
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Institut für Humangenetik des
Zentrums für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin am
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Herr Prof. Dr. A. Gal

Spinocerebelläre Ataxie Typ 2

Untersuchung des zellulären Wirkmechanismus des krankheitsassoziierten Proteins Ataxin-2

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Johanna-Clarissa Alt
aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.6.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 2.2.2011

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Herr PD Dr. Stefan Kindler

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Andreas Gal

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Herr Prof. Dr. Alexander Münchau

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die spinocerebellären Ataxien	1
1.2 Die spinocerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2).....	5
1.3 Das ATXN2-Gen	7
1.4 Die Proteinbiosynthese von Atx-2.....	8
1.5 Das humane Ataxin-2 Homolog: Atx-2.....	9
1.6 Pathogenese der SCA2 ?	11
1.7 Apoptose	13
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Bakterienstämme und Zelllinien.....	16
2.1.3 Plasmid-DNA	16
2.1.3.1 Grundvektoren	16
2.1.3.2 Konstruierte eukaryotische Expressionsvektoren	17
2.1.4 Restriktionsenzyme.....	17
2.1.5 Verwendete Kits.....	18
2.1.6 Antikörper	18
2.1.6.1 Primärantikörper	18
2.1.6.2 Sekundärantikörper.....	19
2.1.7 Oligonukleotide	19
2.1.7.1 Verwendete Oligonukleotide	19
2.2 Methoden	21
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.2.1.2 PCR-Bedingungen.....	21
2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten ...	22
2.2.1.4 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	22
2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten	22
2.2.1.6 Präparation und Transformation kompetenter Bakterien	23
2.2.1.7 Bakterienkultur, Plasmidpräparation und Quantifizierung der DNA.....	23
2.2.1.8 DNA-Sequenzierung	23
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	24
2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.2.2.2 Western Blot Analyse.....	24
2.2.2.3 Affinitätschromatographie (PDZ-Pulldown)	25
2.2.2.4 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	26
2.2.2.5 Massenspektrometrie.....	26
2.2.3 Zellbiologische Methoden	26
2.2.3.1 Kultivierung von HEK-Zellen und CHO-Zellen	26
2.2.3.2 Transfektion von HEK-Zellen und CHO-Zellen	27
2.2.3.3 Kultivierung primärer Hippocampusneurone.....	28
2.2.3.4 Transfektion primärer Hippocampusneurone.....	29

2.2.3.5 Immunzytochemie.....	29
2.2.3.6 Apoptose-Assay.....	30
2.2.3.7 Mikroskopische Arbeitstechniken.....	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Charakterisierung der untersuchten Atx-2 Formen	32
3.2 Herstellung eukaryotischer Expressionsvektoren	33
3.3 Synthese rekombinanter Atx-2 Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen.....	40
3.3.1 Western Blot Analyse.....	40
3.3.2 Größe der Atx-2 Fusionsproteine.....	41
3.4 Untersuchungen zur subzellulären Atx-2 Lokalisation	42
3.4.1 Subzelluläre Lokalisation von Atx-2 in CHO-K1-Zellen.....	42
3.4.2 Subzelluläre Lokalisation von Atx-2 in primären Hippocampusneuronen der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>).....	44
3.4.2.1 Physiologisches Atx-2 in Hippocampusneuronen der Ratte	44
3.4.2.2 Pathogenes Atx-2 in Hippocampusneuronen der Ratte.....	46
3.5 Veränderung der Dendritenmorphologie durch Atx-2	47
3.5.1 Effekte der physiologischen Atx-2 Form	47
3.5.2 Effekte der pathogenen Atx-2 Form.....	49
3.6 Analyse der durch Atx-2 vermittelten Apoptose in primären Hippocampusneuronen der Ratte (Apoptose-Assay).....	51
3.6.1 Quantitative Analyse des Apoptose-Assays	54
3.7 Identifizierung putativer Atx-2 Interaktionspartner.....	56
3.7.1 Affinitätschromatographie	56
3.7.2 Ergebnisse der Affinitätschromatographie	58
3.8 Lokalisation von rekombinantem DEAD-Box Protein 6 (DDx6) in Hippocampusneuronen der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>).....	59
4 Diskussion.....	61
5 Zusammenfassung.....	74
6 Abkürzungsverzeichnis	75
7 Literaturverzeichnis	80
8 Danksagung	93
9 Eidesstattliche Erklärung	94

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Proteinbiosynthese von Atx-2	8
Abb. 1.2: Domänenstruktur von Atx-2	10
Abb. 1.3: Apoptose	14
Abb. 3.1: Konstruktion der pEGFP-Atx2 Vektoren.....	34
Abb. 3.2: Die Fusionsproteine EGFP-Atx2-Q22 und EGFP-Atx2-Q79.....	35
Abb. 3.3: Konstruktion der pAtx2-PDZ Vektoren	36
Abb. 3.4: Die Fusionsproteine Atx2-Q22-PDZ und Atx2-Q79-PDZ.....	37
Abb. 3.5: Konstruktion der pAtx2-Flag Vektoren.	39
Abb. 3.6: Die Fusionsproteine Atx2-Q22-Flag und Atx2-Q81-Flag.	39
Abb. 3.7: Western Blot Analyse.	40
Abb. 3.8: Subzelluläre Verteilung von EGFP-N3, EGFP-Atx2-Q22 und EGFP-Atx2-Q79 in CHO-K1-Zellen.	43
Abb. 3.9: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Atx2-Q22 in primären Hippocampusneuronen der Ratte.....	45
Abb. 3.10: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Atx2-Q79 in primären Hippocampusneuronen der Ratte.....	46
Abb. 3.11: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Atx2-Q22 in primären Hippocampusneuronen der Ratte 4 Tage nach Transfektion.....	48
Abb. 3.12: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Atx2-Q79 in primären Hippocampusneuronen der Ratte 4 Tage nach Transfektion.....	49
Abb. 3.13: Zwei Apoptose-positive primäre Hippocampusneurone der Ratte an Tag 3 nach Transfektion, die EGFP-ATX2-Q79 synthetisieren ...	52
Abb. 3.14: Zwei Apoptose-positive primäre Hippocampusneurone der Ratte an Tag 2 nach Transfektion, die EGFP-ATX2-Q22 synthetisieren ...	53
Abb. 3.15: Quantitative Auswertung des Apoptose-Assays.....	55
Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Affinitätschromatographie	57
Abb. 3.17: Proteingel nach Affinitätschromatographie und SDS-PAGE.....	58
Abb. 3.18: Lokalisation von rekombinantem DDx6 in Hippocampusneuronen der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	60
Abb. 4.1: Modell: Interaktion von Atx-2 und PABP während der Translation	68
Abb. 4.2: <i>Processing-bodies</i> - Der Ort des 5'-3'-mRNA-Abbaus (Modell).....	70
Abb. 4.3: Modell zu möglichen Funktionen von Atx-2 in eukaryotischen Zellen.....	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Polyglutaminexpansions-Erkrankungen	4
Tabelle 2.1: Bakterienstämme und Zelllinien	16
Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Grundvektoren.....	16
Tabelle 2.3: Übersicht über die konstruierten Plasmide	17
Tabelle 2.4: Verwendete Restriktionsenzyme	17
Tabelle 2.5: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper	18
Tabelle 2.6: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper	19
Tabelle 2.7: Übersicht über die Oligonukleotide mit Verwendungszweck.....	19
Tabelle 2.8: Übersicht über die PCR-Bedingungen.....	21
Tabelle 3.1: Kalkulierte Größe der Atx-2 Fusionsproteine in Kilodalton (kDa)	41

1 Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die spinocerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2), die aufgrund einer Mutation des Proteins Ataxin-2 (Atx-2) entsteht. Trotz guter Beschreibung des klinisch-pathologischen Phänotyps ist die physiologische Bedeutung von humanem Ataxin-2 noch unklar. Bisherige Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass Atx-2 in eukaryotischen Zellen an der Regulation des RNA-Metabolismus beteiligt ist. Zunächst soll ein Überblick über den Forschungsstand gegeben und anhand der Zielsetzung dieser Arbeit verdeutlicht werden, an welcher Stelle an die bereits vorliegenden Forschungsarbeiten angeknüpft wird.

1.1 Die spinocerebellären Ataxien

Die spinocerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2) gehört zur Gruppe der autosomal-dominant vererbten spinocerebellären Ataxien (SCAs). Diese Gruppe umfasst 28 klinisch und genetisch heterogene, neurodegenerative Erkrankungen: SCA1 bis SCA28, die Dentatorubrale pallidolysische Atrophie (DRPLA) und Chorea Huntington (HD). Die Prävalenz der SCAs liegt in einigen Populationen bei 5-7:100000 (van de Warrenburg et al., 2002). Die Inzidenz kann in Abhängigkeit von der ethnischen Zugehörigkeit variieren. In Russland ist eine hohe Inzidenz der SCA1, in Nordwestdeutschland und Spanien eine hohe Inzidenz der SCA3 und auf Kuba eine hohe Inzidenz der SCA2 beschrieben. Gemeinsames Merkmal der SCAs ist eine im Krankheitsverlauf progrediente Degeneration des Kleinhirns mit Verlust der Purkinje-Zellen und Zerstörung der Afferenzen und Efferenzen (Schols et al., 2004). Die Degeneration dieser Strukturen verursacht eine progrediente cerebelläre Ataxie mit Beginn im Erwachsenenalter, die das Leitsymptom aller SCA-Erkrankungen darstellt. Unter Ataxie versteht man eine Störung der Gleichgewichtsregulation und Bewegungskoordination. Je nach SCA-Typ bestehen neben der cerebellären Ataxie zusätzliche nicht-cerebelläre Symptome, wie Ophthalmoplegie (Augenmuskellähmung), Retinopathie (nichtentzündliche Netzhauterkrankung), pyramidale und extrapyramidale Symptome und periphere Neuropathie (Zoghbi et al., 2000).

Die eindeutige klinische Zuordnung zur jeweiligen SCA-Erkrankung wird durch Überschneidungen der Symptome innerhalb dieser Erkrankungsgruppe erschwert. 1982 wurden die SCAs als autosomal-dominant vererbte cerebelläre Ataxien (ADCA) anhand ihres Symptomkomplexes in die Gruppen ADCA I - III eingeteilt (Harding AE, 1982). Erkrankungen der Gruppe III, wie SCA5, SCA6, SCA11, SCA14, SCA15, SCA16 und SCA26 zeigen eine rein cerebelläre Degeneration. Die SCA7 aus Gruppe II zeigt neben der Kleinhirnschädigung eine pigmentöse Makuladegeneration. Bei den SCA1-4, SCA8-13, SCA17-25, SCA27-28 aus Gruppe I wird eine Degeneration des Cerebellums mit Veränderung der Basalganglien, des cerebralen Cortex, des Nervus opticus, des Spinaltraktes, der Pons, der Medulla und peripherer Nerven beschrieben (Dueñas et al., 2006). Neuropathologisch wird das Muster der neuronalen Degeneration, das für die SCA1 und SCA2 typisch ist, als olivopontocerebelläre Atrophie bezeichnet (Koeppen AH, 2005). Zellmorphologisch geht der für die meisten SCAs typische neurodegenerative Umbau bestimmter Hirnregionen mit einer Anreicherung von Proteinaggregaten im Zytoplasma oder Nukleus einher, die in der Literatur als Inklusionen bezeichnet werden (Zoghbi et al., 2000).

Die heute übliche molekulare Klassifikation teilt die SCAs in der Reihenfolge der Entdeckung des entsprechenden Gens ein, wie zum Beispiel SCA2. Die mutierten betroffenen Gene werden als ATXN-Gene (Ataxin-Gene) bezeichnet. So wird das bei der SCA2 betroffene Gen als ATXN2-Gen bezeichnet. Die Genprodukte werden als Ataxin bezeichnet, wobei die Nummer des entsprechenden SCA-Typs dem Proteinnamen angefügt wird: zum Beispiel Ataxin-2 (Atx-2). Die entsprechende mRNA wird in der vorliegenden Arbeit als Atx-2-mRNA bezeichnet. In den letzten Jahren wurde eine stetig steigende Zahl verschiedener SCAs molekulargenetisch beschrieben, so dass heute die Genloki der SCA1-3, SCA5-8, SCA10, SCA12-14, SCA17, SCA27 und DRPLA mit den jeweils zugrundeliegenden Mutationen bekannt sind (Orr et al., 1993; Pulst et al., 1996; Kawaguchi et al., 1994; Ikeda et al., 2006; Zhuchenko et al., 1997; David et al., 1997; Koob et al., 1999; Matsuura et al., 1999; Holmes et al., 1999; Waters et al., 2006; Chen et al., 2003; Nakamura et al., 2001; van Swieten et al., 2003; Koide et al., 1994).

Eine besondere Untergruppe der SCAs stellt die Gruppe der Polyglutaminexpansions-Erkrankungen dar. Molekulargenetische Analysen haben gezeigt, dass die verantwortlichen Genbereiche für diese Krankheiten aus Wiederholungen von drei DNA-Bausteinen aufgebaut sind, wie CAG (Cytosin, Adenin und Guanin) (Buselmaier et al., 2004). Diese repetitive Sequenz aus CAG-Nukleotidmotiven in der kodierenden Region des entsprechenden ATXN-Gens wird allgemein als CAG-Trinukleotidmotiv bezeichnet. Eine SCA-Erkrankung entsteht dann, wenn die definierte Länge der Trinukleotidmotiv-Sequenz durch Mutation über die normale Sequenzlänge hinaus verlängert wird. Dies wird allgemein als Trinukleotidexpansion bezeichnet, wobei die kritische Länge der Nukleotidregion je nach SCA-Typ variiert. Bei mutativer Verlängerung der Trinukleotidregion CAG, welche die Aminosäure Glutamin kodiert, entsteht eine verlängerte Polyglutaminregion im entsprechenden Protein (Zoghbi et al., 2000). Erkrankungen dieser Art gehören zur Familie der Polyglutaminexpansions-Erkrankungen. Diese Gruppe umfasst die SCA1 (Orr et al., 1993), SCA2 (Pulst et al., 1996), SCA3 (Kawaguchi et al., 1994), SCA6 (Zhuchenko et al., 1997), SCA7 (David et al., 1997), SCA17 (Nakamura et al., 2001), die Dentatorubrale pallidolysische Atrophie (DRPLA) (Koide et al., 1994), Chorea Huntington (HD) und die x-chromosomal vererbte Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA) (La Spada et al., 1991). Einige der zugrundeliegenden ATXN-Gene kodieren kein entsprechendes Ataxin. Das ATXN6-Gen kodiert die 1A-Untereinheit des P/Q-Typ-Kalziumkanals CACNA1A, während das ATXN17-Gen das nukleäre TATA-Bindeprotein kodiert. Eine Übersicht über die Polyglutaminexpansions-Erkrankungen, den Phänotyp, die subzelluläre Lokalisation des Proteins und die zugrundeliegende Mutation gibt die Tabelle 1.

Übersicht über die Polyglutaminexpansions-Erkrankungen:

SCA	Phänotyp	Protein	Lokalisation	Mutation	Genlokus
SCA1	Ataxie	Ataxin-1	Nukleus	CAG	6p22-23
SCA2	Ataxie	Ataxin-2	Zytoplasma	CAG	12q23-24
SCA3	Ataxie	Ataxin-3	Zytoplasma	CAG	14q24-31
SCA6	Ataxie	CACNA1A	Zellmembran	CAG	19p3
SCA7	Ataxie, retinale Degeneration	Ataxin-7	Nukleus	CAG	3p12-21
SCA17	Ataxie	TATA-BP	Nukleus	CAG/CAA	2q13
DRPLA	Ataxie, Demenz, Epilepsie	Atrophin-1	Zytoplasma	CAG	12q
SBMA	Muskuläre Atrophie	Androgen Rezeptor	Nukleus/ Zytoplasma	CAG	Xq11-12
HD	Kognitive und motorische Defizite	Huntingtin	Zytoplasma	CAG	4p16.3

Tabelle 1: Die Polyglutaminexpansions-Erkrankungen. Dargestellt ist die Erkrankung mit Phänotyp sowie das krankheitsassoziierte Protein mit Lokalisation, zugrundeliegender Mutation und Genlokus (modifiziert nach Evert *et al.*, 2000; Orr *et al.*, 2001; Dueñas *et al.*, 2006; Riley *et al.*, 2006). p: kurzer Arm des Chromosoms, q: langer Arm, X: X-Chromosom, CAG: Basentriplett aus Cytosin, Adenin und Guanin, SCA: spinocerebelläre Ataxie, DRPLA: Dentatorubrale pallidolysische Atrophie, HD: Chorea Huntington, SBMA: spinobulbäre muskuläre Atrophie, CACNA1A: 1A-Untereinheit des P/Q-Typ Kalziumkanals, TATA-BP: TATA-Bindeprotein.

1.2 Die spinocerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2)

Die SCA2 ist eine autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung (Lastres-Becker et al., 2008). Genetisch gehört sie zu den Polyglutaminexpansions-Erkrankungen. Ihre Prävalenz liegt in einigen Populationen zwischen 13 und 15 %. Sie stellt in Korea die häufigste Form der autosomal-dominant vererbten Ataxie dar (Lee et al., 2003). In Europa liegt die Prävalenz der SCA2 bei 1:100.000; in der Provinz Holguín auf Kuba hingegen bei 500:100.000. Nach der SCA3 und SCA6 ist die SCA2 die dritthäufigste SCA-Form in Deutschland (Riess et al., 1997). Das Leitsymptom der SCA2 ist eine progrediente cerebelläre Ataxie, die sich klinisch als Gangataxie und Standataxie äußert. Als Ataxie-Plus-Symptomatik wird das zusätzliche Auftreten von Halte- und Aktionstremor, langsam sakkadierten Augenbewegungen und Dysarthrie (Artikulationsstörung) bezeichnet (Bürk et al., 1996). Die klinische Untersuchung von SCA2-Patienten hat gezeigt, dass Chorea, Demenz, Faszikulationen und Dystonie als weitere Symptome auftreten können (Geschwind et al., 1997; Cancel et al., 1997). In klinischen Beschreibungen der SCA2 variiert die Häufigkeit kognitiver Defizite zwischen 5 und 19 % (Bürk et al., 1999). Als Frühsymptom der SCA2, die in Familien aus der Holguín-Provinz auf Kuba sehr gut untersucht wurde, wird eine langsam progrediente cerebelläre Gangataxie mit Wadenkrämpfen beschrieben (Orozco et al., 1990). Außerdem wurde bei Krankheitsbeginn bei einigen SCA2-Patienten ein Nystagmus beobachtet (Velázquez-Perez et al., 2004). Die Untersuchung von 28 SCA2-Familien ergab neben einer Augenbeteiligung in Form einer Ophthalmoplegie und Atrophie des Nervus opticus, abgeschwächte Muskeleigenreflexe, Sensibilitätsverlust und Pallhypästhesie (herabgesetztes Vibrationsempfinden), wodurch es zu einer Feinmotorikstörung der Hände kam (Giunti et al., 1998). Einige SCA2-Patienten wiesen Störungen des Sphinktertonus, faciale Myoklonien (ruckartige Zuckungen der Gesichtsmuskulatur) und Dysphagie (Schluckstörung) auf. In seltenen Fällen trat eine Spastizität auf, die neurologisch durch gesteigerte Muskeleigenreflexe, verbreiterte reflexogene Zonen, Kloni und Pyramidenbahnzeichen, wie dem positiven Babinski-Zeichen gekennzeichnet ist (Infante et al., 2005). Darüber hinaus wurde ein SCA2-Phänotyp mit L-Dopa responsivem Parkinsonismus beschrieben (Furtado et al., 2002; Lu et al., 2002; Payami et al., 2003; Infante et

al., 2004). Der L-Dopa responsive Parkinsonismus geht mit Bradykinesie (Verlangsamung der Bewegungsabläufe), Tremor (unwillkürliches Muskelzittern) und Rigor (Muskelsteifigkeit infolge Muskeltonuserhöhung) einher (Gwinn-Hardy et al., 2000; Ragothaman et al., 2004). Diese Symptome sind mit der Beobachtung vereinbar, dass Atx-2 in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra nachweisbar ist (Huynh et al., 2000b). Die reduzierte Anzahl cerebellärer Purkinje-Zellen und Körnerzellen wurde in post mortem Studien auf Kuba als morphologisches Korrelat der Ataxie bei SCA2 nachgewiesen. Die degenerative Veränderung der Dendritenmorphologie scheint eine wesentliche zelluläre Ursache für die beschriebene neurologische Symptomatik darzustellen.

Darüber hinaus wurde eine Demyelinisierung des posterioren Anteils des Rückenmarks und des Tractus spinocerebellaris mit reduzierter Größe und Anzahl der Motoneurone nachgewiesen (Orozco et al., 1989). Nervenbiopsien konnten den Verlust von Myelinscheiden bestätigen (Filla et al., 1995). Makroskopisch ist die Atrophie des Kleinhirns, Hirnstamms und mittleren Kleinhirnstiels zu beobachten. In neuropathologisch untersuchtem Hirngewebe von SCA2-Patienten konnten darüber hinaus degenerative Veränderungen der Gyri des Frontotemporallappens (Orozco et al., 1989), im Thalamus (Rüb et al., 2003), in pontinen Kernen (Rüb et al., 2004), in den Olivae inferiores, in der Substantia nigra (Taroni et al., 2004; Yomono et al., 2010), in Kernen des Hirnstamms (Rüb et al., 2005) und der weißen Gehirns substanz gezeigt werden (Armstrong et al., 2005). Elektrophysiologisch lassen sich bereits 8 Jahre vor Krankheitsausbruch verkleinerte Aktionspotentiale messen, später erst ist eine verringerte Nervenleitgeschwindigkeit messbar (Velázquez-Perez et al., 2010).

