thieme: Stuttgart). ISBN: 978-3-133-80012-9
- Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzerit D, Yaspo M L, Lehrach H und Krobitch S. 2007. 'Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules', *Mol Biol Cell*, 18(4): 1385-1396. 10.1091/mbc.e06-12-1120
- Paul S, Dansithong W, Figueroa K P, Scoles D R, Pulst S M. 2018. 'Staufen1 links RNA stress granules and autophagy in a model of neurodegeneration', *Nat Commun*, 9(1): 3648.
- Peter C J, Evans M, Thayanithy V, Taniguchi-Ishigaki N, Bach I, Kolpak A, Bassell G J, Rossoll W, Lorson C L, Bao Z Z et al. 2011. 'The COPI vesicle complex binds and moves with survival motor neuron within axons', *Hum Mol Genet*, 20(9): 1701-1711. 10.1093/hmg/ddr046
- Pulst S M. 1993. 'Spinocerebellar Ataxia Type 2.' in M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens and A. Amemiya (eds.), *GeneReviews* (University of Washington, Seattle: Seattle (WA)).
- . 2018. 'The complex structure of ATXN2 genetic variation', *Neurol Genet*, 4(6): e299. 10.1212/nxg.0000000000000299
- Pulst S M, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen X N, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunkes A et al. 1996. 'Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2', *Nat Genet*, 14(3): 269-276. 10.1038/ng1196-269
- Ralser M, Albrecht M, Nonhoff U, Lengauer T, Lehrach H und Krobitch S. 2005. 'An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2', *J Mol Biol*, 346(1): 203-214. 10.1016/j.jmb.2004.11.024
- Riggs C L, Kedersha N, Ivanov P und Anderson P. 2020. 'Mammalian stress granules and P bodies at a glance', *J Cell Sci*, 133(16). 10.1242/jcs.242487
- Romano S, Coarelli G, Marcotulli C, Leonardi L, Piccolo F, Spadaro M, Frontali M, Ferraldeschi M, Vulpiani M C, Ponzelli F et al. 2015. 'Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *Lancet Neurol*, 14(10): 985-991. 10.1016/s1474-4422(15)00201-x
- Ross O A, Rutherford N J, Baker M, Soto-Ortolaza A I, Carrasquillo M M, DeJesus-Hernandez M, Adamson J, Li M, Volkening K, Finger E et al. 2011. 'Ataxin-2 repeat-length variation and neurodegeneration', *Hum Mol Genet*, 20(16): 3207-3212. 10.1093/hmg/ddr227
- Sahba S, Nechiporuk A, Figueroa K P, Nechiporuk T und Pulst S M. 1998. 'Genomic structure of the human gene for spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) on chromosome 12q24.1', *Genomics*, 47(3): 359-364. 10.1006/geno.1997.5131
- Sambrook J und Russell D W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York). ISBN: 978-0-87969-577-4
- Schmitz-Hübsch T, Coudert M, Bauer P, Giunti P, Globas C, Baliko L, Filla A, Mariotti C, Rakowicz M, Charles P et al. 2008. 'Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms', *Neurology*, 71(13): 982-989. 10.1212/01.wnl.0000325057.33666.72