Der durchschnittliche Krankheitsbeginn der SCA2-Patienten liegt typischerweise in der vierten Lebensdekade (Klockgether et al., 1998). Patienten benötigen aufgrund starker Bewegungseinschränkungen durchschnittlich fünfzehn Jahre nach Erkrankungsbeginn einen Rollstuhl. Da eine kausale Therapie bisher nicht zur Verfügung steht, finden zur symptomatischen Behandlung der SCA2 Anticholinergika und Dopaminergika gegen Tremor, Bradykinesie und Dystonie Anwendung (Buhmann et al., 2003). Muskelrelaxantien wie Baclofen, Tizanidin oder Botulinumtoxin werden bei Spastik eingesetzt. Levodopa wird gegen Rigor, Tremor und Bradykinesie eingesetzt; Magnesium bei Muskelkrämpfen (Lastres-Becker et al., 2008). Ziel derzeitiger Forschung ist es die Krankheitsmechanismen

zu entschlüsseln, um zukünftig eine kausale Therapie entwickeln zu können. Zur Diagnosesicherung wird bereits die molekulargenetische Testung mittels PCR und DNA-Sequenzierung genutzt (Chen et al., 2009).

1.3 Das ATXN2-Gen

1996 wurde der Locus des krankheitsassoziierten ATXN2-Gens als genetische Grundlage der SCA2-Erkrankung identifiziert (Pulst et al., 1996). Es ist auf dem langen Arm von Chromosom 12 in der Region 12q23-24.1 lokalisiert, besteht aus 25 Exons und enthält im offenen Leseraster des ATXN2-Gens im Exon 1 eine CAG-Trinukleotidsequenz (Pulst et al., 1996; Manto MU, 2005). Da ein CAG-Trinukleotid die Aminosäure Glutamin kodiert, wird durch die CAG-Trinukleotidsequenz eine Polyglutaminregion definierter Länge im Protein Ataxin-2 verschlüsselt. Die SCA2 wird durch die mutative Expansion des aus CAG-Trinukleotidblöcken bestehenden repetitiven Abschnitts in der kodierenden Region des ATXN2-Gens verursacht. Dadurch ist die N-terminale Polyglutamindomäne des Genprodukts Atx-2 mutativ verlängert, was ab einer kritischen Länge der repetitiven Sequenz aus CAG-Trinukleotidmotiven aufgrund der intrazellulär toxischen Wirkung des Proteins Atx-2 zum Ausbruch der SCA2-Erkrankung führt (Everett et al., 2004). Die normale Länge der Polyglutaminregion von Atx-2 ist polymorph. Normale Allele besitzen 14 bis 32 CAG-Trinukleotidmotive (Sobczak et al., 2005). In 95 % der Fälle enthalten normale Allele entweder 22 oder 23 CAG-Triplets, die durch ein oder zwei CAA-Triplets unterbrochen sind. Es wird angenommen, dass die CAA-Triplets die meiotische Stabilität der CAG-Trinukleotidregion verbessern und eine mutative Verlängerung der CAG-Region verhindern (Choudhry et al., 2001; Sobczak et al., 2004). Krankheitsauslösende Allele besitzen im Allgemeinen mehr als 32 CAG-Trinukleotidmotive und sind nicht durch CAA-Triplets unterbrochen (Pulst et al., 1996). Durch Mutation vervielfacht sich die Anzahl der CAG-Triplets von einer Generation zur nächsten. Die Allele der Betroffenen weisen meistens zwischen 37 und 39 CAG-Triplets auf und verursachen eine Vollmutation. Bei einigen SCA2-Patienten sind extrem lange CAG-Trinukleotidregionen von mehr als 100 CAG-Triplets beschrieben (Babovic-Vuksanovic et al., 1998). Für die phänotypische Ausprägung der SCA2 wurde der Bereich zwischen 32 und 34 CAG-Einheiten eines Allels als Region reduzierter Penetranz definiert. Dies bedeutet, dass nicht alle Individuen mit einer

Trinukleotidregion dieser Länge klinische Symptome entwickeln (Riess et al., 2001). Der Krankheitsbeginn tritt in solchen Fällen erst nach dem fünfzigsten Lebensjahr ein und wird als sogenannte "late onset"-Form bezeichnet. Bei einer Mutation, die zu einer Länge von mehr als 45 CAG-Tripletts führt, erkranken die Betroffenen meist schon vor dem zwanzigsten Lebensjahr (Pulst et al., 1996; Geschwind et al., 1997). In den untersuchten Patientenkollektiven lag der Krankheitsbeginn der SCA2 zwischen dem neunten und dem fünfundsechzigsten Lebensjahr, wobei das Erkrankungsalter abhängig ist von der auf dem ATXN2-Gen kodierten Länge der Polyglutaminregion (Giunti et al., 1998). Bei den Polyglutaminexpansions-Erkrankungen besteht eine Korrelation zwischen der Verlängerung der Polyglutaminregion und der Erkrankungsschwere: je länger die Polyglutaminregion ist, desto jünger der Patient bei Krankheitsbeginn und desto ausgeprägter der Phänotyp in der nachfolgenden Generation (Forman et al., 2004; Velázquez-Perez et al., 2010). Dieses Phänomen wird als Antizipation bezeichnet und tritt bei allen Erkrankungen auf, die durch eine Trinukleotidexpansion verursacht werden.

1.4 Die Proteinbiosynthese von Atx-2

Während der Proteinbiosynthese wird das ATXN2-Gen mit der CAG Trinukleotidregion in Exon-1 (roter Kasten, Abb. 1.1) im Zellkern transkribiert

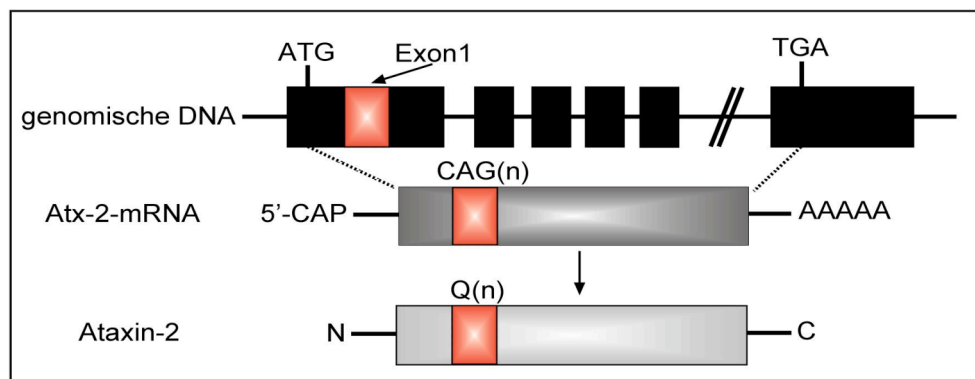


Abb. 1.1: Proteinbiosynthese von Atx-2. Dargestellt ist die genomische DNA des ATXN2-Gens mit Startkodon ATG, Stoppkodon TGA, kodierenden Exons (schwarze Boxen), nicht-kodierenden Introns (weiße Boxen) und den jenseits der gestrichelten Linien liegenden flankierenden Bereichen. Das ATXN2-Gen besteht aus 25 Exons, wobei das Exon 1 eine repetitive Sequenz aus CAG-Trinukleotidmotiven CAG(n) trägt (rote Box). Zur Synthese der Atx-2-mRNA wird die DNA transkribiert. Dabei entsteht ein primäres Transkript, das durch Spleißen der Introns modifiziert wird, sowie am 5'-Ende durch Methylierung einen 7-Methylguanositriphosphatrest (5'CAP) und 3'-Ende ein Poly-A-Signal (AAAAA) erhält. Durch Translation der Atx-2-mRNA entsteht das Protein Ataxin-2. Die CAG-Trinukleotidregion CAG(n) wird in eine Polyglutaminregion Q(n) in der Nähe des N-Terminus (N) des Proteins übersetzt; sie vermittelt die Pathogenität, wenn sie mutativ verlängert ist. In Richtung des C-Terminus (C) befinden sich viele Protein-bindende Domänen von Ataxin-2.

und es entsteht zunächst eine heteronukleäre RNA (hn-RNA). Während der posttranskriptionalen Modifikation der hn-RNA entfernt eine Endonuklease die nicht-kodierenden Introns, während eine Ligase alle kodierenden Exons miteinander verbindet. Durch Polyadenylierung erhält die mRNA ein Poly-A-Signal am 3'-Ende, das auch als Bindungsstelle für Poly(A)-Bindungsproteine (PABP) dient. Durch Methylierung wird das 5'-Ende um einen 7-Methylguanositriphosphatrest verlängert. Diese Modifikation dient der Stabilisierung der mRNA (Tarun et al., 1995). Die Translation erfolgt nach Export der Atx-2-mRNA ins Zytoplasma, wobei die CAG(n)-Region der Atx-2-mRNA in die N-terminale Polyglutaminregion Q(n) von Atx-2 übersetzt wird, die in mutativ verlängerter Form die Pathogenität des krankheitsassoziierten Proteins Atx-2 vermittelt.

1.5 Das humane Ataxin-2 Homolog: Atx-2

Physiologisches humanes Atx-2 besteht aus 1312 Aminosäuren, enthält einen Polyglutamintrakt aus 22 Aminosäuren Glutamin und ist 140 kDa groß (Huynh et al., 2000a). Es ist bereits in Herzmuskel, Plazenta, Gehirn, Leber, Skelettmuskulatur und Pankreas nachgewiesen worden (Pulst et al., 1996; Sanpei et al., 1996; Imbert et al., 1996). Im Gehirn wurde physiologisches Atx-2 im Zytoplasma von Purkinje-Zellen lokalisiert. Die Differentialzentrifugation von humanem Hirngewebe hat gezeigt, dass Atx-2 sowohl im Zytoplasma, als auch im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Shibata et al., 2000). Mutiertes humanes Atx-2 bildet bei SCA2-Patienten Aggregate im Zytoplasma der Purkinje-Zellen, die als Inklusionen bezeichnet werden (Huynh et al., 1999). Es führt hauptsächlich in Purkinje-Zellen und Hirnstamm-Neuronen zu einer Neurodegeneration, die klinisch zu progredienter Ataxie führt (Huynh et al., 2003). In cDNA-Analysen hat sich gezeigt, dass Atx-2 in Vertebraten evolutionär konserviert ist (Figuroa et al., 2003). Es existieren Atx-2 Orthologe in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* und *Arabidopsis thaliana* (Kiehl et al., 2006). Die biologische Funktion des Proteins Atx-2 und die Ursache des Zelluntergangs bei SCA2 sind bislang unbekannt. Allgemein wird angenommen, dass eine mutativ erhöhte Anzahl an Glutaminresten im Protein Atx-2 zur krankheitsverursachenden Störung der neuronalen Zellphysiologie und zum vorzeitigen Zelltod führt. Darüber hinaus besitzt humanes Atx-2 neben der

Polyglutaminregion mehrere Interaktionsdomänen und es sind bereits einige Interaktionspartner von Atx-2 bekannt, die auf eine Funktion von Atx-2 im RNA-Metabolismus hindeuten. Die Abbildung 1.2 gibt eine Übersicht über die Interaktionsmotive von Atx-2.

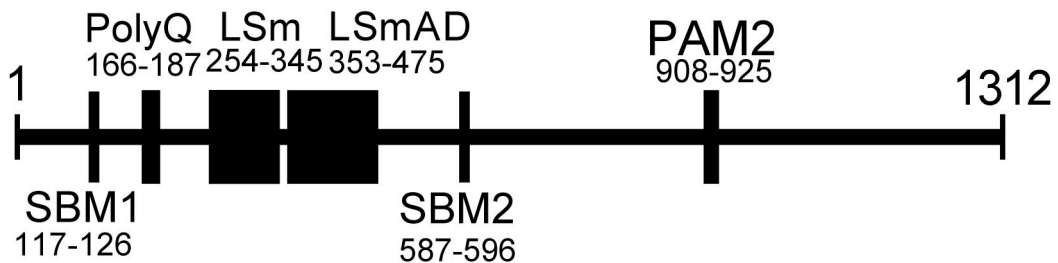


Abb. 1.2: Domänenstruktur von Atx-2. Das Protein Atx-2 besteht aus 1312 Aminosäuren (1-1312 aa). Die Prolin-reichen SH3-Bindungsdomänen SBM1 und SBM2, die Polyglutaminregion (PolyQ), die RNA-Bindungsdomänen LSm und LSmAD, sowie das PABP-Interaktionsmotiv (PAM2) sind durch schwarze Boxen dargestellt. Die kleinen Zahlen geben die Aminosäurepositionen der Domänen an, während die großen Zahlen die Aminosäuren des Proteins bezeichnen (nach Albrecht *et al.*, 2004a; Ralser *et al.*, 2005b).

Die SBM1- und SBM2-Motive von Atx-2 stellen Prolin-reiche SH3-Bindungsdomänen dar. Das Protein Endophilin-A3 bindet über seine SH3-Domäne an diese Bindungsmotive, während Endophilin-A1 nur an das C-terminale SBM2-Motiv bindet (Ralser *et al.*, 2005b). Endophilin-A1 und -A3 werden im Gehirn exprimiert und sind vermutlich an der Endozytose und Transportprozessen innerhalb der Zelle beteiligt, zumal die Kolokalisation von Endophilin-A3 und Mikrotubuli gezeigt wurde (Hughes *et al.*, 2004).

Außerdem besitzt Atx-2 die RNA-bindende LSm-Domäne (Like Sm domain) und LSmA-Domäne (Like Sm associated domain). Es konnte gezeigt werden, dass Proteine mit LSm-Domänen an verschiedenen Schritten des RNA-Metabolismus beteiligt sind (He *et al.*, 2000). In Versuchen am Drosophila-Homolog von Atx-2 vermittelte die LSm- bzw. LSmA-Domäne die direkte Bindung an RNA (Shibata *et al.*, 2000). Dies könnte auf eine Funktion von Atx-2 im RNA-Metabolismus hindeuten.

Innerhalb der LSmA-Domäne befinden sich darüber hinaus ein Clathrin-vermitteltes trans-Golgi-Signal (Aminosäuren: 414-416) und ein ER-Ausgangssignal (Aminosäuren: 426-428), sowie eine putative Caspase-3 Schnittstelle (Albrecht *et al.*, 2004a). Atx-2 scheint über diese Domänen an die Golgi-Membran binden zu können und mit Caspase-3, einem Schlüsselenzym in der Endstrecke der Apoptosekaskade in Wechselwirkung zu stehen.

Das PABP-Interaktionsmotiv 2 (PAM2) ermöglicht es Atx-2 an die C-terminale PABC-Domäne von Poly(A)-Bindungsproteinen, wie PABP-1 (cytoplasmic poly(A) binding protein 1) zu binden (Ralser et al., 2005a; Albrecht et al., 2004b; Kozlov et al., 2001). Poly(A)-Bindungsproteine interagieren mit polyadenylierter mRNA und es wird angenommen, dass sie Export, Translation, Stabilität und Abbau der mRNA regulieren (Mangus et al., 2003; Gorgoni et al., 2004; Kahvejian et al., 2005). Es kommen zum einen zytoplasmatische Poly(A)-Bindungsproteine-C1, -C3, -i und -C5 vor, welche die Formation der messenger-Ribonukleoproteinpartikel (mRNP) im Zytoplasma ermöglichen und zur Bildung der sogenannten closed-loop Struktur zu Beginn der Translation beitragen. Diese Struktur ermöglicht das sogenannte Ribosomen-Recycling, d.h.: das wiederholte Ablesen der mRNA durch das 80S-Ribosom. Darüber hinaus ist die Assoziation von mRNA und nukleären PABP für den Export einiger mRNA aus dem Zellkern nötig (Mangus et al., 2003). Dabei formieren sich durch Interaktion von mRNA und Effektorproteinen Ribonukleotidpartikel (RNP), welche innerhalb der Zelle mit Hilfe von Motorproteinen entlang der Zytoskelettfilamente an ihren Zielort transportiert und dort translatiert werden (Kindler et al., 2006).

Ein weiteres Interaktionsprotein von Atx-2 ist das Protein A2BP1 (Ataxin-2 binding protein 1) (Shibata et al., 2000). Das Protein A2BP1 gehört zur Familie putativer RNA-Bindungsproteine und bindet am C-Terminus von Atx-2, wobei die Funktion des humanen A2BP1 bisher unklar ist (Shibata et al., 2000; Kiehl et al., 2001). Allgemein ist bekannt, dass Mutationen des A2BP1-Gens zu mentaler Retardierung, Autismus und Epilepsie führen (Martin et al., 2007; Bhalla et al., 2004). In Studien an *Caenorhabditis elegans* wurde eine regulatorische Funktion beim alternativen Spleißen postuliert, während Shibata und Kollegen die Funktion des Atx-2/A2BP1-Komplexes in der Translation und im Transport von mRNA in Neuronen vermuten (Shibata et al., 2000).

1.6 Pathogenese der SCA2 ?

Im Folgenden werden einige Modelle zur Pathogenese der SCA2 dargestellt. Allgemein bekannt ist, dass die Erkrankung SCA2 durch mutative Verlängerung einer CAG-Trinukleotidregion im kodierenden Abschnitt des ATXN2-Gens verursacht wird, die eine verlängerte Polyglutaminregion des Genprodukts Atx-2

kodiert, welche die Pathogenität vermittelt. Es werden zwei unterschiedliche Theorien zur zellulären Wirkung dieser Mutation diskutiert. Die erste Theorie besagt, dass bei autosomal-dominanten Erbgängen ein mutiertes Allel ausreicht, um das Krankheitsmerkmal vollständig zur Ausprägung zu bringen. Jeder heterozygote Gen-Träger zeigt den dominanten Phänotyp. Die Aktivität des normalen Allels reicht zur Kompensation des mutierten Allels nicht aus, da nur noch 50 % des normalen Genprodukts vorhanden sind und 50 % der krankheitsassoziierten Funktionsverlustmutation unterliegen (loss of function). Die zweite Theorie besagt, dass die SCA2 durch die toxische Wirkung des mutativ veränderten Genprodukts Atx-2 entsteht (Everett et al., 2004). Diese Art der Mutation führt zur Synthese eines Genproduktes, das intrazellulär eine toxische Wirkung hat (gain of toxic function).

Weitere Überlegungen konzentrieren sich auf die in der Literatur beschriebenen neuropathologisch nachgewiesenen Zelleinschlüsse, die sich im Falle der SCA2 vorwiegend im Zytoplasma von Purkinje-Zellen, aber auch außerhalb des Kleinhirns befinden. Die Formation intranukleärer Proteinaggregate scheint für die Pathogenität von Atx-2 nicht von Bedeutung zu sein (Huynh et al., 2000a). Die Inklusionen entstehen dadurch, dass Polyglutaminregionen pathogener Länge die Proteinkonformation ändern, was Störungen der Proteinfunktion, Verlust der Proteinstabilität und Ablagerung von Proteinaggregaten bewirkt (Timchenko et al., 1996; Scherzinger et al., 1997; Ross CA, 2004; Dueñas et al., 2006). Es besteht ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Konzentration des Genproduktes Atx-2 und dem Ausbruch der SCA2. Bisher wird die toxische Wirkung von Inklusionen kontrovers diskutiert. Zum einen könnten sie den axonalen Transport und die synaptische Übertragung stören (Gunawardena et al., 2005). Zum anderen könnten sie durch Anreicherung von Ubiquitin, Proteasom, Chaperon HSP70 (Hitzeschockprotein 70) und Transkriptionsfaktoren das Ubiquitin-Proteasom-System stören (Cummings et al., 1998; Schmidt et al., 2002). Dagegen spricht aber , dass in Hirngewebe von SCA2-Patienten keine vermehrte Ubiquitylierung von Atx-2 nachgewiesen werden konnte (Huynh et al., 2000b).

Eine weitere Hypothese besagt, dass die Pathogenese der SCA2 auf eine Aktivierung der Apoptosekaskade durch das krankheitsassoziierte Protein Atx-2 zurückzuführen sei. Diese Hypothese beruht auf Beobachtungen in COS-1-Zellen, in denen Atx-2 physiologischerweise im Zytoplasma lokalisiert und mit der Golgi-

Membran assoziiert ist (Huynh et al., 2003). Interessanterweise führte aber die Synthese von mutiertem Atx-2 mit einem Polyglutaminbereich aus 58 oder 104 Glutaminen in vitro zur Fragmentierung des Golgi-Komplexes und zum Zelltod von COS-1-Zellen. Dabei verursachte die Synthese von mutiertem Atx-2 deutlich höhere Konzentrationen aktivierter Caspase-3 als das physiologische Atx-2 (Huynh et al., 2003). Darüber hinaus ist auch bekannt, dass erhöhte Atx-2 Konzentrationen Zellen von Neuroblastom-Tumoren für Apoptose sensibilisieren (Wiedemeyer et al., 2003).

Ein weiterer Ansatz zur Erforschung der SCA2 Pathogenese sind Studien an Mausmodellen. Transgene Mäuse zeigten eine spezifische Degeneration von Purkinje-Zellen, die sich phänotypisch als Ataxie manifestierte (Aguiar et al., 2006). Atx-2 knock-out Mäuse zeigten außerdem verringerte Fertilität und Fettleibigkeit (Kiehl et al., 2006, Huynh et al., 2009). Neuere Studien zur Protein-Interaktion von Atx-2 weisen auf eine Funktion im mRNA-Metabolismus hin. Die genaue Wirkung von Atx-2 in der Zelle und der Pathomechanismus von SCA2 konnte noch nicht abschließend erklärt werden.

1.7 Apoptose

Da bekannt ist, dass Proteine mit expandierten Polyglutaminregionen Apoptose induzieren (Giuliano et al., 2003), wurde in dieser Arbeit ein Apoptose-Assay mit pathogenem und physiologischem Atx-2 in Zellkultur durchgeführt. Die Apoptose ist eine spezifische Form des „programmierten Zelltods“, die morphologisch durch Pyknose, Chromatinkondensation, Chromatinfragmentierung und Abschnürung von Teilen der Plasmamembran gekennzeichnet ist. Eine Fehlregulation der Apoptose trägt zur Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen bei (Okouchi et al., 2007). Man unterscheidet den extrinsischen, rezeptorvermittelten Apoptoseweg und den intrinsischen, mitochondrialen Apoptosesignalweg (siehe Abbildung 1.3). Der intrinsische Weg wird durch einen externen, DNA-schädigenden Stimulus ausgelöst, der zur Anheftung von Proteinen der bcl-2-Familie und der bax-Familie an die Mitochondrienmembran führt. Das freigesetzte Cytochrom c bindet an das zytosolische Protein Apaf-1 und aktiviert die Caspase-Kaskade. Ein anderer Apoptoseweg wird über die Aktivierung membranständiger Rezeptoren der TNF-R-Familie (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Familie), wie CD95 vermittelt. Durch Bindung eines CD95-Liganden (CD95L) an die

Ligandenbindungsdomäne wird auf der zytosolischen Seite des Rezeptors die Bindung eines Adaptermoleküls stimuliert, das die Pro-Caspase-8 aktiviert. Gemeinsame Endstrecke beider Apoptosewege ist die Aktivierung der Initiator-Caspasen-8, -9, -10 und der Effektor-Caspase-3 (Hengartner M.O., 2000). Die Aktivierung von Caspase-3 beginnt, wenn Caspase-9 mit Apaf-1, Cytochrom c und ATP bindet (Liu et al., 1996). Die Effektor-Caspase-3 aktiviert DNAsen, welche die genomische DNA abbauen.

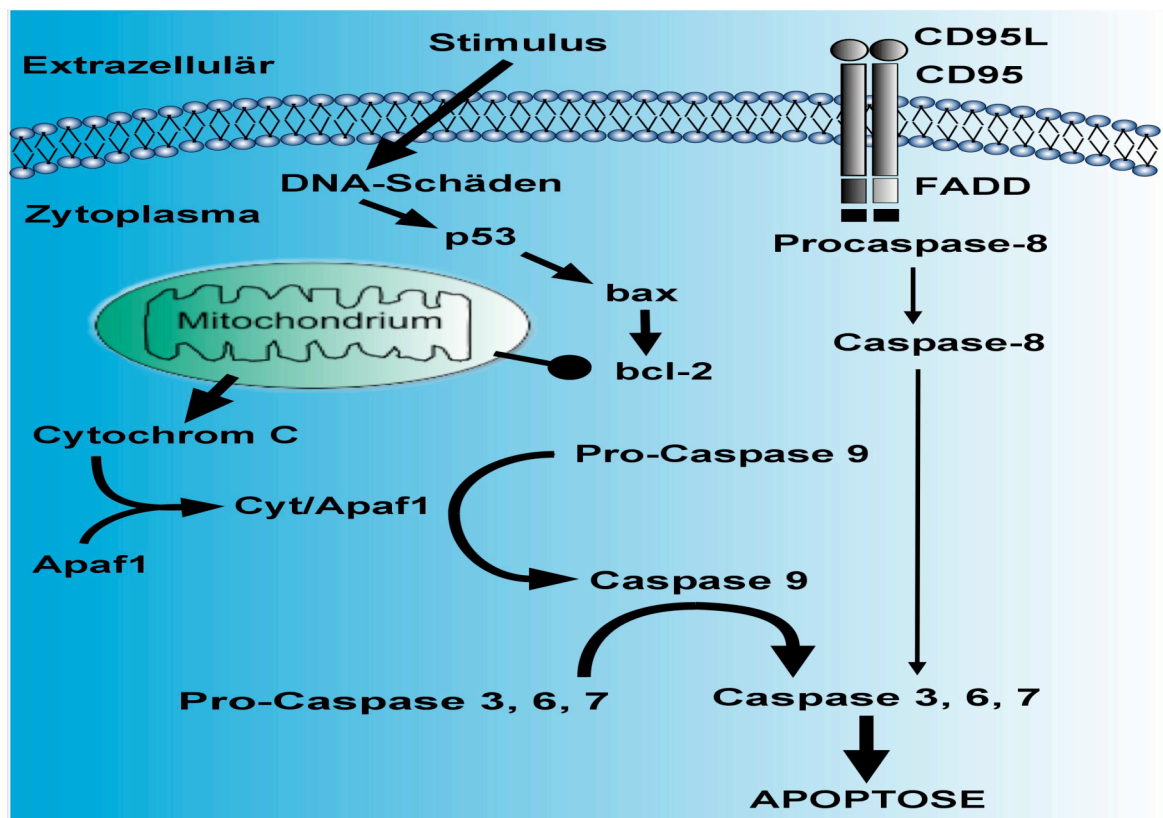


Abb. 1.3: Apoptose: Zentrale Regulationsstelle des intrinsischen Apoptoseweges ist das Mitochondrium. Durch einen externen DNA-schädigenden Stimulus kommt es unter Beteiligung von p53 und Proteinen der bax- und bcl2-Familie zur Freisetzung von Cytochrom c. Ein Komplex aus Cytochrom c und Apaf1 (Cyt/Apaf1) aktiviert die Caspase-9. Der extrinsische Apoptoseweg wird über die Aktivierung des membranständigen Rezeptors CD95 vermittelt. Durch Bindung eines CD95-Liganden (CD95L) wird auf der zytosolischen Seite des Rezeptors die Bindung eines Adaptermoleküls (FADD) stimuliert, das die Caspase-8 aktiviert. In der gemeinsamen Endstrecke der Apoptosekaskade werden die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 aktiviert. Die Effektor-Caspase-3 aktiviert DNAsen, welche die genomische DNA abbauen (nach Hengartner M.O. 2000).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des zellulären Wirkmechanismus des humanen krankheitsassoziierten Proteins Ataxin-2 (Atx-2). Mittels eukaryotischer Expressionsvektoren wurde die subzelluläre Lokalisation von physiologischem und pathogenem Atx-2 in Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*) und in CHO-K1-Zellen untersucht. Dazu wurden zwei Vektoren konstruiert, die physiologisches, humanes Atx-2 mit einer Polyglutaminregion aus 22 Aminosäuren Glutamin (Atx2-Q22) kodieren. Zum Vergleich wurden Vektoren konstruiert, die eine pathogene, humane Atx-2 Form mit einer Polyglutaminregion aus 79 Aminosäuren Glutamin (Atx2-Q79) kodieren. Außerdem wurde ein immunzytochemischer Apoptose-Assay mit Anti-ACTIVE-Caspase-3 Antikörper durchgeführt, um Hinweise zur Pathogenese der spinocerebellären Ataxie Typ 2 (SCA2) zu erhalten. Mit der Affinitätschromatographie (PDZ-Pulldown) wurde eine neue biochemische Methode eingesetzt, um neue putative Atx-2-Interaktionsproteine zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von Invitrogen, Merck, Roth oder Sigma bezogen.

2.1.2 Bakterienstämme und Zelllinien

Material	Name	Quelle
Bakterienstamm	<i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue	Stratagene
Zelllinien	<i>Chinese hamster ovary</i> K1 (CHO-K1) (<i>Cricetulus griseus</i>)	CCL-61
	<i>Human embryonic kidney</i> 293 (HEK-293) (<i>Homo sapiens</i>)	CRL-1573
Neuronale Zellen	Hippocampusneurone (<i>Rattus norvegicus</i>)	Institut für Humangenetik, UKE Hamburg

Tabelle 2.1: Bakterienstämme und Zelllinien. Die HEK-293-Zellen und die CHO-K1-Zelllinie können unter www.atcc.org bestellt werden. Die Hippocampusneurone wurden aus Rattenembryonen (*Rattus norvegicus*) am Entwicklungstag E18-E20 präpariert.

2.1.3 Plasmid-DNA

2.1.3.1 Grundvektoren

Plasmid	Quelle
pTL1-HA-Atx2-Q22 pTL1-HA-Atx2-Q79	Ralser <i>et al.</i> , (2005a), J Mol Biol. 346 (1) 203-214.
pEGFP-C3	Clontech BD Biosciences, Zugriffsnummer: #U57607
pBluescript-SK(+) II	Stratagene, Zugriffsnummer: #212205 (f1 origin in +orientation Sac→Kpn polylinker orientation)
pSTAG-TEV	Brendel <i>et al.</i> , (2004), Biochem J. 384 (2) 239-246

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Grundvektoren. Diese Plasmidvektoren wurden zur Konstruktion von eukaryotischen Expressionsvektoren verwendet.

2.1.3.2 Konstruierte eukaryotische Expressionsvektoren

Basisvektor	Konstruierte Plasmide
pEGFP-C3	pEGFP-Atx2-Q22, pEGFP-Atx2-Q79
pSTAG-TEV (Brendel <i>et al.</i> , 2004)	pAtx2-Q22-PDZ, pAtx2-Q79-PDZ
	pAtx2-Q22-Flag, pAtx2-Q81-Flag

Tabelle 2.3: Übersicht über die konstruierten Plasmide. Es wurde die humane Atx-2 cDNA mit unterschiedlich langen Polyglutaminregionen verwendet. Q22: 22 Aminosäuren Glutamin; Q79: 79 Aminosäuren Glutamin. Als Markerregionen wurden EGFP, die PDZ-Domäne von Shank 1 und das Flag-Epitop genutzt.

Die Tabelle 2.3 zeigt die Basisvektoren und die hergestellten eukaryotischen Expressionsvektoren: pEGFP-Atx2-Q22, pEGFP-Atx2-Q79, pAtx2-Q22-PDZ, pAtx2-Q79-PDZ, pAtx2-Q22-Flag und pAtx2-Q81-Flag. Sie enthalten die komplette humane Atx-2 cDNA mit unterschiedlich langen CAG-Trinukleotidregionen und einer Signaldomäne. Die Vektoren mit 22 CAG-Motiven kodieren die physiologische Form des Atx-2. Vektoren mit 79 oder 81 CAG-Trinukleotiden kodieren pathogenes Atx-2. Dies wurde so gewählt um physiologisches und pathogenes Atx-2 im Vergleich untersuchen zu können. Die Konstruktion der Expressionsvektoren ist in Abschnitt 3.1. beschrieben.

2.1.4 Restriktionsenzyme

Name	Erkennungssequenz	Konzentration	Quelle
BamHI	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'	10 U/μl	Fermentas
BglII	5'---A GATCT---3' 3'---TCTAG A---5'	10 U/μl	Fermentas
EcoRI	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'	10 U/μl	Fermentas
HindIII	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'	10 U/μl	Fermentas
KpnI	5'---GGTAC C---3' 3'---C CATGG---5'	10 U/μl	Fermentas

Tabelle 2.4: Verwendete Restriktionsenzyme. Angegeben sind die Namen der Restriktionsenzyme, ihre jeweilige Erkennungssequenz sowie die verwendete Konzentration und Quelle.

2.1.5 Verwendete Kits

Zur Aufreinigung von DNA wurden die folgenden Kits verwendet.

- 1.) E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Peqlab)
- 2.) EndoFree® Plasmid Maxi Kit (10) (Qiagen)
- 3.) QIAquick® PCR Purification Kit (250) (Qiagen)

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primärantikörper

Antikörper	Quelle	Zytochemie	Western Blot
rbAnti-GFP	Abcam, ab6556	1:1000	1:3600
mAnti-GFP	Covance, MM S-118 R	1:1000	
mAnti-Flag (M2)	Sigma, F3165	1:2000	1:3000
rbAnti- α Tubulin	Abcam, ab 4074	1:500	
rbAnti-vGLUT	Synaptic Systems, 135303	1:10.000	
mAnti-MAP2 (HM2)	Sigma, MAB 364	1:1000	
mAnti-MAP2b	BD Biosciences, 610460	1:1000	
rbAnti-SSTRIP PDZ	Dr. Kreienkamp, Institut für Humangenetik, UKE Hamburg		1:5000
rbAnti-Ataxin-2	Dr. Kindler, Institut für Humangenetik, UKE Hamburg		1:2000
Anti-ACTIVE®-Caspase-3 pAB	Promega G7481	1:250	

Tabelle 2.5: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper. Der Kleinbuchstabe vor dem Antikörpernamen definiert das Tier, aus dem der Antikörper gewonnen wurde, wie zum Beispiel rb: Kaninchen, m: Maus. Die Verdünnungen für immunzytochemische Untersuchungen und für Western Blot Analysen sind angegeben.

2.1.6.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Quelle	Zytochemie	Western Blot
Alexa Fluor®488-gAnti-rblgG	Molecular Probes, A11008	1:500	
Alexa Fluor®488-gAnti-mlgG	Molecular Probes, A11001	1:500	
Alexa Fluor®546-gAnti-mlgG	Molecular Probes, A11003	1:500	
Alexa Fluor®546-gAnti-rblgG	Molecular Probes, A11010	1:500	
Alexa Fluor®635-gAnti-mlgG	Molecular Probes, A31574	1:500	
Alexa Fluor®633-gAnti-rblgG	Molecular Probes, A21070	1:500	
HRP-sAnti-mlgG	Amersham Bioscience, NXA931		1:2500
HRP-dAnti-rblgG	GE Healthcare, NA9340V		1:2000

Tabelle 2.6: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper. Der Kleinbuchstabe vor dem Antikörpernamen definiert das Tier, aus dem der Antikörper gewonnen wurde: g: Ziege, s: Schaf, d: Esel. Der Kleinbuchstabe vor dem Immunglobulin (IgG) definiert das Antigen, gegen das sich der Antikörper richtet. rb: Kaninchen, m: Maus.

2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Invitrogen synthetisiert. Sie wurden in sterilem Wasser bis zu einer Konzentration von 10 pmol/μl verdünnt. Die Arbeitskonzentration war 1 pmol/μl.

2.1.7.1 Verwendete Oligonukleotide:

Name	Sequenz (5'→3'), Verwendungszweck	Schnittstelle
hAtx2-33s	CGTGCGAGCCGGTGTATG, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
hAtx2-34s	CTCCAAATGTGAAGTACAAGTG, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
hAtx2-35s	CGGGAAGCAAGGGCAAACC, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
hAtx2-36s	CATGGTTCTCCAGCTCCTG, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	

Tabelle 2.7: Übersicht über die Oligonukleotide mit Verwendungszweck. Fortsetzung siehe nächste Seite.

Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung):

Name	Sequenz (5'→3'), Verwendungszweck	Schnittstelle
hAtx2-37s	CCCAATGAAACATCACCTAGC, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
hAtx2-38s	CTACCCCAACTTCACCTCGG, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
CMV-1s	TGTCGTAACAACCTCCGCCCC, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
SHPDZ-2as	CGAATGTGACGGAGTAGG, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
T-3s	AATTAACCCTCACTAAAGGG, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
T-7as	CATTATGCTGAGTGATATCCCG, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
EGFP-1s	GTCCGCCCTGAGCAAAGACC, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
SVPA2as	ATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAG, Sequenzierung der Atx-2 cDNA	
hAtx2-23s	ATGCGCTCAGCGGCCGCAGC, Amplifikation der Atx-2 cDNA und Klonierung in pEGFP-C3	Not1
hAtx2-15as	CCCAATGATATGTTTCGATATAATG, Amplifikation der Atx-2 cDNA und Klonierung in pEGFP-C3	
hAtx2-21s	CCCACAACCCACCCAGTGAAG, Amplifikation der Atx-2 cDNA und Klonierung in pEGFP-C3	
hAtx2-9as	TTAGATCTAACTGCTGTTGGTGGTGGG, Amplifikation der Atx-2 cDNA und Klonierung in pEGFP-C3	BglIII
hAtx2-27s	CTAGGTACCGCCGCCACCATGG, Modifikation von pB-Atx2-U durch eine Kozak-Sequenz	Kpn1
hAtx2-28as	GTACCGCCGCCACCATGGAGCT, Modifikation von pB-Atx2-U in der 5'-Region	
hAtx2-29s	CTCATGAGCAGACGCATGCG, Modifikation der 3'-Region von pB-K-Atx2-U	Sph1
hAtx2-30as	CCCACCACCAACAGCAGTTGAAAGATCTCATATGAAA AAAAA, Modifikation der 3'-Region von pB-K-Atx2-U	BglIII, Nde1
hAtx2-39s	GATCCCGATTACAAGGATGACGACGATAAGTGATGAG ATCT, Flag-cDNA-Sequenz zur Modifikation von pB-K-hAtx2	
hAtx2-40as	ATTCTAGAGTAGTGAATAGCAGCAGTAGGAACATTAG CC, Flag-cDNA-Sequenz zur Modifikation von pB-K-hAtx2	BglIII

Tabelle 2.7: Übersicht über die Oligonukleotide mit Verwendungszweck. Die darin enthaltenen Restriktionsschnittstellen sind rot hervorgehoben. Die Start- und Stoppcodons, sowie die in hAtx2-27s enthaltene Kozak-Sequenz sind unterstrichen dargestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde die 0,25 μ l *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/ μ l, Qiagen) in 2,5 μ l 10x *Taq*-Polymerasepuffer (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Dazu wurden 1 μ l Plasmid-DNA mit 0,5 μ l dNTP-Mix (10 mM) und je 0,1 μ l *Primer* (10 pmol/ μ l) versetzt bei einem Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes von 25 μ l. Die Amplifikation wurde mit Hilfe des Gene Amp PCR System 2400 Thermocycler (Perkin Elmer) durchgeführt.

2.2.1.2 PCR-Bedingungen

PCR-Schritte	DNA-Amplifikation		Sequenzierung	
Initiale Denaturierung	5 min, 94°C		1 min, 96°C	
Denaturierung	30 sec, 94°C	32 x	20 sec, 96°C	25 x
Primer-Anlagerung	4-6°C unter der <i>Primer</i> -Schmelztemperatur		5sec, 50°C	
Kettenverlängerung	72°C 1 min/kb des gewünschten Produktes		4 min, 60°C	
Kettenverlängerung	7 min, 72°C			
Abkühlen	∞ 4°C		∞ 4°C	

Tabelle 2.8: Übersicht über die PCR-Bedingungen

Nach der PCR wurden 5 μ l des Amplifikationsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Die benötigten DNA-Fragmente wurden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten, mittels QIAquick® PCR Purification Kit (250) (Qiagen) aufgereinigt und für die Vektorkonstruktion verwendet.

2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Aliquots von PCR oder Restriktionsanalysen wurden mittels Gelelektrophorese analysiert (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden 1% Agarosegele mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Als Puffer für den Gellauf wurde 1x TAE, pH 8,3 (40 mM Tris/Acetat; 1 mM EDTA pH 8,0) verwendet. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer (Sambrook et al., 1989) versetzt, zusammen mit dem Größenstandard Gene Ruler 100 bp Ladder (Fermentas) oder Mass Ruler, DNA Ladder, High Range (Fermentas) auf das Agarosegel aufgetragen und bei 100-120 V aufgetrennt. Mit Hilfe eines UV-Tisches (UVT- 28 M, Herolab) konnten die DNA-Banden anschließend sichtbar gemacht und photographiert werden. Zur Subklonierung benötigte DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Peqlab) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.1.4 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von PCR-Fragmenten oder Plasmid-DNA erfolgte mit 10 U Restriktionsendonukleasen entsprechend den Herstellerangaben für 1 h bei 37°C. Die verschiedenen Restriktionsendonukleasen und die Restriktionspuffer wurden von Invitrogen Life Technologies, MBI Fermentas, New England Biolabs und Roche bezogen. Der Restriktionsverdau wurde durch Zugabe von 6x Ladepuffer für die Agarosegelelektrophorese beendet.

2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Ca. 0,2-1 µg der linearisierten Vektoren wurden mit einem sechsmolaren Überschuss an DNA-Fragmenten und 1 U T4-DNA Ligase (Invitrogen Life Technologies) für 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 16°C ligiert.

2.2.1.6 Präparation und Transformation kompetenter Bakterien

Die chemisch kompetenten Bakterien (*E. coli* XL1 Blue, Stratagene) wurden nach der KCM-Methode hergestellt und transformiert (Mandel *et al.*, 1970). Für die Transformation wurden 100 µl der *E. coli* Bakteriensuspension mit 20 µl KCM-Lösung (0,5 M KCl; 0,15 M CaCl₂; 0,25 M MgCl₂), 10 µl Ligationsansatz und 70 µl ddH₂O versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 37°C. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) und anschließender Inkubation für 1 h bei 37°C, wurden die Bakterienzellen für 30 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415 D). 1 ml des Überstandes wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl des Transformationsansatzes resuspendiert und auf LB-Selektionsplatten (Sambrook *et al.*, 1989) ausplattiert. Die Platten wurden für 12 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.7 Bakterienkultur, Plasmidpräparation und Quantifizierung der DNA

Erfolgreich transformierte Bakterien wurden in Abhängigkeit von der plasmidvermittelten Resistenz auf Kanamycin- oder Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten und in entsprechendem LB-Flüssigmedium bei 37°C vermehrt (Sambrook *et al.*, 1989). Zum Zentrifugieren großer Mengen an Bakterienkulturen wurde die Kühlzentrifuge (Typ R02-B, Sorvall) benutzt. Kleine Mengen an Plasmid-DNA wurden mittels alkalischer Lyse gewonnen (Sambrook *et al.*, 1989). Größere Mengen an Plasmid-DNA für Transfektionen wurden mit dem EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben gewonnen. Die Nukleinsäurekonzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines Photometers (LKB Novaspec) bestimmt oder mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (2.2.1.3).

2.2.1.8 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden im Sequenzierlabor des Instituts für Humangenetik und im Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) nach der Didesoxy-Methode durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Dazu wurden 0,4-1 µg DNA

mit 2 µl Big Dye Premix (Applied Biosystems) und 1 µl Primer (10 pmol) gemischt und mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die Sequenzierungs-PCR erfolgte in vier Schritten. Die initiale Denaturierung für 1 min bei 96°C und die Denaturierung für 20 sec bei 96°C, gefolgt von der Primeranlagerung für 5 sec bei 50°C und der Kettenverlängerung für 4 min bei 60°C. Es wurden 25 Zyklen durchlaufen. Zur Reinigung der PCR-Produkte wurden diese anschließend mit 10 µl H₂O, 2 µl 3 M NaAC und 55 µl 100% Ethanol gemischt und für 30 min bei 13.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5415 D) zentrifugiert. Es folgte ein zweiter Waschschrift mit 250 µl 70% Ethanol für 10 min bei 13.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5415 D). Anschließend wurden die PCR-Produkte bei 30°C getrocknet und im Sequenzierlabor abgegeben und sequenziert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteinauftrennung wurden 10% SDS-Gele verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Gelelektrophorese wurde mit dem Mini-Protean II System (BIO-RAD) durchgeführt. Die Proteinproben, die nach Affinitätspräzipitation (2.2.2.3) an NHS-Sepharose gebunden waren, wurden mit 30 µl 5x Laemmli-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt, für 5 min auf 100°C erhitzt und in 10% SDS-Gelen in 1x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris Base; 0,1% SDS; 192 mM Glycin) bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard diente der Full Range Rainbow Marker (Amersham Biosciences).

2.2.2.2 Western Blot Analyse

Zur immunchemischen Analyse der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden diese elektrophoretisch im Semi Dry Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (PROTEAN, Schleicher & Schuell) transferiert. Dies erfolgte in der Blot-Apparatur Trans Blot® Semi Dry Transfer Cell (BIORAD) in *Semi Dry* Blot-Puffer (25 mM Tris Base; 20% Methanol (v/v); 192 mM Glycin; 0,02% SDS) für 45-90 min bei 150 mA. Durch Färben der Nitrozellulosemembran mit *Ponceau S* Lösung (0,1% *Ponceau S* (w/v) in 5% Essigsäure (v/v), Sigma) wurde der Proteintransfer überprüft. Die Membran wurde in Wasser entfärbt und für 1 h bei RT in Blockierlösung (10% Magermilchpulver in PBS-T; 1x PBS

(Sambrook et. al., 1989) + 0,3% Tween-20) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 2.5) erfolgte bei 4°C für 16 h. Die Membran wurde dreimal für 5 min in 1x PBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden HRP (horse-radish peroxidase)-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2.6), verdünnt in 1x PBS-T, für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei Waschschritten von jeweils 10 min in 1x PBS-T wurden die antikörpermarkierten Proteine mittels ECL-Reaktion (Enhanced Chemiluminescence; Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) nach Herstellerangaben auf Röntgenfilmen (Medical X-Ray Film Cronex 5, 13x18 cm, Agfa) sichtbar gemacht.

2.2.2.3 Affinitätschromatographie (PDZ-Pulldown)

Für die Affinitätspräzipitation von Fusionsproteinen mit PDZ-Domänen (PDZ-Pulldown) wurden HEK-293-Zellen mit den Plasmiden pAtx2-Q22-PDZ und pAtx2-Q79-PDZ transfiziert (2.2.3.2). Die Zellernte erfolgte 12-24 h nach Transfektion. Dazu wurden die HEK-293-Zellen zweimal mit je 5 ml kaltem 1x PBS (Sambrook et al., 1989) gewaschen. Danach wurden sie in 1 ml 1x RIPA-Puffer (50 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% NP40; 0,5% NaDOC; 5 mM EDTA, pH 8,0; 0,1% SDS; Protease-Inhibitor Cocktail COMPLETE™, nach Herstellerangaben, Roche) für 15 min auf Eis lysiert. Die Zellsuspension wurde in 15 ml Falcon® Röhrchen bei 4°C für 15 min bei 5000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5804 R) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 100 µl/ml PMSF (0,1 M) gemischt und mit 80 µl GKAP-Sepharose-Suspension versetzt (NHS aktivierte Sepharose™, Amersham; GKAP-Peptid: IYIPEAQTRL). Ein Aliquot des Überstandes wurde für eine Western Blot Analyse abgenommen, mit 25 µl 5x Laemmli-Puffer gemischt, für 5 min gekocht und eingefroren. Nach der vierstündigen Inkubation der Zelllysate mit den Sepharosekügelchen bei 4°C auf einem Rotator, wurde die GKAP-Sepharose mit den gebundenen Proteinen fünfmal mit je 10 ml 1x RIPA-Puffer gewaschen und bei 500 x g je 1 min (Eppendorf-Zentrifuge 5804 R) zentrifugiert. Anschließend wurden die Sepharosekügelchen in 30 µl 5x Laemmli-Puffer resuspendiert und für 5 min gekocht. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE (2.2.2.1), Coomassie-Färbung (2.2.2.4) und Massenspektrometrie (2.2.2.5).

2.2.2.4 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die 10% SDS-Gele wurden zur Detektion der Proteinbanden 12 h in kolloidaler Coomassie-Färbelösung (20% Roti® Blue Coomassie-Färbelösung, Roth; 20% Methanol; 60% ddH₂O) gefärbt und zweimal 5 min lang in 25% Methanol und 1 mal 5 Minuten in ddH₂O gewaschen. Die gefärbten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (2.2.2.5).

2.2.2.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde in Zusammenarbeit mit dem Analytik-Labor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) von Herrn S. Harder durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteinbanden aus einem Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel (2.2.2.4) ausgeschnitten und analysiert (Brendel *et al.*, 2004).

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von HEK-Zellen und CHO-Zellen

Die HEK-293-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco Invitrogen) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS, Sigma) und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in Zellkulturschalen (Ø 10 cm, Sarstedt) bei 37°C in fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für die Kultivierung wurden die Zellen alle drei Tage passagiert. Zum Passagieren wurden die HEK-293-Zellen in 5-10 ml 1 x PBS-Puffer (0,14 M NaCl; 2,68 mM KCl; 10,4 mM NaHPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄; Sambrook *et al.*, 1989) gewaschen und in 1 ml 1x PBS-Puffer und 0,5 ml 0,25% Trypsin in Versene-Puffer (137 mM NaCl; 6,58 mM Na₂HPO₄; 2,68 mM KCl; 1,32 mM KH₂PO₄; 0,5 mM EDTA) bei Raumtemperatur für 3-5 min trypsinisiert. Nach Ablösen der Zellen wurde die Zellsuspension in 2,5 ml DMEM-Medium pro Kulturschale aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren. Zellsuspensionen von mehreren Kulturschalen wurden in ein 50 ml Falcon® Röhrchen überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert (Labofuge GL 2202, Sorvall® Heraeus). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml DMEM-Medium resuspendiert und auf neue Kulturschalen überführt. Die aus Ovarien des chinesischen Streifenhamsters stammenden CHO-K1-Zellen wurden

in F12-HAM Medium (Gibco[®], Invitrogen) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS, Sigma), sowie 100 U/ml Penicillin und Streptomycin (Gibco[™] Invitrogen) in Zellkulturschalen (Ø 10 cm, Sarstedt) bei 37°C in fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zur Zellpassage wurden die Zellen in 5 ml 1x PBS-Puffer (Sambrook et al., 1989) gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Trypsin (0,25% Trypsin in 1x PBS-Puffer) 2 min bei 37°C in fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit 9 ml Kulturmedium versetzt, um das Trypsin zu inaktivieren, anschließend bei 500 x g für 5 min zentrifugiert und in neuem F12-HAM Kulturmedium in einem Verhältnis von 1:10 und 1:20 auf neue Kulturschalen überführt.

2.2.3.2 Transfektion von HEK-Zellen und CHO-Zellen

Die Transfektion von HEK-293-Zellen erfolgte nach der Calciumphosphat-Methode (Sambrook et al., 1989). Pro Ansatz wurden dazu in einem 50 ml Falcon[®] Röhrchen 500 µl 2x HBSP (1,5 mM Na₂HPO₄; 10 mM KCl; 280 mM NaCl; 12 mM Glucose; 50 mM HEPES, pH 7,0) unter Einleitung steriler Luft mit einem zuvor hergestellten Mix aus 10 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) in 64 µl CaCl₂ (2 M) und 426 µl ddH₂O gemischt. Zur Bildung der Calciumphosphat-Präzipitate wurden die Ansätze 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation erfolgte die Zellpassage (2.2.3.1). Anschließend wurden die HEK-293-Zellen in einer Dichte von 2,5 x 10⁶ Zellen pro Kulturschale (10 cm Ø, Sarstedt) in 10 ml DMEM verteilt. In das DMEM Medium der ausplattierten Zellen wurde pro Zellkulturschale je 1 ml Transfektionsmix gegeben und durch Schwenken der Schale gleichmäßig verteilt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 36 h wurden die HEK-293-Zellen für immunzytochemische Untersuchungen (2.2.3.5), Western Blot Analysen (2.2.2.2) oder Affinitätschromatographie (2.2.2.3) eingesetzt. Zur Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot Analysen wurden transfizierte HEK-Zellen nach 36 h zweimal mit 5-10 ml 1x PBS gewaschen, anschließend in 1,5 ml 1x Laemmli-Puffer lysiert und für 5 min aufgeköcht. Die transiente Transfektion von CHO-K1-Zellen erfolgte mit Lipofectamine[™] 2000 Reagenz (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben einen Tag nach der Zellpassage.

2.2.3.3 Kultivierung primärer Hippocampusneurone

Die Hippocampusneurone der Ratte (*Rattus norvegicus*) wurden aus Gehirnen 18 bis 20 Tage (E18 - E20) alter Rattenembryonen präpariert (Tag der Befruchtung: E0). Die isolierten Hippocampi wurden in 1x HBSS (*Hank's balanced salt solution*, Gibco) gesammelt und durch Zugabe von 0,25% Trypsin für 15-20 min bei 37°C trypsinisiert. Anschließend wurden die Hippocampusneurone drei mal für 2-5 min in Plattiermedium (*Modified Eagle Medium*, Gibco; mit 0,6% Glucose und 10% Pferdeserum, Gibco) gewaschen und mit Hilfe feuerpolierter Pasteurpipetten (Roth) mechanisch vereinzelt. Zur Erhöhung der Effizienz der Zellvereinzellung war die Öffnung der verwendeten Pasteurpipetten auf halben Durchmesser verengt. Danach wurden 15 ml Plattiermedium zugegeben und die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Hippocampusneurone wurden in einer Zelldichte von $1,8-2 \times 10^5$ Zellen/ml in 12 ml Plattiermedium suspendiert und in einer 12-Lochplatte auf Deckgläsern (\varnothing 18 mm, Marienfeld) ausplattiert. Die Deckgläser wurden zuvor 4 h in 100% Ethanol gewaschen, danach zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, bei 200°C gebacken und 2 h mit 1 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtet. Die Hippocampusneurone wurden für 3 h bei 37°C in fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel zu Neurobasalmedium (Neurobasal Medium, Gibco; 2% B27-Supplement, Gibco; 0,5 mM L-Glutamin, Gibco; 25 µM Glutamat, Sigma). Alle sieben Tage wurde das Neurobasalmedium, jetzt ohne Zusatz von Glutamat, zur Hälfte erneuert. Um die Proliferation von Gliazellen zu hemmen, erfolgten fünf Tage nach der Präparation drei Waschschrte mit 2x HBSS. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Neurone mit Neurobasalmedium überschichtet, dem 5 µM AraC (Cytosin-Arabinosid, Sigma C6645) zugesetzt wurden.

2.2.3.4 Transfektion primärer Hippocampusneurone

Die transiente Transfektion der Hippocampusneurone erfolgt 7-9 Tage nach der Präparation mit der Calciumphosphat-Methode (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 10 µl DNA-Lösung (1 µg/µl) mit 10 µl CaCl₂ (2,5 M) und 80 µl H₂O gemischt und unter Zufuhr steriler Luft mit 100 µl 2x BBS (50 mM BES; 80 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 6,9) gemischt. Zur Bildung der Calciumphosphat-Präzipitate erfolgte eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Danach wurden je 100 µl Transfektionsansatz pro Well zugegeben und für 3 h bei 37°C in fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Zur Entfernung der Präzipitate wurden die Neurone viermal mit 2x HBSS (10 mM HEPES; 2 mM NaOH; Gibco) gewaschen. Die Neurone wurden in 1 ml frischem Neurobasalmedium pro Deckglas für 1-4 Tage ohne erneuten Mediumwechsel kultiviert.

2.2.3.5 Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden adhärent wachsende CHO-K1-Zellen auf unbeschichteten Deckgläschen (18 mm Ø, Marienfeld GmbH), HEK-293-Zellen auf Poly-D-Lysin-beschichteten (0,1 mg/ml, Sigma) und Hippocampusneurone der Ratte auf Poly-L-Lysin-beschichteten (0,1 mg/ml, Sigma) Deckgläschen in Zellkultur auf 12-Lochplatten (Ø 2,5 cm; Falcon®) kultiviert und transfiziert. Vor dem Fixieren wurden die Zellen in 1 ml 1x PBS-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) gewaschen und anschließend mit 0,5-1 ml 4% PFA (pH 7,4) für 15 min bei RT fixiert. Die fixierten Zellen wurden in drei Waschschritten jeweils 5 min in 1x PBS-Puffer gewaschen und in 0,1% *Triton X-100* für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Durch die Behandlung mit 10% NGS (*Normal goat serum*, Gibco, Invitrogen) in 1x PBS-Puffer für 30-60 min wurden unspezifische Bindungen blockiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern (verdünnt in 10% NGS in 1x PBS-Puffer) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach drei fünfminütigen Waschschritten in 1x PBS-Puffer folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Nach weiteren drei Waschschritten in 1x PBS-Puffer für jeweils 5 min trockneten die Deckgläschen bei RT. Mikroskopische Präparate wurden in flüssigem *Perma Fluor* (Beckman Coulter) auf unbeschichteten Objektträgern (~76 x 26 x 1 mm, Marienfeld GmbH) eingebettet.

2.2.3.6 Apoptose-Assay

Es wurden Hippocampusneurone der Ratte ($1,8-2 \times 10^5$ Zellen/Well) auf Poly-L-Lysin-beschichteten (0,1 mg/ml, Sigma) Deckgläschen für sieben Tage in Neurobasalmedium/Supplement kultiviert. Am siebten Tag wurden je drei Well transient mit den Konstrukten pEGFP-N3, pEGFP-Atx2-Q22 bzw. pEGFP-Atx2-Q79 transfiziert (siehe 2.2.3.4). Als Positiv-Kontrolle wurden drei Well mit untransfizierten Hippocampusneuronen mit 1 μ M MG-132 für 3 h versetzt (Giuliano et al., 1999). Danach erfolgten drei Waschschriffe mit 1x HBSS, und nach Zugabe von Neurobasalmedium/Supplement wurden die Neurone für 1-3 Tage kultiviert. Die Fixierung erfolgte nach 24 h, nach 48 h und nach 72 h mit 1 ml 4% PFA (pH 7,4) für 15 min bei RT. Nach zwei fünfminütigen Waschschriffen in 1x PBS wurden die Neurone mit 0,2% Triton X-100 für 5 min bei RT permeabilisiert und anschließend erneut dreimal für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Die unspezifischen Bindungen wurden mit 10% NGS für 1 h bei RT blockiert, das mit 1x PBS in einem fünfminütigen Waschschriff entfernt wurde. Danach erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Anti-ACTIVE[®]-Caspase-3 Antikörper (Promega) in einer Verdünnung von 1:250 (verdünnt in 10% NGS) über 12 h bei 4°C. Gleichzeitig wurde zur Dendritenfärbung ein monoklonaler Anti-MAP2 (HM2) Antikörper gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 in einer Verdünnung von 1:1000 (verdünnt in 10% NGS) eingesetzt. Zur Entfernung der Antikörper wurden die Neurone anschließend in zwei zehnminütigen Waschschriffen in 1x PBS gewaschen. Die Neurone wurden für 1 h bei RT mit einem polyklonalen Alexa 546-gekoppelten Sekundärantikörper und einem monoklonalen Alexa 635-gekoppelten Antikörper in einer Verdünnung von jeweils 1:500 in 10% NGS inkubiert. Die Präparate wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen, getrocknet und mit Perma Fluor (Beckman Coulter) auf unbeschichteten Objektträgern (~76 x 26 x 1 mm, Marienfeld GmbH) eingebettet. Zur Detektion der Fusionsproteine EGFP-N3, EGFP-Atx2-Q22 und EGFP-Atx2-Q79 wurde die EGFP-Autofluoreszenz genutzt.

2.2.3.7 Mikroskopische Arbeitstechniken

Die EGFP-Autofluoreszenz exprimierter Fusionsproteine konnte in transient transfizierten HEK-293-Zellen, CHO-K1-Zellen und in Hippocampusneuronen 12 h nach Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 40 CFL) beobachtet werden. Die mikroskopischen Präparate wurden mit Hilfe des Durchlicht- und Auflicht-Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 135, Zeiss) ausgewertet. Zum Photographieren der mikroskopischen Präparate wurde das konfokale Mikroskop DM IRBE (Leica) genutzt. Bearbeitet wurden die Aufnahmen mit den Programmen Adobe® Photoshop CS, Version 8.0.1 und Free Hand® MX, Version 11.0.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war den zellulären Wirkmechanismus des krankheitsassoziierten Proteins Ataxin-2 (Atx-2) zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine physiologische und eine pathogene Atx-2 Form im Vergleich untersucht, um zelluläre Funktionsunterschiede aufzudecken, die Rückschlüsse auf die Pathogenese der SCA2 zulassen. Die genaue Funktion des humanen Atx-2 und insbesondere die Pathogenese der spinocerebellären Ataxie Typ 2 (SCA2) sind bisher noch wenig erforscht. Daher wurde in dieser Arbeit zum einen die subzelluläre Lokalisation von Atx-2-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zelllinien mittels eukaryotischer Expressionsvektoren untersucht. Dazu wurden die CHO-K1-Zelllinie und Hippocampusneurone der Ratte (*Rattus norvegicus*) genutzt. Außerdem wurde die Wechselwirkung von Atx-2 mit Caspasen in einem Apoptose-Assay mittels Immunzytochemie analysiert. Darüber hinaus wurde mit der Affinitätschromatographie ein neues Verfahren zur Identifizierung putativer Atx-2-Interaktionspartner eingesetzt.

3.1 Charakterisierung der untersuchten Atx-2 Formen

Zur Synthese von Fusionsproteinen in eukaryotischen Zelllinien wurden eukaryotische Expressionsvektoren hergestellt. Alle Expressionsvektoren enthalten die vollständige, kodierende Region der humanen Atx-2 cDNA (NP_002964), die entweder in den Vektor pEGFP-N3 oder pSTAG-TEV inseriert und modifiziert wurde. Die Modifikation der Atx-2 cDNA erfolgte im Vektor pBluescript-SKII. Die Vektoren wurden so gewählt, dass die kodierten Atx-2 Fusionsproteine entweder eine N-terminale EGFP-Domäne (*enhanced-green-fluorescent-protein* der pazifischen Quallenart *Aequoria victoria*), eine C-terminale PDZ-Domäne von Shank 1 oder das Flag-Epitop aufweisen. Diese Domänen ermöglichten die Detektion der rekombinanten Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen mit Hilfe geeigneter Antikörper. Zur Genetik der SCA2 ist bekannt, dass normale Allele weniger als 32 und krankheitsauslösende Allele mehr als 32 CAG-Trinukleotidmotive aufweisen (Pulst et al., 1996). Da es Ziel dieser Arbeit war Unterschiede der physiologischen und der pathogenen Atx-2 Form zu untersuchen, wurden Expressionsvektoren synthetisiert, die entweder eine Atx-2

cDNA aus 22 CAG-Trinukleotiden oder aus 79 CAG-Trinukleotiden enthalten. Wobei der erstgenannte Vektor die physiologische Atx-2 Isoform und letzterer die pathogene Atx-2 Isoform kodiert. In dieser Arbeit wird die physiologische Atx-2 Isoform in Vektoren und Proteinnamen mit "-Q22" und die pathogene Isoform mit "-Q79" bzw. "-Q81" bezeichnet. Dies wurde so definiert, da ein Cytosin-Adenin-Guanin-Triplett (CAG) die Aminosäure Glutamin verschlüsselt, die im Aminosäurecode mit dem Buchstaben Q abgekürzt wird. Die in dieser Arbeit untersuchten Vektor-kodierten Atx-2 Fusionsproteine besitzen unterschiedlich lange Polyglutamindomänen. Dieser Größenunterschied lässt sich anhand der Proteingröße objektivieren, wobei das pathogene Atx-2 ca. 7 kDa größer ist. Im Folgenden wird die Konstruktion der eukaryotischen Expressionsvektoren im Detail dargestellt.

3.2 Herstellung eukaryotischer Expressionsvektoren

Zur Synthese EGFP-markierter Atx-2 Fusionsproteine (EGFP-Atx2) wurde die kodierende Region der humanen Atx-2 cDNA (nt1-1261; NP_002964) amplifiziert (Abb. 3.1). Zur Amplifikation der Atx-2 cDNA wurden die Vektoren pTL1-HA-Atx2-Q22 und pTL1-HA-Atx2-Q79 genutzt (Ralsler et al., 2005a). Im Folgenden wird die Leserichtung der Oligonukleotide auf der Atx2 cDNA mit s für sense primer (5'-3'-Richtung) und as für antisense primer (3'-5'-Richtung) bezeichnet. Die Amplifikation der Atx-2 cDNA erfolgte in zwei Teilschritten. In Abbildung 3.1 ist die Atx-2 cDNA mit Startkodon ATG, Stoppkodon TAA und Restriktionsschnittstelle BamHI dargestellt (Abb. 3.1 I). Zunächst wurde ein zwischen den Schnittstellen EcoRI und BamHI gelegenes ca. 1198 Basenpaare (bp) großes Fragment mit Hilfe der Oligonukleotidprimer hAtx2-23s und hAtx2-15as amplifiziert (Abb. 3.1 II, links). Dabei begann die Amplifikation in 5'-3'-Richtung mit Hilfe des Oligonukleotids hAtx2-23s am Startkodon ATG über die 9 bp stromaufwärts gelegene NotI-Restriktionsschnittstelle. Die Amplifikation in 3'-5'-Richtung begann 1174 bp stromaufwärts der NotI-Schnittstelle mit Hilfe des Oligonukleotids hAtx2-15as. Außerdem wurde ein zwischen den Schnittstellen BamHI und KpnI gelegenes ca. 3000 bp großes Fragment mittels der Oligonukleotide hAtx2-21s und hAtx2-9as amplifiziert (Abb. 3.1 II, rechts).

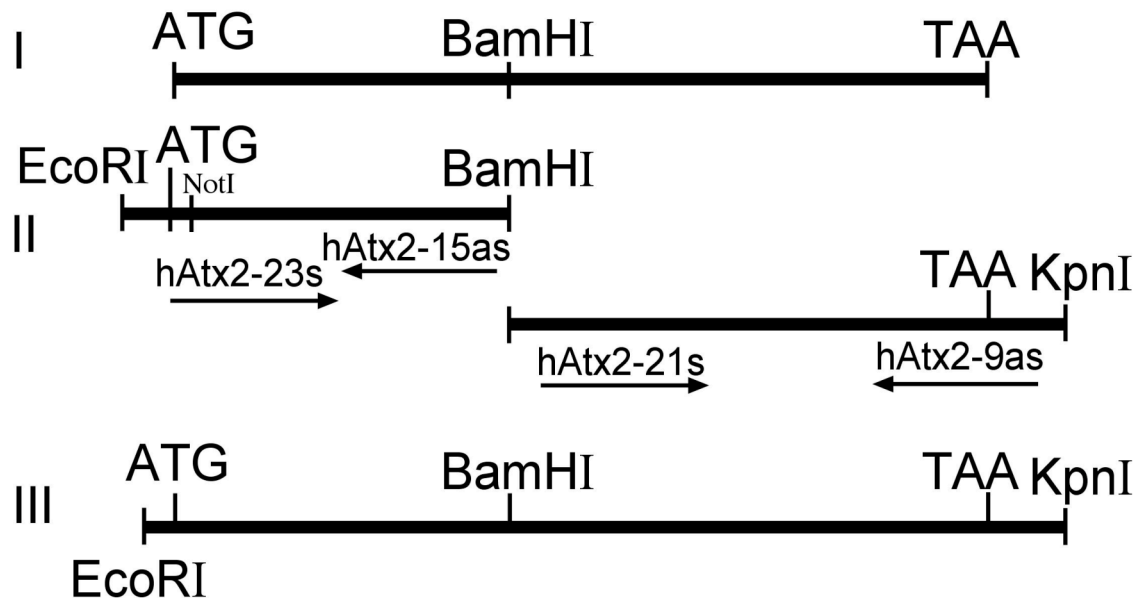


Abb. 3.1: Konstruktion der pEGFP-Atx2 Vektoren. (I) Schematische Darstellung der kodierenden Region der humanen Atx-2 cDNA mit Startcodon (ATG), Stoppcodon (TAA) und der Restriktionsschnittstelle BamHI. (II) Amplifikation eines 1198 bp großen Fragments der Atx-2 cDNA mit Hilfe der Primer hAtx2-23s und hAtx2-15as, sowie eines 3000 bp großen Fragments der Atx-2 cDNA mit Hilfe der Primer hAtx2-21s und hAtx2-9as. Die Pfeile symbolisieren die Oligonukleotidprimer. Die Bindungsstellen der Primer auf der Atx-2 cDNA wurden nummeriert und sind im Primernamen enthalten. Die Bezeichnung *s* (*sense primer*) gibt die 5'-3'-Leserichtung und *as* (*antisense primer*) die 3'-5'-Leserichtung des Primers an. EcoRI und KpnI sind Restriktionsschnittstellen, die außerhalb der kodierenden Region der Atx-2 cDNA liegen. Über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und KpnI wurden die Vektorfragmente ausgeschnitten und in die Schnittstellen EcoRI und KpnI von pEGFP-C3 eingefügt (III). Die hergestellten Vektoren werden pEGFP-Atx2-Q22 und pEGFP-Atx2-Q79 genannt und kodieren die Fusionsproteine EGFP-Atx2-Q22 und EGFP-Atx2-Q79.

Die Amplifikate wurden über eine interne BamHI-Schnittstelle miteinander fusioniert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und KpnI in den Vektor pEGFP-C3 inseriert (Abb. 3.1 III). Die hergestellten Vektoren werden mit pEGFP-Atx2-Q22 und pEGFP-Atx2-Q79 bezeichnet. Sie kodieren die Fusionsproteine EGFP-Atx2-Q22 als physiologische Atx-2 Isoform und EGFP-Atx2-Q79 als pathologische Atx-2 Isoform. Diese Vektoren sind in Abb. 3.2 schematisch dargestellt. Sie wurden zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Atx-2 in CHO-K1-Zellen und Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*) eingesetzt.

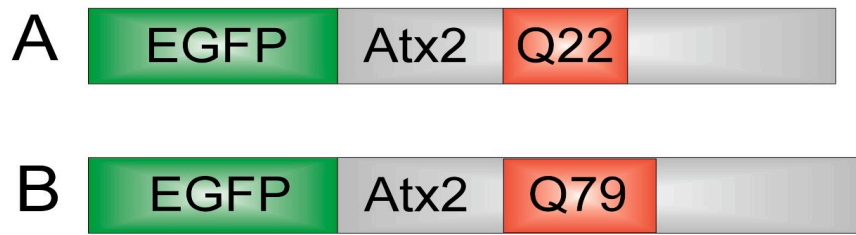


Abb. 3.2: Die Fusionsproteine A) EGFP-Atx2-Q22 und B) EGFP-Atx2-Q79. N-terminal befindet sich die EGFP-Markerregion (EGFP), C-terminal ist die Atx-2 cDNA (Atx2) mit verschiedenen langen Polyglutaminregionen (Q) dargestellt **A)** Das Schema zeigt das Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q22 mit 22 Aminosäuren Glutamin zur Untersuchung der physiologischen Form **B)** Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q79 mit 79 Aminosäuren Glutamin zur Untersuchung der pathogenen Form.

Um eine Affinitätschromatographie durchführen zu können, wurden Vektoren konstruiert, die Atx-2 Fusionsproteine mit PDZ-Domäne kodieren. Die Synthese der pAtx2-PDZ Vektoren ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Zur Herstellung dieser Vektoren wurde die vollständige humane Atx-2 cDNA aus den Vektoren pEGFP-Atx2-Q22 bzw. pEGFP-Atx2-Q79 genutzt (Abb. 3.3 I). Die Atx-2 cDNA wurde aus den genannten Vektoren über die Restriktionsschnittstellen BglIII und KpnI ausgeschnitten und ohne EGFP-Signalsequenz in die BamHI- und KpnI-Schnittstellen des Vektors pBluescript-SKII inseriert. Dabei entstand das Konstrukt pB-Atx2-U (Abb. 3.3 II). Alle Modifikationen der 3'- und 5'-untranslatierten Region (UTR) der Atx2 cDNA erfolgten im Vektor pBluescript-SKII. Im Folgenden wird die Leserichtung der Oligonukleotide auf der Atx2 cDNA mit s für sense primer (5'-3'-Richtung) und as für antisense primer (3'-5'-Richtung) bezeichnet. Die 5'-UTR (untranslatierte Region) des Vektors pB-Atx2-U wurde in der Region zwischen den Schnittstellen SpeI und HindIII durch die Oligonukleotide hAtx2-27s und hAtx2-28as modifiziert (Abb. 3.3 II). Dabei wurden die Schnittstellen SpeI und HindIII entfernt. Es wurden an dieser Stelle eine neue KpnI-Restriktionsschnittstelle (Position: 2237-2241) und eine optimale Kozak-Sequenz (GTACCGCCGCCACCATGG) eingefügt. Das Konstrukt wurde pB-K-Atx2-U genannt. Die Kozak-Sequenz ist als schwarze Ellipse dargestellt (Abb. 3.3 III).

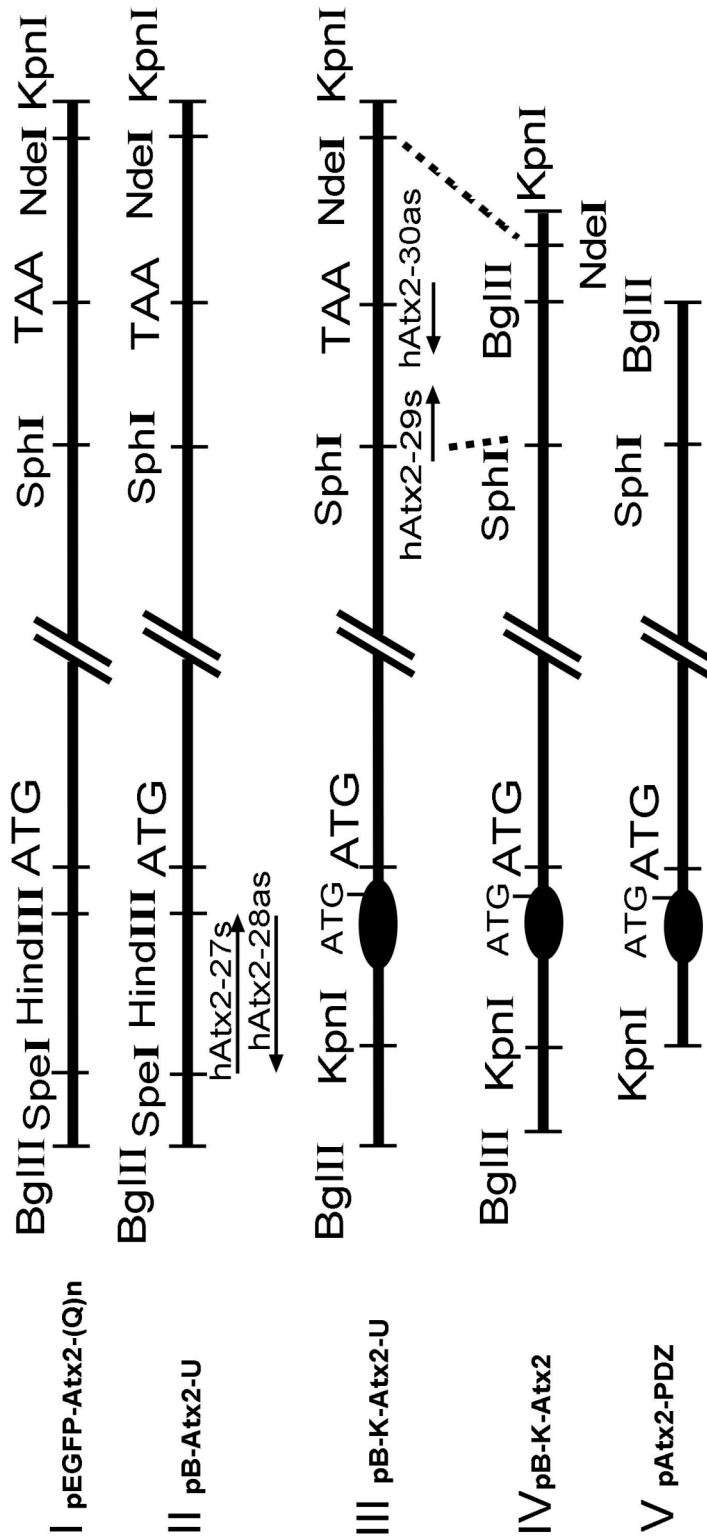


Abb. 3.3: Konstruktion der pAtx2-PDZ Vektoren. Schematisch dargestellt ist die gesamte kodierende Region der humanen Atx-2 cDNA mit Startkodon ATG, Stoppkodon TAA, sowie den flankierenden Bereichen. Der Doppelstrich (//) symbolisiert die nicht vollständig dargestellte cDNA Region. Über die Schnittstellen BglIII und KpnI wurde die Atx2 cDNA mit flankierenden Bereichen aus pEGFP-Atx2-Q22 bzw. -Q79 (als ("Q")ⁿ abgekürzt) ausgeschnitten und in die BamHI- und KpnI-Schnittstellen von pBluescript-SKII eingefügt. Es entstand pB-Atx2-U (siehe II). pB-Atx2-U wurde in der 5'-Region mit Hilfe der Oligonukleotide hAtx2-27s und hAtx2-28as durch Einfügen einer neuen KpnI-Schnittstelle und einer Kozak-Sequenz (siehe III, schwarze Ellipse) modifiziert. Dieser Vektor wird als pB-K-Atx2-U bezeichnet (siehe III). pB-K-Atx2-U wurde in der Region zwischen SphI-Schnittstelle und dem letzten Kodon der kodierenden Region durch die Oligonukleotide hAtx2-29s und hAtx2-30as modifiziert. Dabei wurde ein 679 bp großes Fragment amplifiziert, durch Entfernung des Stoppkodons verkürzt (gestrichelte Linien) und je eine zusätzliche BglIII- und NdeI-Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Produkt wurde in die SphI/NdeI-Schnittstellen von pB-K-Atx2-U eingefügt. Das neu entstandene Konstrukt wird als pB-K-Atx2 bezeichnet (siehe IV). Aus pB-K-Atx2 wird die Region zwischen KpnI- und BglIII-Schnittstelle ausgeschnitten und in die KpnI/BamHI-Schnittstellen von pSTAG-TEV inseriert (siehe V). pSTAG-TEV verfügt über eine PDZ-kodierende Region. Die neuen Konstrukte werden pAtx2-Q22-PDZ und pAtx2-Q79-PDZ genannt.

Die Kozak-Sequenz enthält ein Startkodon (ATG), das vor dem eigentlichen Startkodon (ATG) der Atx-2 cDNA liegt, und eine sehr effiziente Translation der rekombinanten mRNA ermöglicht (Kozak M, 1990). Durch die Kozak-Sequenz verlängert sich das kodierte Fusionsprotein um acht Aminosäuren. In der 3'-UTR des Vektors pB-K-Atx2-U wurde mit Hilfe der Oligonukleotide hAtx2-29s und hAtx2-30as ein 679 bp großes Fragment mittels PCR amplifiziert und modifiziert. Bei dieser Modifikation wurde das Stoppkodon (TAA) durch das hAtx2-30as Oligonukleotid entfernt, sowie je eine zusätzliche NdeI- und BglII-Schnittstelle eingefügt (Abb. 3.3 III). Anschließend wurde das PCR-Produkt über die SphI- und NdeI-Schnittstellen in den Vektor pB-K-Atx2-U eingefügt. Der neu entstandene Vektor wird danach mit pB-K-Atx2 bezeichnet (Abb. 3.3 IV). Die wie beschrieben modifizierte Atx-2 cDNA wurde über die Schnittstellen KpnI/BglII aus dem Vektor pB-K-Atx2 ausgeschnitten und in die KpnI/BamHI-Schnittstellen des Vektors pSTAG-TEV (Brendel et al., 2004) inseriert. Das neue Konstrukt wird als pAtx2-PDZ bezeichnet (Abb. 3.3 V). Der Vektor pSTAG-TEV kodiert eine C-terminale PDZ-Domäne. Um hervorzuheben, dass sich die beiden konstruierten Vektoren im Bezug auf ihre kodierte Glutaminregion unterscheiden, werden die hergestellten Vektoren in dieser Arbeit als pAtx2-Q22-PDZ und pAtx2-Q79-PDZ bezeichnet. Sie kodieren die Fusionsproteine Atx2-Q22-PDZ als physiologische und Atx2-Q79-PDZ als pathogene Atx-2 Form. Diese Fusionsproteine sind in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt. Sie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der Affinitätschromatographie (3.7.2) zur Identifikation putativer Atx-2 Interaktionsproteine eingesetzt.

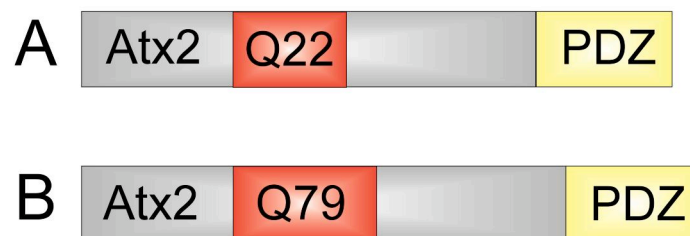


Abb. 3.4: Die Fusionsproteine A) Atx2-Q22-PDZ und B) Atx2-Q79-PDZ. N-terminal befindet sich die Atx-2 cDNA (Atx2) mit verschiedenen langen Polyglutaminregionen. **A)** Die physiologische Ax-2 Form mit 22 Aminosäuren Glutamin (Q22) und **B)** die pathogene Atx-2 Form mit 79 Aminosäuren Glutamin (Q79). C-terminal ist die PDZ-Domäne schematisch dargestellt. Die Fusionsproteine wurden in dieser Arbeit zur Affinitätschromatographie (nach Brendel et al., 2004) eingesetzt.

Wie bereits in Abbildung 3.3 dargestellt, wurden mit Hilfe der Atx-2 cDNA und dem Vektor pBluescript-SKII mehrere neue Konstrukte hergestellt. Einer dieser Vektoren, der als pB-K-Atx2 bezeichnet wurde (vgl. Abb. 3.3 IV), diente als Ausgangsmaterial für die Konstruktion der Atx2-Flag Vektoren. Der Vektor pB-K-Atx2 enthält die vollständige Atx2 cDNA, wobei sowohl ein Atx2-Flag Vektor mit 22 CAG-Motiven, als auch ein Vektor mit 79 CAG-Motiven konstruiert werden sollte. Die Vektoren enthalten eine Kozak-Sequenz, die als schwarze Ellipse dargestellt ist (Abb. 3.5 I). In pB-K-Atx2 wurde die stromabwärts der cDNA-Sequenz gelegene Region zwischen BglII- und NdeI-Schnittstelle modifiziert. Mit Hilfe der Oligonukleotide hAtx2-39s und hAtx2-40as wurde in dieser Region eine Flag-cDNA-Sequenz eingebracht (s. Abb. 3.5 II: schwarze Box symbolisiert Flag-Sequenz). Dabei wurde die ursprüngliche NdeI-Schnittstelle durch zwei Stoppkodons der Flag-Sequenz ersetzt. Die NdeI-Schnittstelle wurde durch eine neue BglII-Schnittstelle ersetzt (Abb. 3.5 II). Die gesamte Atx-2 cDNA wurde über die KpnI/BglII-Schnittstellen ausgeschnitten und in die KpnI/BamHI-Schnittstellen von pSTAG-TEV integriert. Die entstandenen Vektoren wurden als pAtx2-Q22-Flag und pAtx2-Q81-Flag bezeichnet (Abb. 3.5 III). Die kodierten Fusionsproteine sind in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt.

Nach jeder Vektorsynthese wurde die Vektor-DNA in chemokompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Aus je einer gewachsenen Kolonie wurde die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse mit Hilfe des EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (10) (Qiagen) isoliert und sequenziert. Bei der Sequenzierung des pAtx2-Q81-Flag Vektors fiel auf, dass der Vektor ein CAG-Motiv mit 81 Wiederholungen anstelle der erwarteten 79 aufwies. Dies war so nicht zu erwarten und ist wahrscheinlich spontan bei einem der Konstruktionsschritte und der Transformation in *E. coli* aufgetreten. Dies spricht für die starke Tendenz von Mutationen innerhalb des DNA-Bereichs, der eine Polyglutaminregion kodiert. Alle anderen Konstrukte wurden ebenfalls sequenziert und wiesen die erwartete Sequenz auf.

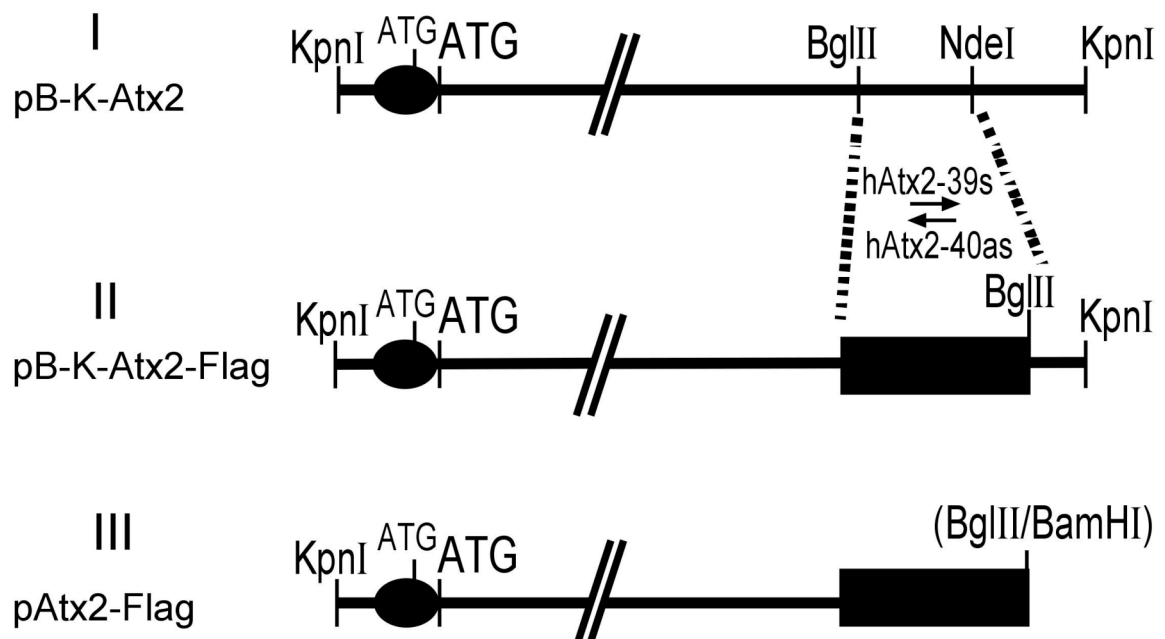


Abb. 3.5: Konstruktion der pAtx2-Flag Vektoren. (I) Das Konstrukt pB-K-Atx2 (Abb. 3.2 IV) diene als Grundlage für die Konstruktion der pAtx2-Flag Vektoren. Als Ausgangsmaterial wurde der pB-K-Atx2 Vektor verwendet (vgl. Abb. 3.3 IV). Der Doppelstrich (//) symbolisiert die nicht vollständig dargestellte Atx-2 cDNA, mit Startkodon ATG und flankierenden Regionen. Ihr vorgeschaltet ist eine optimale Kozak-Sequenz (schwarze Ellipse). Die stromabwärts auf der Atx-2 cDNA gelegene Region zwischen BglII- und NdeI-Schnittstelle wurde ausgeschnitten (durchbrochene Linien). Durch die Oligonukleotide hAtx2-39s und hAtx2-40as wurde eine Flag-cDNA-Sequenz (schwarze Box) eingefügt. Anstelle der NdeI-Schnittstelle entstand dabei eine neue BglII-Schnittstelle mit zwei vorgeschalteten Stoppkodons (II). Das entstandene Konstrukt wurde mit pB-K-Atx2-Flag bezeichnet. Die modifizierte Region wurde über die KpnI/BglII-Schnittstellen aus pB-K-Atx2-Flag ausgeschnitten und in die KpnI/BamHI-Schnittstellen von pSTAG-TEV inseriert (III). Die neu entstandenen Vektoren wurden als pAtx2-Q22-Flag und pAtx2-Q81-Flag bezeichnet. Sie kodieren die Fusionsproteine Atx2-Q22-Flag und Atx2-Q81-Flag.

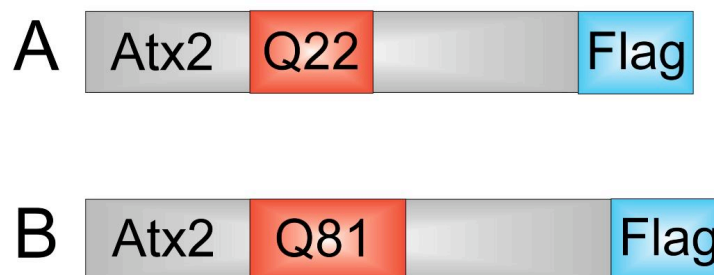


Abb. 3.6: Die Fusionsproteine A) Atx2-Q22-Flag und B) Atx2-Q81-Flag. Das Schema zeigt N-terminal die Atx-2 cDNA (Atx2) mit Polyglutaminregion (Q) und C-terminal die Flag-cDNA-Sequenz (Flag).

3.3 Synthese rekombinanter Atx-2 Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen

3.3.1 Western Blot Analyse

Zur Überprüfung der vollständigen Synthese der Vektor-kodierten Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen mittels Western Blot Analyse wurden HEK-293-Zellen transient mit folgenden Konstrukten transfiziert: pEGFP-Atx2-Q22, pEGFP-Atx2-Q79, pAtx2-Q22-PDZ, pAtx2-Q79-PDZ, pAtx2-Q22-Flag und pAtx2-Q81-Flag.

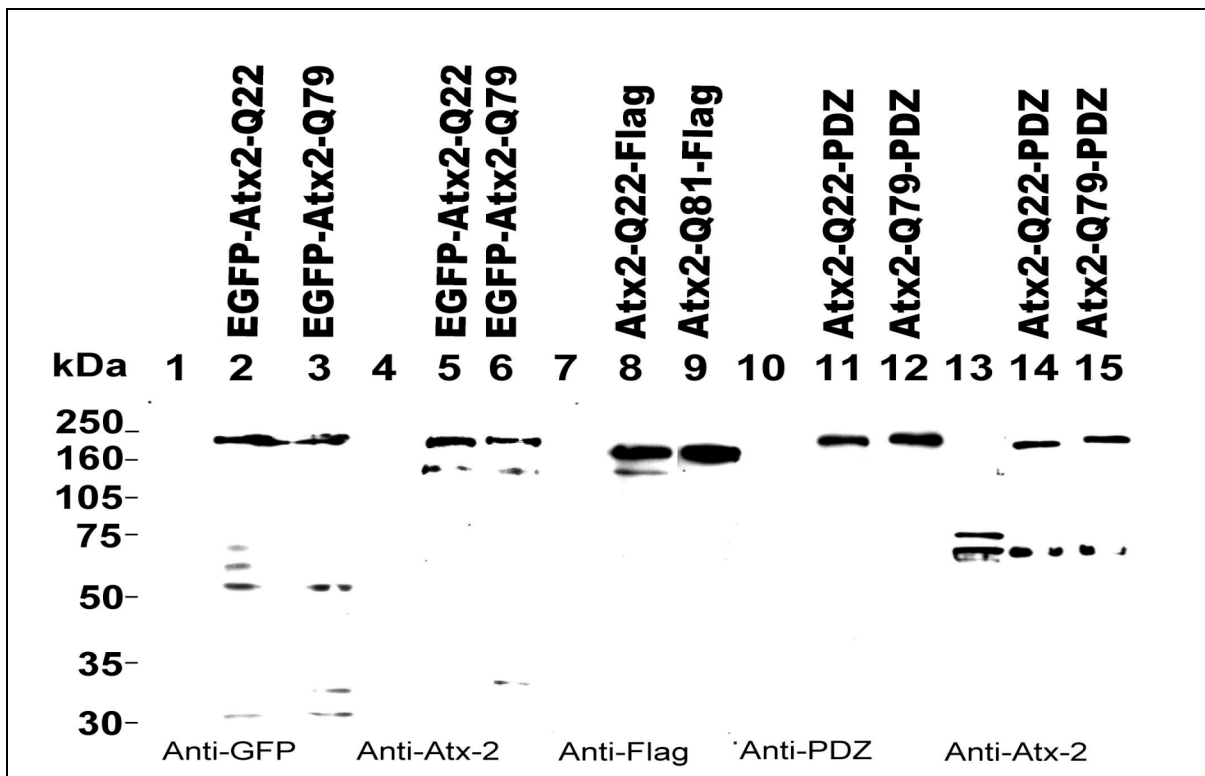


Abb. 3.7: Western Blot Analyse. Zum Nachweis von Atx-2 Fusionsproteinen in HEK-293-Zelllysaten wurden die HEK-293-Zellen mit pEGFP-Atx2 (Spuren 2,3,5,6), pAtx2-Flag (Spuren 8,9) und pAtx2-PDZ (Spuren 11,12,14,15) transient transfiziert und nach 3 Tagen in Zellkultur in 5x Laemmli-Puffer lysiert. Um die Fusionsproteine detektieren zu können, wurden die Zelllysate und eine untransfizierte Kontrolle auf einem 10% SDS-Gel nach der Größe aufgetrennt und auf Nitrozellulosefolie übertragen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mittels Primärantikörpern gegen GFP (Spuren 1-3), Ataxin-2 (Spuren 4-6 und 13-15), das Flag-Epitop (Spuren 7-9) und die PDZ-Domäne (Spuren 10-12). Die verwendeten Primärantikörper sind in der letzten Zeile angegeben. Es wurden die jeweiligen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper verwendet. Der Größenstandard in Kilodalton (kDa) ist oben links angegeben. Das Lysat untransfizierter HEK-Zellen diente als Kontrolle (Spuren 1,4,7,10,13). Die Fusionsproteine wurden in den folgenden Spuren detektiert. Spur 2: EGFP-Atx2-Q22, Spur 3: EGFP-Atx2-Q79, Spur 5: EGFP-Atx2-Q22, Spur 6: EGFP-Atx2-Q79, Spur 8: Atx2-Q22-Flag, Spur 9: Atx2-Q81-Flag, Spur 11: Atx2-Q22-PDZ, Spur 12: Atx2-Q79-PDZ, Spur 14: Atx2-Q22-PDZ, Spur 15: Atx2-Q79-PDZ.

Nach 72 h wurden durch Zugabe von 5x Laemmli-Puffer HEK-Zelllysate gewonnen und analysiert. Als Kontrolle wurde Lysat untransfizierter HEK-293-

Zellen verwendet (Abb. 3.7.: Spuren 1, 4, 7, 10, 13). Die Lysate wurden auf einem 10% SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosefolie übertragen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mit Antikörpern gegen Ataxin-2, gegen die EGFP-Markerregion, die PDZ-Domäne und das Flag-Epitop. Die Western Blot Analyse ergab, dass die mittels Antikörper detektierten Proteinbanden den Fusionsproteinen entsprechen. Wie in Abbildung 3.7 dargestellt, wurden folgende Fusionsproteine detektiert: EGFP-Atx2-Q22 (Spuren 2, 5), EGFP-Atx2-Q79 (Spuren 3, 6), Atx2-Q22-Flag (Spur 8) und Atx2-Q81-Flag (Spur 9) sowie Atx2-Q22-PDZ (Spuren 11, 14) und Atx2-Q79-PDZ (Spuren 12, 15). Daraus konnte geschlossen werden, dass die HEK-293-Zellen die Fusionsproteine vollständig synthetisieren.

Mit dem Programm Gene Construction Kit[®] wurde die zu erwartende Größe der Fusionsproteine berechnet und sie stimmt mit den im Western Blot detektierten Bandengrößen der Fusionsproteine überein (vgl. Tabelle 3.1). Der Größenunterschied zwischen mutierter und physiologischer Atx-2 Form entspricht 7 kDa, was auf die verlängerte Polyglutaminregion des pathogenen Atx-2 zurückgeführt wurde. In der Western Blot Analyse ließ sich dieser Größenunterschied am deutlichsten anhand der Fusionsproteine Atx2-Q22-PDZ und Atx2-Q79-PDZ zeigen (Abb. 3.7, rechts oben: Spuren 11, 12). Als Kontrolle wurde Zelllysat untransfizierter HEK-293-Zellen verwendet. In den Kontroll-Spuren 1, 4, 7, 10 sind keine Banden sichtbar, jedoch in Kontroll-Spur 13. Daher kann eine Kreuzreaktivität zwar für den EGFP- und Flag-Antikörper ausgeschlossen werden, nicht jedoch für den verwendeten Ataxin-2 Antikörper.

3.3.2 Größe der Atx-2 Fusionsproteine

Fusionsprotein	Kalkulierte Proteingröße (kDa)
EGFP-Atx2-Q22	168
EGFP-Atx2-Q79	175
Atx2-Q22-Flag	142
Atx2-Q81-Flag	149
Atx2-Q22-PDZ	157
Atx2-Q79-PDZ	164

Tabelle 3.1: Kalkulierte Größe der Atx-2 Fusionsproteine in Kilodalton (kDa).

3.4 Untersuchungen zur subzellulären Atx-2 Lokalisation

3.4.1 Subzelluläre Lokalisation von Atx-2 in CHO-K1-Zellen

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von Atx-2 wurden CHO-K1-Zellen gewählt, da diese Zelllinie eine hohe Plasma-Kern-Relation aufweist. Die CHO-K1-Zellen wurden transient mit den Konstrukten pEGFP-Atx2-Q22, pEGFP-Atx2-Q79 und pEGFP-N3 transfiziert, nach 24 h mit 4% PFA fixiert und immunzytochemisch untersucht. Die Transfektion des pEGFP-N3 Vektors diente als Kontrolle.

Die rekombinanten Fusionsproteine EGFP-Atx2-Q22 und EGFP-Atx2-Q79, sowie EGFP wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen die EGFP-Markerregion detektiert (im grünen Kanal dargestellt; Abb. 3.8 A, D und G). Die Mikrotubuli des Zytoskeletts wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen α -Tubulin nachgewiesen (im roten Kanal dargestellt; Abb. 3.8 B, E und H). EGFP-N3 war zytoplasmatisch und nukleär nachweisbar (Abb. 3.8 A). Das Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q22 repräsentiert die physiologische Atx-2 Form und ist im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 3.8 F). Die pathogene Atx-2 Form wird durch das Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q79 repräsentiert und liegt ebenfalls im Zytoplasma der Zelle vor (Abb. 3.8 I). In der Überlagerung der Kanäle ist an der Gelbfärbung erkennbar, dass teilweise eine Kolo-kalisation von EGFP und α -Tubulin vorhanden ist (Abb. 3.8 C). Dies spricht für eine Assoziation von EGFP mit dem Zytoskelett. Die Überlagerung der Kanäle zeigt auch, dass physiologisches Atx-2 (Abb. 3.8 F) und pathogenes Atx-2 (Abb. 3.8 I) nicht mit dem Zytoskelett assoziiert sind, da keine Gelbfärbung nachweisbar ist. Bezüglich der Lokalisation in CHO-K1-Zellen unterscheiden sich die pathogene und physiologische Atx-2 Form nicht voneinander.

Die Abbildung zeigt, dass sowohl EGFP-Atx2-Q22, als auch EGFP-Atx2-Q79 in CHO-K1-Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 3.8 D+F; G+I).

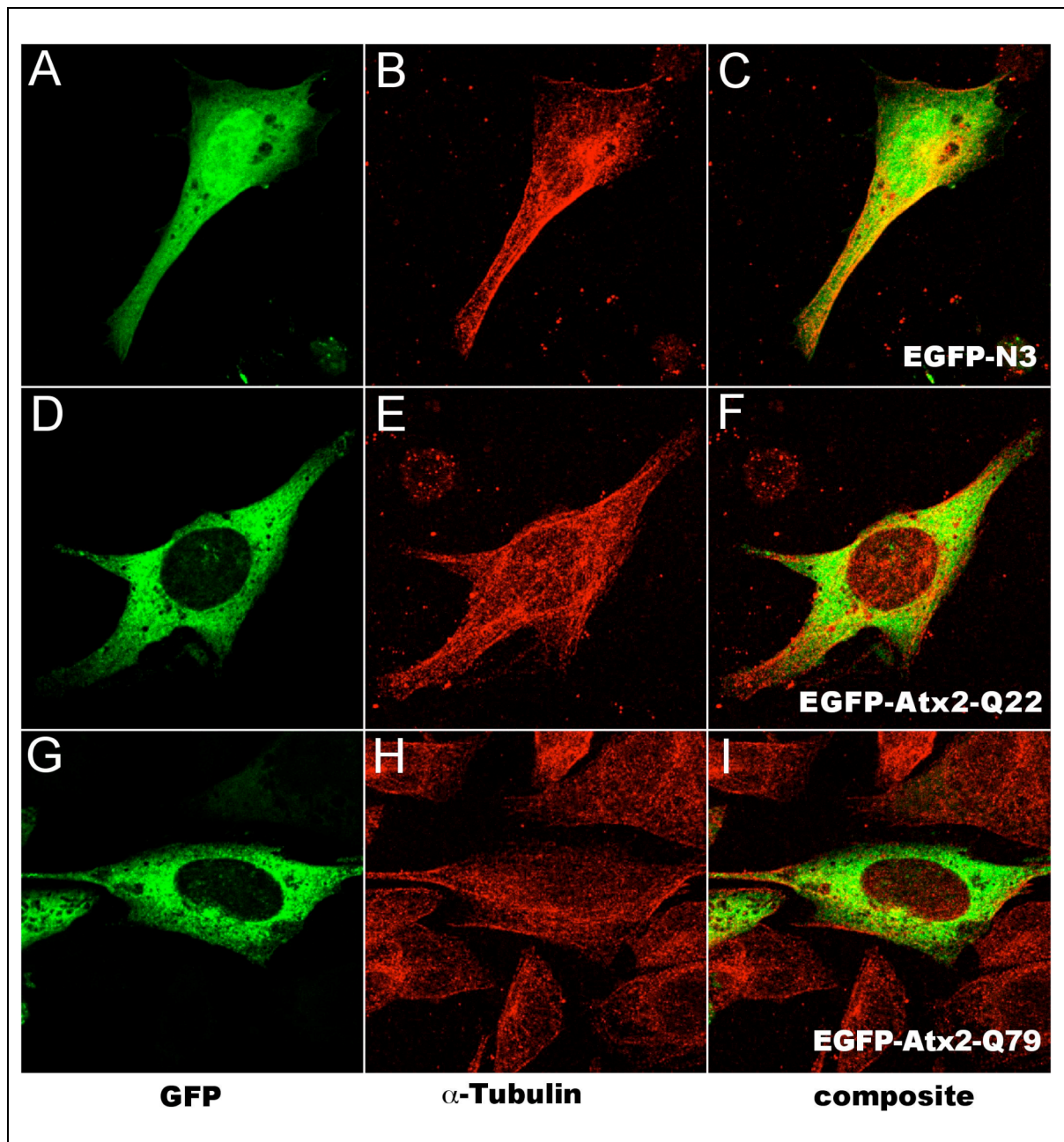


Abb. 3.8: Subzelluläre Verteilung von EGFP-N3, EGFP-Atx2-Q22 und EGFP-Atx2-Q79 in CHO-K1-Zellen. CHO-K1-Zellen wurden mit pEGFP-N3 (A-C), pEGFP-Atx2-Q22 (D-F) und pEGFP-Atx2-Q79 (G-I) transfiziert und 24 h nach Transfektion fixiert. Immunzytochemisch wurden EGFP (A) und die Fusionsproteine EGFP-Atx2-Q22 und EGFP-Atx2-Q79 (D,G) mit Hilfe eines monoklonalen GFP-Antikörpers (1:2000) und Alexa 488-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:500) detektiert. Mikrotubuli wurden mit Hilfe eines polyklonalen α -Tubulin Antikörpers (1:250) und Alexa 546-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:500) detektiert (B,E,H). Die Überlagerung der Kanäle zeigt, dass physiologisches Atx-2 (D) und pathogenes Atx-2 (G) im Zytoplasma vorkommen und nicht mit dem Zytoskelett assoziiert vorliegen (F, I). Im Vergleich dazu kommt EGFP im Zytoplasma und nukleär vor (A) und ist teilweise mit dem Zytoskelett assoziiert, was an der Gelbfärbung erkennbar ist (C).

3.4.2 Subzelluläre Lokalisation von Atx-2 in primären Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*)

3.4.2.1 Physiologisches Atx-2 in Hippocampusneuronen der Ratte

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der physiologischen (EGFP-Atx2-Q22) und pathogenen Atx-2 Form (EGFP-Atx2-Q79) in Hippocampusneuronen wurden primäre Hippocampusneurone der Ratte (*Rattus norvegicus*) am Tag 8 in Zellkultur transient mit den Konstrukten pEGFP-Atx2-Q22 und pEGFP-Atx2-Q79 transfiziert und nach 24 h mit 4% PFA fixiert. In der immunzytochemischen Analyse wurden die Fusionsproteine durch EGFP-Autofluoreszenz nachgewiesen.

Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, ist das Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q22 im Zytoplasma und in kleinen granulären Strukturen in den neuronalen Dendriten nachweisbar (Abb. 3.9 A, im grünen Kanal dargestellt). Die Synapsen wurden durch einen polyklonalen Antikörper gegen den vesikulären Glutamattransporter vGLUT detektiert und mit einem Alexa 546-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt (Abb. 3.9 B, im roten Kanal dargestellt). Die Dendriten wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (MAP2) und einem Alexa 635-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert (Abb. 3.9 C, im blauen Kanal dargestellt). Die Überlagerung der Kanäle zeigt, dass die physiologische Atx-2 Form im Zytoplasma und teilweise punktförmig in kleinen Granula in den Dendriten der Hippocampusneurone nachweisbar ist (Abb. 3.9 D, Überlagerung der Kanäle). Dagegen konnte die physiologische Atx-2 Form weder in den Synapsen, noch im Nukleus der Hippocampusneurone nachgewiesen werden. Die Untersuchung der physiologischen Atx-2 Form in Hippocampusneuronen der Ratte ergab, dass es sich um ein zytoplasmatisches Protein handelt, das teilweise granulär in den Dendriten nachweisbar ist.

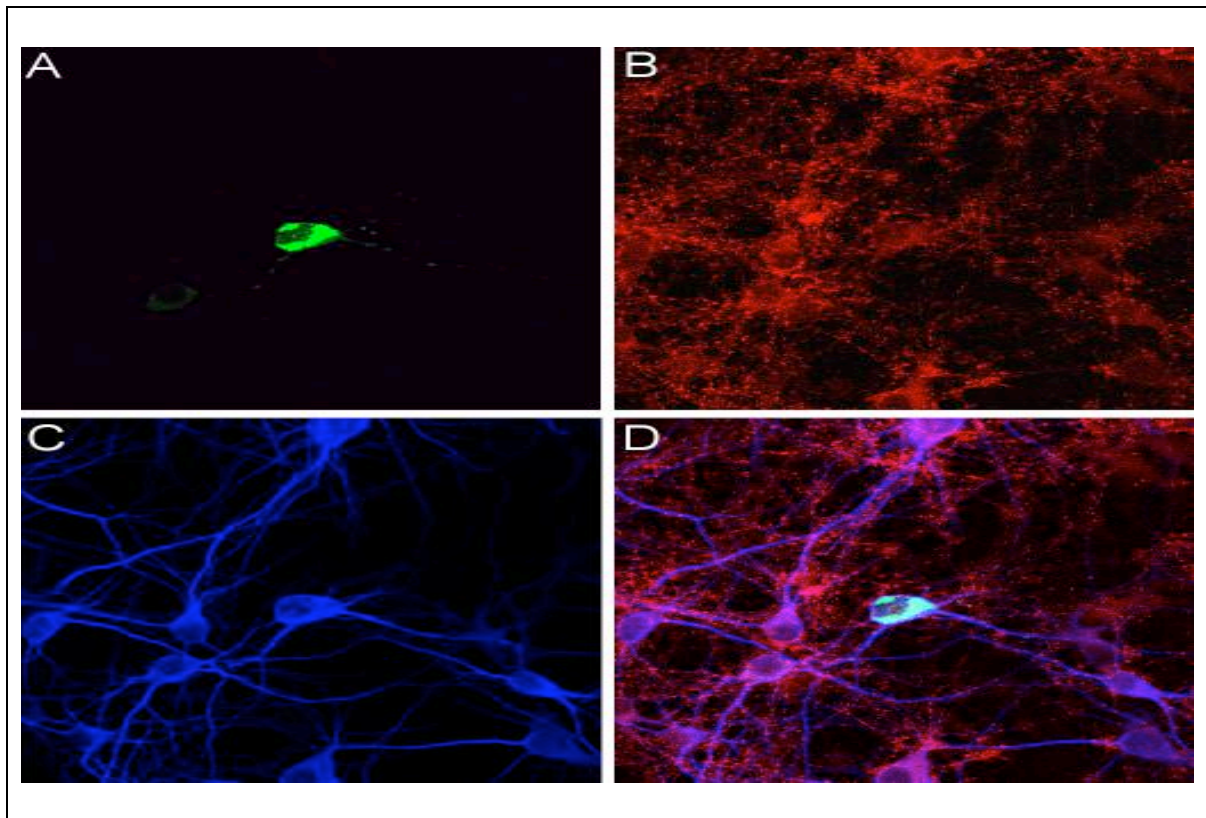


Abb. 3.9: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Atx2-Q22 in primären Hippocampusneuronen der Ratte. Die Primärkulturen von Hippocampusneuronen der Ratte wurden am 8. Tag in Zellkultur transient mit pEGFP-Atx2-Q22 transfiziert, nach 24 h fixiert und immunzytochemisch untersucht. **(A)** Das Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q22 konnte mittels EGFP-Autofluoreszenz nachgewiesen werden. Zur Darstellung der Synapsen wurde der vesikuläre Glutamattransporter mit einem polyklonalen vGLUT-Antikörper (1:10.000) detektiert und mit einem Alexa 546-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt (1:500) **(B)**. Die Dendritenfärbung erfolgte mit einem monoklonalen MAP2-Antikörper (1:1000) gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein-2 und einem Alexa 635-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500) **(C)**. Die Überlagerung der Kanäle zeigt, dass die physiologische Atx-2 Form im Zytoplasma und in Dendriten von Hippocampusneuronen der Ratte nachweisbar ist. Die physiologische Atx-2 Form konnte weder in den Synapsen, noch im Nucleus der Neurone nachgewiesen werden **(D)**.

3.4.2.2 Pathogenes Atx-2 in Hippocampusneuronen der Ratte

Auch die pathogene Atx-2 Form wurde mit der oben beschriebenen immunzytochemischen Färbung untersucht (vgl. 3.4.2). Die Abbildung 3.10 zeigt das untersuchte pathogene Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q79 in drei primären Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*). Das Fusionsprotein ist mittels EGFP-Autofluoreszenz im Zytoplasma und in den Dendriten in granulären Strukturen schwach nachweisbar (Abb. 3.10 A, im grünen Kanal). Die Synapsen sind im roten Kanal gezeigt (Abb. 3.10 B). Die Dendriten sind im blauen Kanal dargestellt (Abb. 3.10 C). In der Überlagerung der Kanäle ist sowohl eine deutliche zytoplasmatische Lokalisation, als auch eine schwach nachweisbare dendritische Lokalisation der pathogenen Atx-2 Form erkennbar.

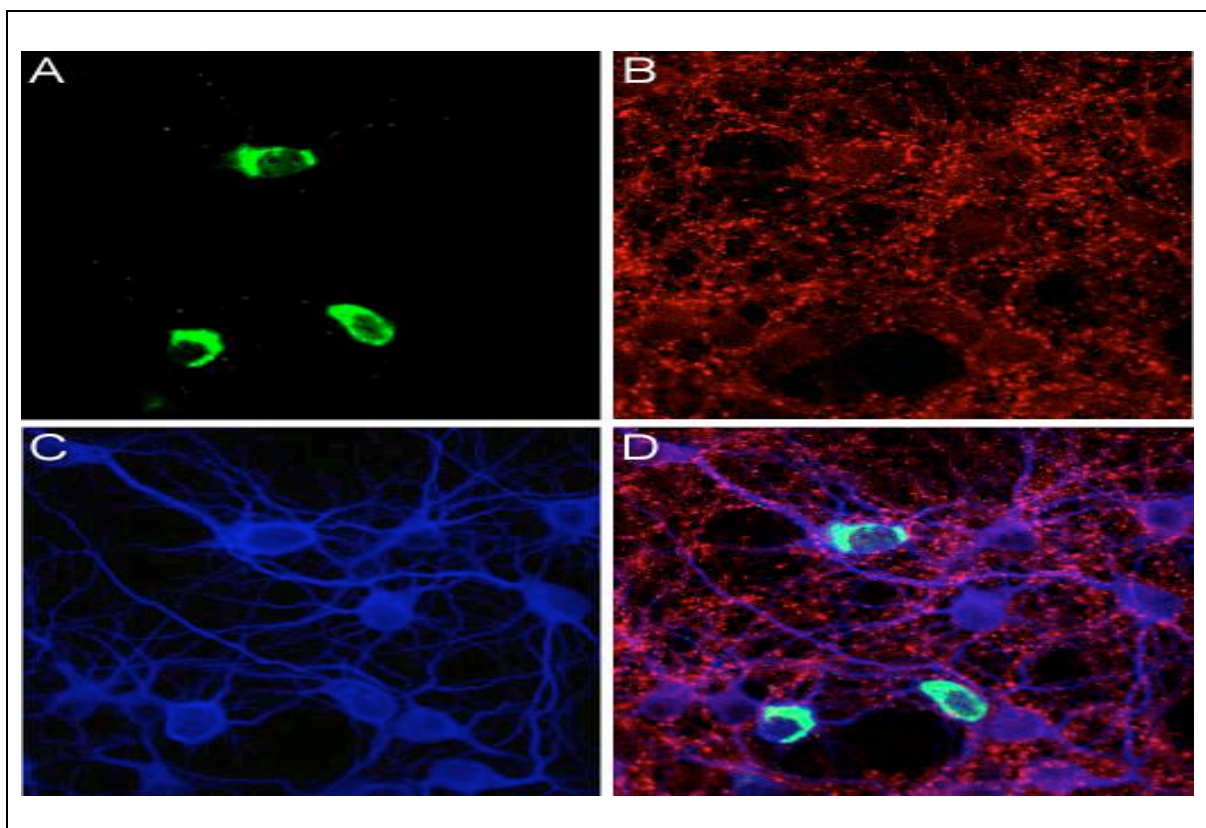


Abb. 3.10: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Atx2-Q79 in primären Hippocampusneuronen der Ratte. Primärkulturen von Hippocampusneuronen der Ratte wurden am 8. Tag in Zellkultur transient mit pEGFP-Atx2-Q79 transfiziert, nach 24h fixiert und immunzytochemisch untersucht (vgl. Abb. 3.6). Dargestellt sind die EGFP-Autofluoreszenz des Fusionsproteins EGFP-Atx2-Q79 (A), die Synapsen (B) und die Dendriten (C). Die Überlagerung der Kanäle zeigt die deutliche zytoplasmatische und schwach nachweisbare dendritische Lokalisation der pathogenen Atx-2 Form (D), ohne Nachweis in den Synapsen oder intranukleär.

In den Dendriten sind schwach nachweisbare granuläre Strukturen erkennbar. Die pathogene Atx-2 Form konnte weder nukleär noch in den Synapsen nachgewiesen werden (Abb. 3.10 D, Überlagerung der Kanäle). Zusammenfassend zeigen diese Versuche (Abb. 3.9 und 3.10), dass sowohl die pathogene als auch die physiologische Atx-2 Form in Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*) gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vorliegen und in den Dendriten schwach nachweisbar sind, aber weder im Nukleus noch in den Synapsen detektiert werden konnten. Demnach sind keine Unterschiede bezüglich der subzellulären Lokalisation der Atx-2 Isoformen in Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*) nachweisbar.

3.5 Veränderung der Dendritenmorphologie durch Atx-2

3.5.1 Effekte der physiologischen Atx-2 Form

Nach transienter Transfektion von primären Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*) mit pEGFP-Atx2-Q22 oder pEGFP-Atx2-Q79 am siebten Tag in Zellkultur kam es regelmäßig vier Tage nach Transfektion zum Verlust der neuronalen Dendriten. Die Neurone wurden daraufhin nach 96 h fixiert und immunzytochemisch untersucht. Das Fusionsprotein pEGFP-Atx2-Q22 wurde mit einem monoklonalen EGFP-Antikörper und dem entsprechenden Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert (Abb. 3.11 A, im grünen Kanal dargestellt). Die Synapsen wurden mit einem Antikörper gegen den vesikulären Glutamattransporter vGLUT und einem Alexa 546-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen (Abb. 3.11 B, im roten Kanal dargestellt). Die Dendriten wurden mit einem MAP2-Antikörper gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 und mit einem Alexa 635-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt (Abb. 3.11 C, im blauen Kanal dargestellt). Nach Transfektion mit dem Vektor pEGFP-Atx2-Q22 war die physiologische Atx-2 Form im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 3.11 A). Die Überlagerung der Kanäle zeigt eine veränderte Morphologie der Dendriten des transfizierten Neurons. Die Überlagerung der Kanäle zeigt, dass die Dendriten des transfizierten, grün dargestellten Neurons, in dem das Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q22 nachweisbar ist, verkümmert sind (Abb. 3.11 D).

Alle Neurone, die nach vier Tagen fixiert und immunzytochemisch untersucht wurden, zeigten verkürzte Dendriten. Die Struktur der Dendriten erschien dann haarförmig und verkürzt.

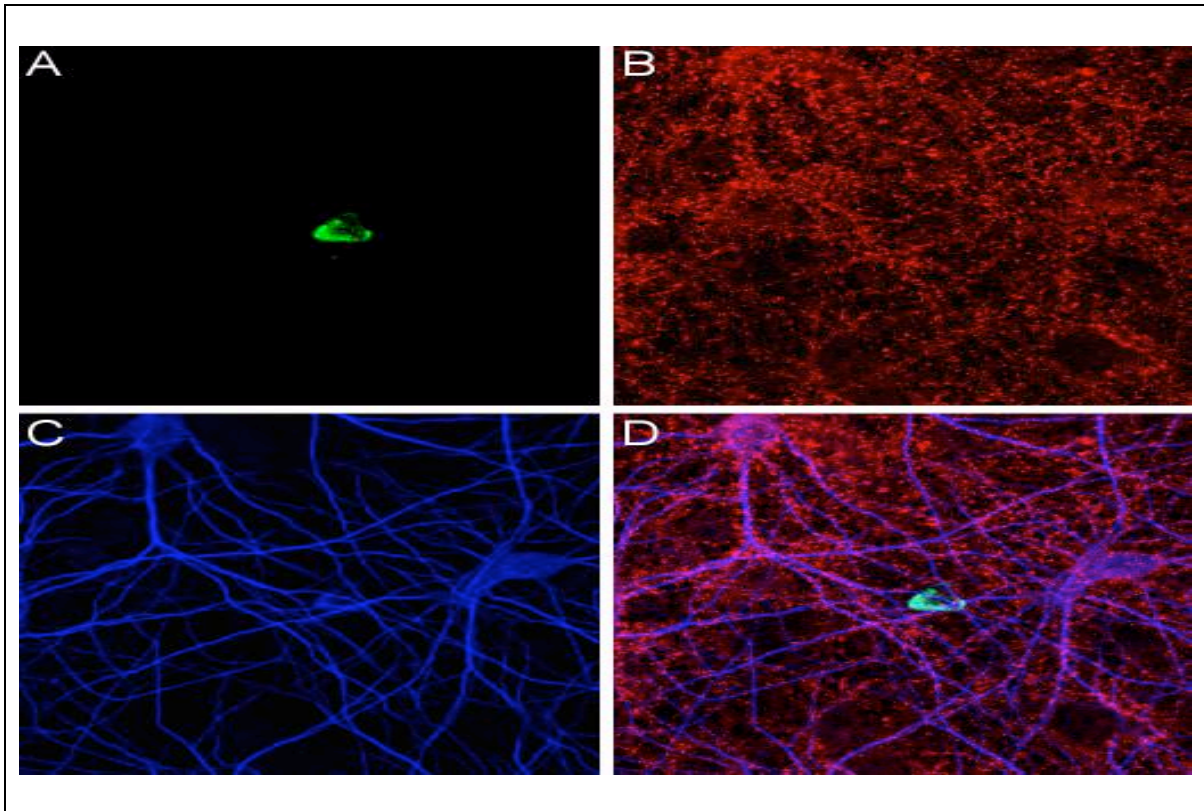


Abb. 3.11: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Atx2-Q22 in primären Hippocampusneuronen der Ratte 4 Tage nach Transfektion. Hippocampusneurone der Ratte wurden an Tag 8 in Zellkultur transient mit pEGFP-Atx2-Q22 transfiziert, nach 96 h fixiert und immunzytochemisch untersucht. Das Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q22 wurde mit einem monoklonalen GFP-Antikörper (1:1000) und dem entsprechenden Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500) detektiert und ist im grünen Kanal zu erkennen (A). Die Synapsenfärbung erfolgte mittels vGLUT-Antikörper (1:10.000) gegen den vesikulären Glutamattransporter und einem Alexa 546-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500) und ist im roten Kanal dargestellt (B). Die Dendriten sind im blauen Kanal dargestellt und wurden mit einem MAP2-Antikörper gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (1:1000) detektiert und mit einem Alexa 635-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500) angefärbt (C). Die Überlagerung der Kanäle zeigt die zytoplasmatische Lokalisation der physiologischen Atx-2 Form in Hippocampusneuronen. Außerdem ist bei transfizierten Neuronen eine veränderte Dendritenmorphologie zu beobachten. Die Dendriten des grün dargestellten Neurons, in dem das Fusionsprotein nachweisbar ist, sind haarförmig und verkürzt (D).

3.5.2 Effekte der pathogenen Atx-2 Form

Nach Transfektion des Vektors pEGFP-Atx2-Q79 wurde die pathogene Atx-2 Form mit einem EGFP-Antikörper und dem entsprechenden Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert (vgl. 3.5.1). Das pathogene Atx-2 Fusionsprotein liegt im Zytoplasma vor (Abb. 3.12 A, im grünen Kanal). Die Synapsen wurden mit einem Antikörper gegen den vesikulären Glutamatransporter vGLUT und einem Alexa 546-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt (Abb. 3.12 B, im roten Kanal).

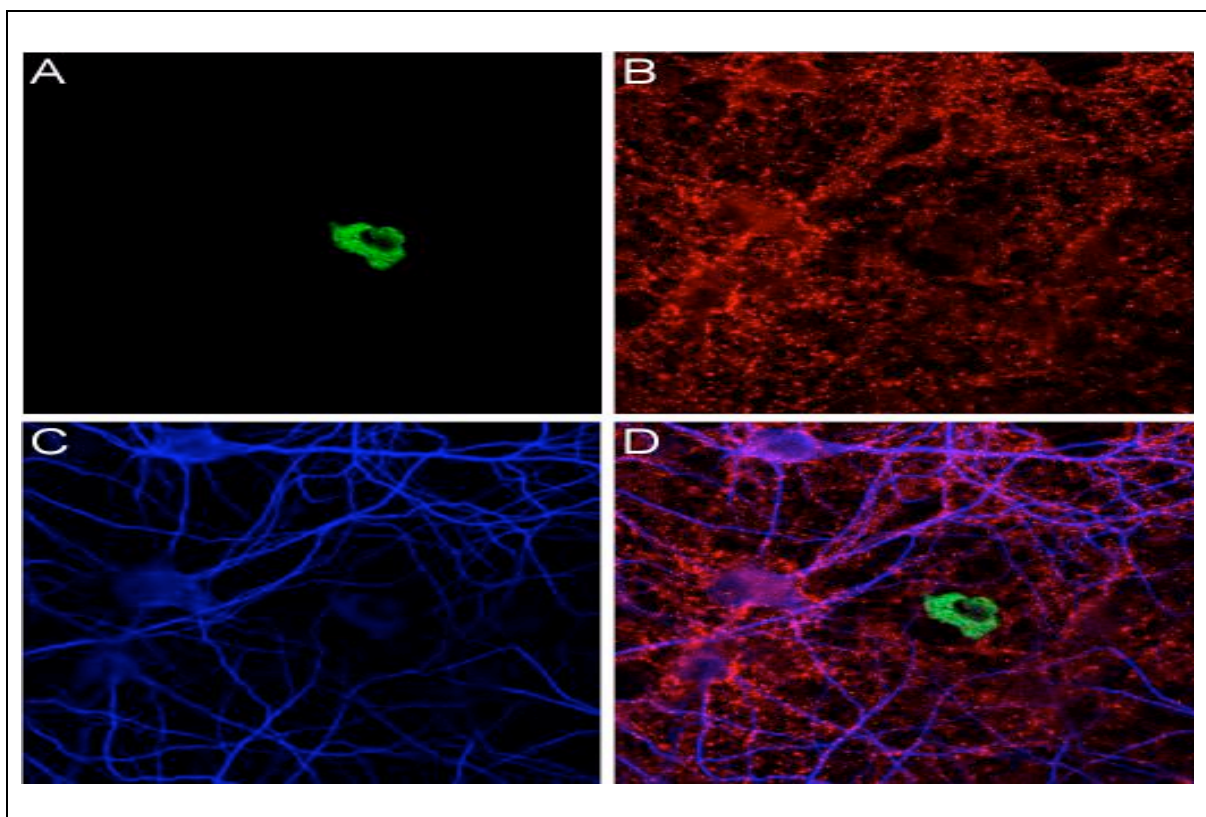


Abb. 3.12: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-Atx2-Q79 in primären Hippocampusneuronen der Ratte 4 Tage nach Transfektion. Hippocampusneurone der Ratte wurden an Tag 8 in Zellkultur transient mit pEGFP-Atx2-Q79 transfiziert, nach 96 h fixiert und immunzytochemisch untersucht (vgl. Abb. 3.11). Das Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q79 ist im grünen Kanal zu erkennen (A). Die Synapsen sind im roten Kanal dargestellt (B). Die Dendriten sind im blauen Kanal zu beobachten (C). Die Überlagerung der Kanäle zeigt die zytoplasmatische Lokalisation der pathogenen Atx-2 Form in Hippocampusneuronen. Das grün dargestellte Neuron, in dem das Fusionsprotein EGFP-Atx2-Q79 nachweisbar ist, weist keine intakten Dendriten mehr auf (D).

Die Dendriten wurden mit einem MAP2-Antikörper gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 und einem Alexa 635-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht (Abb. 3.12 C, im blauen Kanal). In der Überlagerung der Kanäle

zeigt sich zum einen, dass die pathogene Atx-2 Form weder in Synapsen, noch in den Dendriten nachweisbar ist. In der Überlagerung der Kanäle ließ sich eine Verkürzung der Dendriten beobachten (Abb. 3.12 D, Überlagerung der Kanäle). Nach Transfektion mit dem Konstrukt pEGFP-Atx2-Q79 erscheinen die Dendriten fast vollständig zerstört (Abb. 3.12 D). Die Synthese der Fusionsproteine pEGFP-Atx2-Q22 und pEGFP-Atx2-Q79 führte zur morphologischen Veränderung der Dendriten, die gekennzeichnet ist durch Verkürzung und vollständigen Verlust der Dendriten. In ihrer Wirkung auf die Zellmorphologie der Hippocampusneurone lassen sich die pathogene und die physiologische Atx-2 Form nicht unterscheiden. Allerdings scheint der Dendritenverlust bei der pathogenen Atx-2 Form ausgeprägter aufzutreten, als bei der physiologischen Form. Im Vergleich dazu kam es nach Transfektion des Vektors pEGFP-N3 nach vier Tagen zu keinerlei sichtbaren Veränderung der Dendritenstruktur, obwohl das Protein EGFP im Zytoplasma, im Nukleus und in den Dendriten nachweisbar war. Die morphologischen Veränderungen, die durch Atx-2 ausgelöst werden, könnten darauf hinweisen, dass der neuronale Zelltod verfrüht eintritt. Da die Morphologie der Hippocampusneurone unverändert blieb, wenn sie mit pEGFP-N3 transfiziert wurden, ist die Verkürzung der Dendriten wahrscheinlich auf die Wirkung des pathogenen Atx-2 zurückzuführen.

3.6 Analyse der durch Atx-2 vermittelten Apoptose in primären Hippocampusneuronen der Ratte (Apoptose-Assay)

Nach bisherigem Wissensstand ist die SCA2 eine neurodegenerative Erkrankung, bei der mutiertes Atx-2 hauptsächlich in Purkinje-Zellen und Neuronen des Hirnstamms zu Neurodegeneration führt. Dies manifestiert sich klinisch als progressive Ataxie und führt zum Tod der Erkrankten (Huynh et al., 2003). Als Arbeitshypothese des durchgeführten Apoptose-Versuchs gilt die Annahme, dass mutiertes Atx-2 in Neuronen, im Vergleich zu physiologischem Atx-2, Apoptose-induzierend wirkt. Die Atx-2 Isoformen wurden zunächst in einem immunzytochemischen Apoptose-Assay untersucht und miteinander verglichen. Dazu wurden primäre Hippocampusneurone der Ratte (*Rattus norvegicus*) am achten Tag in Zellkultur transient mit den Konstrukten pEGFP-Atx2-Q22, pEGFP-Atx2-Q79 und pEGFP-N3 transfiziert und nach ein, zwei oder drei Tagen mit 4% PFA fixiert. Die EGFP-Atx2 Fusionsproteine wurden in den transfizierten Neuronen durch die EGFP-Autofluoreszenz nachgewiesen (Abb. 3.13 A). In dieser Versuchsreihe wurde zwischen Apoptose und Nekrose differenziert, indem transfizierte Zellen, die anschließend Apoptose einleiteten, immunzytochemisch mit dem Apoptosemarker Anti-ACTIVE[®]-Caspase-3 Antikörper und einem Alexa 546-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt wurden (Abb. 3.13 B). Der Anti-ACTIVE[®]-Caspase-3 Antikörper detektiert die aktivierte Caspase-3, die im Rahmen der Apoptosekaskade der Zelle aktiviert wird. Die Dendriten wurden mit einem Antikörper gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 und einem Alexa 635-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen (Abb. 3.13 C). Die Überlagerung der Kanäle zeigt zwei Apoptose-positive Hippocampusneurone, die am zweiten Tag nach Transfektion mit dem *Anti-ACTIVE[®]-Caspase-3* Antikörper detektiert wurden (Abb. 3.13 D).

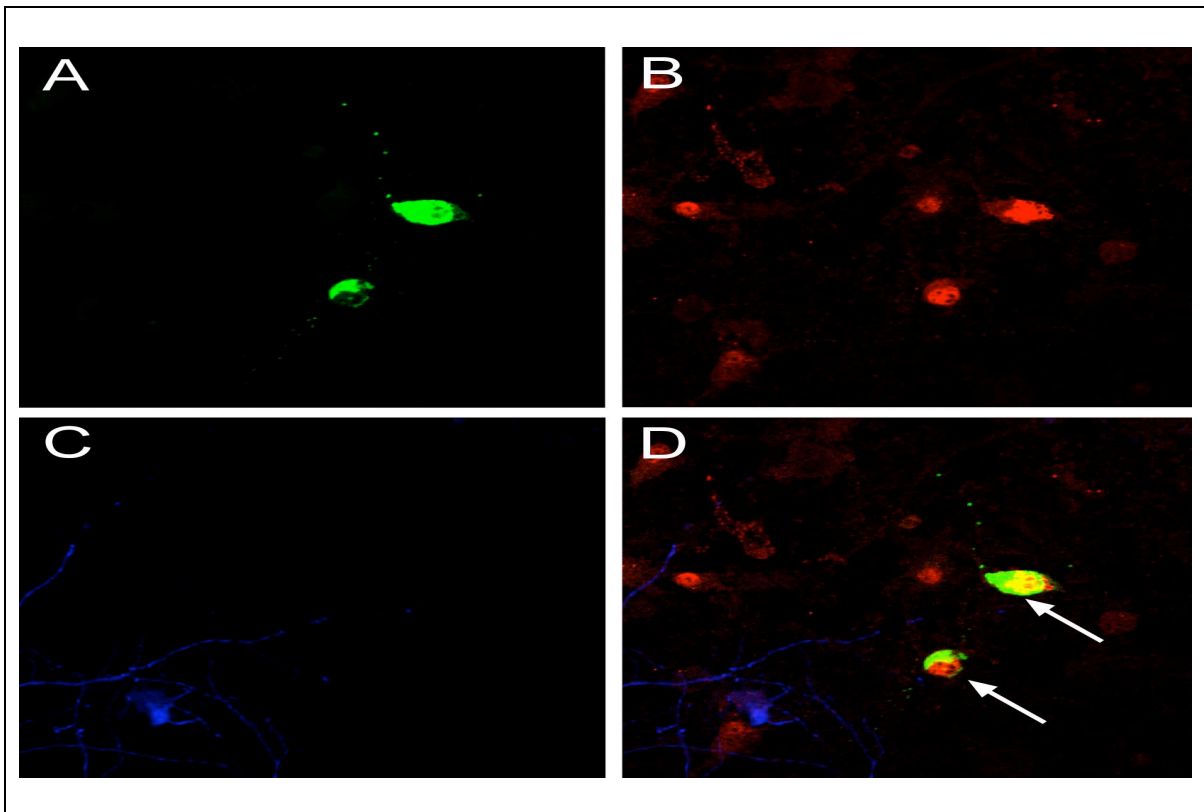


Abb. 3.13: Zwei Apoptose-positive primäre Hippocampusneurone der Ratte an Tag 3 nach Transfektion, die EGFP-Atx2-Q79 synthetisieren. Die Hippocampusneurone wurden nach 8 Tagen in Zellkultur mit pEGFP-Atx2-Q79 transient transfiziert. Diese Neurone wurden am dritten Tag nach Transfektion fixiert und immunzytochemisch untersucht. Dargestellt ist die EGFP-Autofluoreszenz des Fusionsproteins EGFP-Atx2-Q79 nach Transfektion (A). Als Apoptosemarker transfizierter Zellen diente der *Anti-ACTIVE[®]-Caspase-3* Antikörper (1:250) und ein Alexa 546-gekoppelter Sekundärantikörper (1:500) (B). Die Dendriten wurden mit einem Antikörper gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (1:1000) und einem Alexa 635-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500) nachgewiesen. Sie sind bei transfizierten Neuronen vollständig verkümmert (C). Die Überlagerung der Kanäle zeigt zwei transfizierte, Apoptose-positive Neurone (s. Pfeile), die an Tag 3 nach Transfektion mit dem *Anti-ACTIVE[®]-Caspase-3* Antikörper detektiert wurden (D).

Es konnte gezeigt werden, dass ab dem zweiten Tag nach Transfektion von pEGFP-Atx2-Q79 Apoptose-positive Neurone nachweisbar sind. Dies scheint die Arbeitshypothese zunächst zu bestätigen. Interessanterweise konnten Apoptose-positive Neurone aber auch am zweiten Tag nach Transfektion von pEGFP-Atx2-Q22 detektiert werden (Abb. 3.14 D), was in Widerspruch zur Arbeitshypothese steht. Nach Transfektion von pEGFP-N3 erschienen die Neurone dagegen intakt in Bezug auf Zellsoma, Dendritenmorphologie und Synapsen. Dies weist darauf hin, dass EGFP nicht Apoptose-induzierend wirkt und die beschriebene Apoptose induzierende Wirkung allein durch das Protein Atx-2 verursacht wäre.

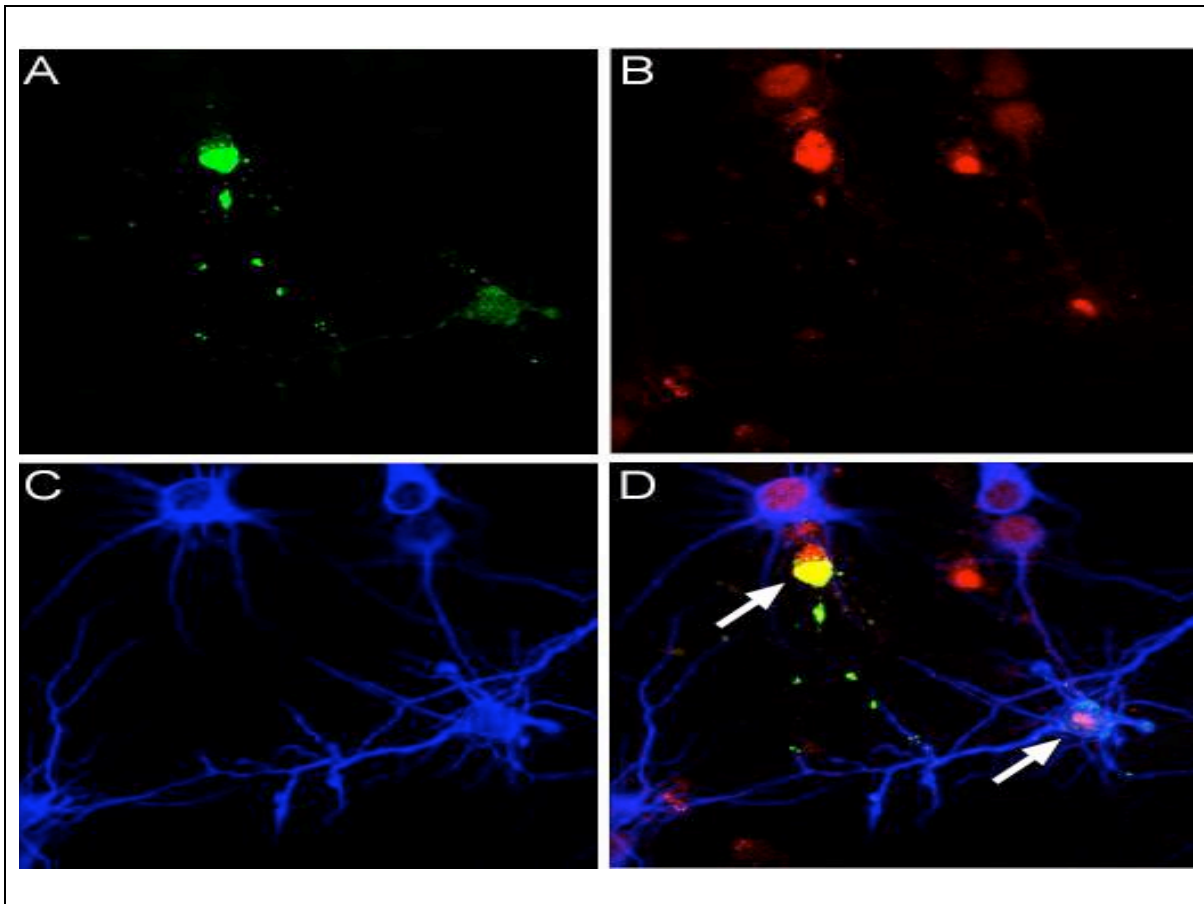


Abb. 3.14: Zwei Apoptose-positive primäre Hippocampusneurone der Ratte an Tag 2 nach Transfektion, die EGFP-Atx2-Q22 synthetisieren. Die Hippocampusneurone wurden nach 8 Tagen in Zellkultur mit pEGFP-Atx2-Q22 transient transfiziert. Diese Neurone wurden am zweiten Tag nach Transfektion mit 4% PFA fixiert und immunzytochemisch untersucht. Dargestellt ist die EGFP-Autofluoreszenz des Fusionsproteins EGFP-Atx2-Q22 nach Transfektion (**A**). Als Apoptosemarker transfizierter Zellen diente der Anti-ACTIVE®-Caspase-3 Antikörper (1:250) und ein Alexa 546-gekoppelter Sekundärantikörper (1:500) (**B**). Die Dendriten wurden mit einem Antikörper gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (1:1000) und einem Alexa 635-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500) nachgewiesen (**C**). Die Überlagerung der Kanäle zeigt zwei transfizierte, Apoptose-positive Neurone (siehe weiße Pfeile), die an Tag 2 nach Transfektion mit dem Anti-ACTIVE®-Caspase-3 Antikörper detektiert wurden (**D**).

In diesem Versuch wurden die physiologische Atx-2 Form, die pathogene Atx-2 Form und das Protein EGFP-N3 im Vergleich untersucht. Die Fragestellung war zum einen, ob EGFP-N3 eine Apoptose-induzierende Wirkung im Vergleich zu den Atx-2 Isoformen hat. Zum anderen wurde vermutet, dass die pathogene Atx-2 Form, verglichen mit der physiologischen Form, Apoptose-induzierende Wirkung zeigen müsste. Allerdings sind auch nach Synthese der physiologischen Atx-2 Form Apoptose-positive Hippocampusneurone nachweisbar gewesen (s. Abb. 3.14 D). Deswegen erfolgte eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen (3.6.1).

3.6.1 Quantitative Analyse des Apoptose-Assays

Insgesamt wurden drei Apoptoseversuche an Hippocampusneuronen durchgeführt. In jedem Versuch wurden Neurone nach acht Tagen in Zellkultur transient mit pEGFP-N3, pEGFP-Atx2-Q22 und pEGFP-Atx2-Q79 transfiziert. Die Neurone wurden am ersten, zweiten oder dritten Tag nach Transfektion mit 4% PFA fixiert und immunzytochemisch untersucht (vgl. 3.6). In der Versuchsreihe wurde jedes untersuchte Fusionsprotein in drei Versuchsreihen, an drei aufeinanderfolgenden Tagen immunzytochemisch untersucht (vgl. Abb. 3.13 und 3.14). Die untersuchten Fusionsproteine sind EGFP-N3, EGFP-Atx2-Q22 und EGFP-Atx2-Q79.

Das Ziel war zu erfassen, wie viele Neurone sich pro Tag in Apoptose befinden und ob dies vom transfizierten Konstrukt abhängig ist. Daher wurden pro Versuchstag und untersuchtem Fusionsprotein aus je 100 transfizierten Hippocampusneuronen die transfizierten, Apoptose-positiven Neurone unter dem Mikroskop ausgezählt. Es wurden ausschließlich transfizierte Neurone, die durch den Anti-ACTIVE[®]-Caspase-3 Antikörper markiert waren, als Apoptose-positiv gewertet. Daraus ergab sich für jedes Fusionsprotein ein Tagesergebnis für Tag 1, Tag 2 und Tag 3. Zur graphischen Darstellung wurde mit dem Programm Excel[®] (Version 11.0) für jedes der drei untersuchten Fusionsproteine der Mittelwert für die Apoptose-positiven Neurone aus jedem Tagesergebnis der drei Versuchsreihen berechnet. Der Mittelwert der Apoptose-positiven Neurone ist pro Tag und Fusionsprotein im Diagramm veranschaulicht. Der Mittelwert stellt die Relation zwischen den pro Tag ausgewählten 100 Neuronen der Stichprobe und den darin gezählten Apoptose-positiven Neuronen dar. Pro Protein und Tag wurde von diesen Stichproben die Standardabweichung berechnet, die im Diagramm als Fehlerbalken dargestellt ist.

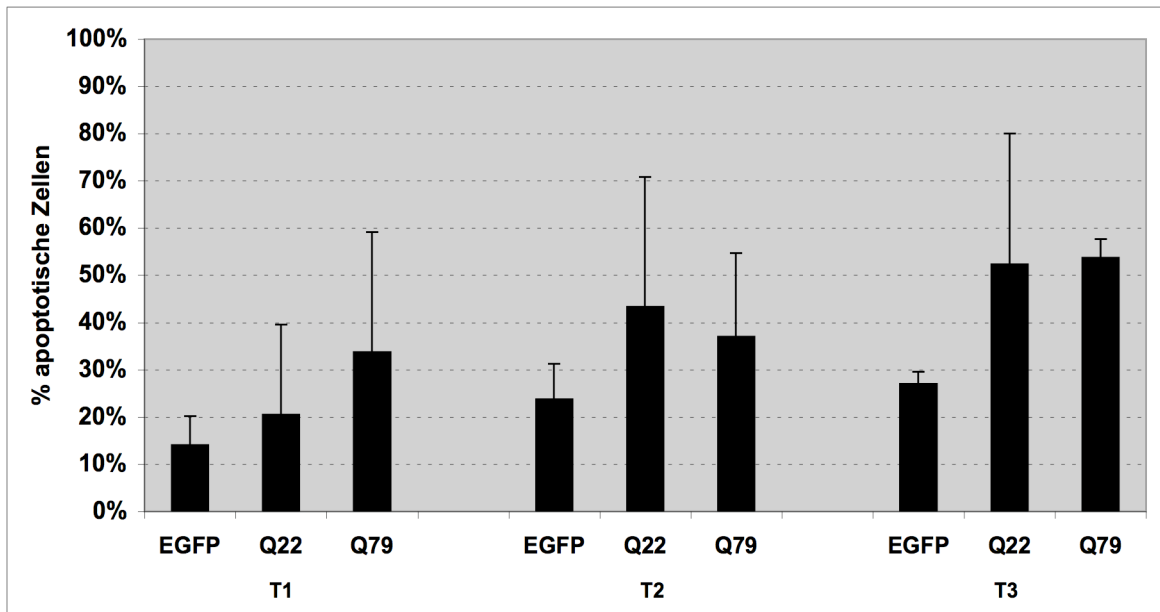


Abb. 3.15: Quantitative Auswertung des Apoptose-Assays. Auf der Abszisse sind die apoptotischen Zellen in Prozent angegeben. Auf der Ordinate sind zum einen die Versuchstage Tag 1 (T1), Tag 2 (T2) und Tag 3 (T3) dargestellt. Zum anderen sind die untersuchten Proteine aufgelistet, die von den Hippocampusneuronen nach transients Transfektion synthetisiert wurden. Es sind die Proteine EGFP-N3 (EGFP), physiologisches Atx-2 (Q22) und pathogenes Atx-2 (Q79). In den drei durchgeführten Versuchen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen pro Tag und Protein aus 100 Zellen die Apoptose-positiven Zellen ausgezählt. Zur Darstellung wurde pro synthetisiertem Protein der Mittelwert für die Apoptose-positiven Zellen der drei Versuche berechnet. Dieser ist pro Tag und Protein durch schwarze Balken veranschaulicht und stellt die Relation zu den pro Tag ausgezählten 100 Zellen der Stichprobe dar. Von diesen Stichproben wurde pro Protein und Tag die Standardabweichung berechnet. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken über den schwarzen Balken dargestellt.

Wie in Zellkultur beobachtet, zeigten die mit pEGFP-Atx2-Q22 und pEGFP-Atx2-Q79 transfizierten Hippocampusneurone in den ersten drei Tagen nach Transfektion in Zellkultur ein progredient fortschreitendes Neuronensterben, das sich sowohl für die physiologische als auch für die pathogene Atx-2 Form nachweisen ließ. Nach der quantitativen Analyse der Apoptose-positiven Neurone ist ein Überwiegen der Apoptoseaktivität in Hippocampusneuronen festzustellen, die das pathogene Atx-2 mit der mutativ veränderten Polyglutaminregion synthetisieren. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Nach Synthese von EGFP-N3 sind im Mittel 14% der Neurone an Tag 1 und 27% an Tag 3 vom Zelluntergang betroffen (in Abb. 3.15 als EGFP bezeichnet). Dies zeigt möglicherweise die normale Rate des Zelluntergangs für Hippocampusneurone in Zellkultur an. Die Zelluntergangsrate steigt nach Synthese der physiologischen Atx-2 Form von 20,5% an Tag 1 auf 52,3% an Tag 3 an (in Abb. 3.15 als Q22 bezeichnet). Nach Synthese der pathogenen Atx-2 Form sind an Tag 1 bereits

33,7% der Neurone vom Zelltod betroffen und an Tag 3 bereits 53,7% der Neurone (in Abb. 3.15 als Q79 bezeichnet). Verglichen mit der physiologischen Atx-2 Form konnte gezeigt werden, dass sich für pathogenes Atx-2 an Tag 3 im Mittel 1,4% mehr Apoptose-positive Zellen nachweisen lassen. Dies zeigt möglicherweise die höhere Toxizität der pathogenen Atx-2 Form, im Vergleich zu physiologischem Atx-2 an.

3.7 Identifizierung putativer Atx-2 Interaktionspartner

3.7.1 Affinitätschromatographie

Als neues Verfahren zur Identifikation putativer Interaktionspartner des humanen Atx-2 wurde die sogenannte Affinitätschromatographie eingesetzt. Sie beruht auf der Interaktion der Proteine Shank 1 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1) und GKAP/SAPAP1 (SAP90/PSD-95-associated protein 1). Dabei interagiert der C-Terminus von GKAP/SAPAP1 selektiv mit der PDZ-Domäne von Shank 1 (Brendel et al., 2004; Sheng et al., 2000). Das Protein GKAP (Guanylat Kinase-assoziiertes Protein) kommt in der postsynaptischen Dichte (PSD) von Neuronen vor (Kim et al., 1997).

Bei dieser Methode der Affinitätsreinigung von Proteinen nach Brendel et al. wird ein synthetisches PDZ-bindendes Peptid eingesetzt, das kovalent an NHS-Sepharose gekoppelt wird. Die Sepharose wird danach als GKAP-Sepharose bezeichnet. Das PDZ-bindende Peptid besteht aus der Aminosäuresequenz IYIPEAQTRL (Acc: U67987), die den letzten zehn Aminosäuren des Proteins GKAP der Ratte entspricht. Zur Aufreinigung eines Proteins muss ein mit der PDZ-Domäne von Shank 1 fusioniertes, rekombinantes Protein in eukaryotischen Zellen synthetisiert werden, wie zum Beispiel das Fusionsprotein Atx2-Q22-PDZ (s. Abb. 3.16). In dieser Arbeit werden für diesen Versuch die Expressionsvektoren pAtx2-Q22-PDZ und pAtx2-Q79-PDZ genutzt, die eine PDZ-Domäne von Shank 1 als Bindungsdomäne für das PDZ-bindende Peptid kodieren. HEK-293-Zellen werden mit den genannten Konstrukten nach der Calcium-Phosphatmethode transfiziert. Nach 24 h wird durch Zelllyse der transfizierten Zellen mit 1x RIPA-Puffer ein Proteinextrakt hergestellt. Das Extrakt wird mit GKAP-Sepharose inkubiert. Dabei bindet die PDZ-Domäne des Fusionsproteins an das PDZ-bindende-Peptid der GKAP-Sepharose. Die

Proteinkomplexe aus rekombinanten Atx2-Q22-PDZ bzw. Atx2-Q79-PDZ Fusionsproteinen und gebundenen putativen Interaktionsproteinen, die nun an GKAP-Sepharose gebunden vorliegen, werden mit SDS eluiert, gewaschen und mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Die Proteinbanden werden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Dabei werden Proteinbanden von Atx2-Q22-PDZ und Atx2-Q79-PDZ sowie Proteinbanden des Gesamtzelllysates untransfizierter HEK-293-Zellen analysiert.