- Schmitz-Hübisch T, du Montcel S T, Baliko L, Berciano J, Boesch S, Depondt C, Giunti P, Globas C, Infante J, Kang J S et al. 2006. 'Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale', *Neurology*, 66(11): 1717-1720. 10.1212/01.wnl.0000219042.60538.92
- Scoles D R, Meera P, Schneider M D, Paul S, Dansithong W, Figueroa K P, Hung G, Rigo F, Bennett C F, Otis T S et al. 2017. 'Antisense oligonucleotide therapy for spinocerebellar ataxia type 2', *Nature*, 544(7650): 362-366. 10.1038/nature22044
- Scoles D R und Pulst S M. 2018. 'Spinocerebellar Ataxia Type 2', *Adv Exp Med Biol*, 1049(175-195). 10.1007/978-3-319-71779-1_8
- Seidel K, Siswanto S, Brunt E R, den Dunnen W, Korf H W und Rüb U. 2012. 'Brain pathology of spinocerebellar ataxias', *Acta Neuropathol*, 124(1): 1-21. 10.1007/s00401-012-1000-x
- Seidel K, Siswanto S, Fredrich M, Bouzrou M, den Dunnen W F A, Özerden I, Korf H W, Melegh B, de Vries J J, Brunt E R et al. 2017. 'On the distribution of intranuclear and cytoplasmic aggregates in the brainstem of patients with spinocerebellar ataxia type 2 and 3', *Brain Pathol*, 27(3): 345-355. 10.1111/bpa.12412
- Shibata H, Huynh D P und Pulst S M. 2000. 'A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2', *Hum Mol Genet*, 9(9): 1303-1313. 10.1093/hmg/9.9.1303
- Shirokikh N E und Preiss T. 2018. 'Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 9(4): e1473. 10.1002/wrna.1473
- Styers M L, O'Connor A K, Grabski R, Cormet-Boyaka E und Sztul E. 2008. 'Depletion of beta-COP reveals a role for COP-I in compartmentalization of secretory compartments and in biosynthetic transport of caveolin-1', *Am J Physiol Cell Physiol*, 294(6): C1485-1498. 10.1152/ajpcell.00010.2008
- Sullivan R, Yau W Y, O'Connor E und Houlden H. 2019. 'Spinocerebellar ataxia: an update', *J Neurol*, 266(2): 533-544. 10.1007/s00415-018-9076-4
- Swisher K D und Parker R. 2010. 'Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*', *PLoS One*, 5(4): e10006. 10.1371/journal.pone.0010006
- Takeuchi T und Nagai Y. 2017. 'Protein Misfolding and Aggregation as a Therapeutic Target for Polyglutamine Diseases', *Brain Sci*, 7(10). 10.3390/brainsci7100128
- Tharun S. 2008. 'Chapter 4 Roles of Eukaryotic Lsm Proteins in the Regulation of mRNA Function', *Int Rev Cell Mol Biol*, 272(149-189).
- Todd A G, Lin H, Ebert A D, Liu Y und Androphy E J. 2013. 'COPI transport complexes bind to specific RNAs in neuronal cells', *Hum Mol Genet*, 22(4): 729-736. 10.1093/hmg/dd5480
- Velázquez-Pérez L C, Rodríguez-Labrada R und Fernandez-Ruiz J. 2017. 'Spinocerebellar Ataxia Type 2: Clinicogenetic Aspects, Mechanistic Insights, and Management Approaches', *Front Neurol*, 8(472). 10.3389/fneur.2017.00472
- Velázquez-Pérez L C, Voss U, Rodríguez-Labrada R, Auburger G, Canales Ochoa N, Sánchez Cruz G, Galicia Polo L, Haro Valencia R, Aguilera Rodríguez R, Medrano Montero J et al. 2011. 'Sleep disorders in spinocerebellar ataxia type 2 patients', *Neurodegener Dis*, 8(6): 447-454. 10.1159/000324374
- Velázquez Pérez L, Cruz G S, Santos Falcón N, Enrique Almaguer Mederos L, Escalona Batallan K, Rodríguez Labrada R, Paneque Herrera M, Laffita Mesa J M, Rodríguez Díaz J C, Rodríguez R A et al. 2009. 'Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: insights into SCA2 founder effect in Holguin', *Neurosci Lett*, 454(2): 157-160. 10.1016/j.neulet.2009.03.015
- Wadia N H und Swami R K. 1971. 'A new form of heredo-familial spinocerebellar degeneration with slow eye movements (nine families)', *Brain*, 94(2): 359-374. 10.1093/brain/94.2.359
- Walhout A J, Temple G F, Brasch M A, Hartley J L, Lorson M A, van den Heuvel S und Vidal M. 2000. 'GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes', *Methods Enzymol*, 328(575-592). 10.1016/s0076-6879(00)28419-x
- Whaley N R, Fujioka S und Wszolek Z K. 2011. 'Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: a review of the phenotypic and genotypic characteristics', *Orphanet J Rare Dis*, 6(33). 10.1186/1750-1172-6-33

- Wolozin B und Ivanov P. 2019. 'Stress granules and neurodegeneration', *Nat Rev Neurosci*, 20(11): 649-666. 10.1038/s41583-019-0222-5
- Xu X, Kedlaya R, Higuchi H, Ikeda S, Justice M J, Setaluri V und Ikeda A. 2010. 'Mutation in archain 1, a subunit of COPI coatomer complex, causes diluted coat color and Purkinje cell degeneration', *PLoS Genet*, 6(5): e1000956. 10.1371/journal.pgen.1000956
- Yokoshi M, Li Q, Yamamoto M, Okada H, Suzuki Y und Kawahara Y. 2014. 'Direct binding of Ataxin-2 to distinct elements in 3' UTRs promotes mRNA stability and protein expression', *Mol Cell*, 55(2): 186-198. 10.1016/j.molcel.2014.05.022

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Insbesondere geht mein Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Stefan Kindler, der mich in allen Situationen stets fachlich professionell, engagiert und freundlich betreut hat. Darüber hinaus möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe Kindler für alle Hilfestellungen und die Lösung praktischer Probleme im Labor danken.

Zuletzt möchte ich mich für die persönliche und liebevolle Unterstützung meiner Eltern wie auch meiner Freundin, Tina Fast, bedanken.

9 Lebenslauf

Name: Jan-Luca Eden

Geburtsdatum: 28.04.1998

Geburtsort: Emden

Ausbildung:

2004-2008	Grundschule Loppersum
2008-2016	Johannes Althusius-Gymnasium Emden
01/2014-07/2014	Auslandsaufenthalt South Jefferson-High School Adams, NY (USA)
07/2016	Abitur
10/2016-10/2022	Medizinstudium Universität Hamburg
03/2018	Äquivalenz zum ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2021	Zweites Staatsexamen

Praktisches Jahr:

11/2021-03/2022	Israelitisches Krankenhaus (Innere Medizin)
03/2022-06/2022	vsl. Klinikum Osnabrück (Chirurgie)
06/2022-10/2022	vsl. Evangelisches Krankenhaus Oldenburg (Neurologie)

10 Erklärung an Eides statt

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: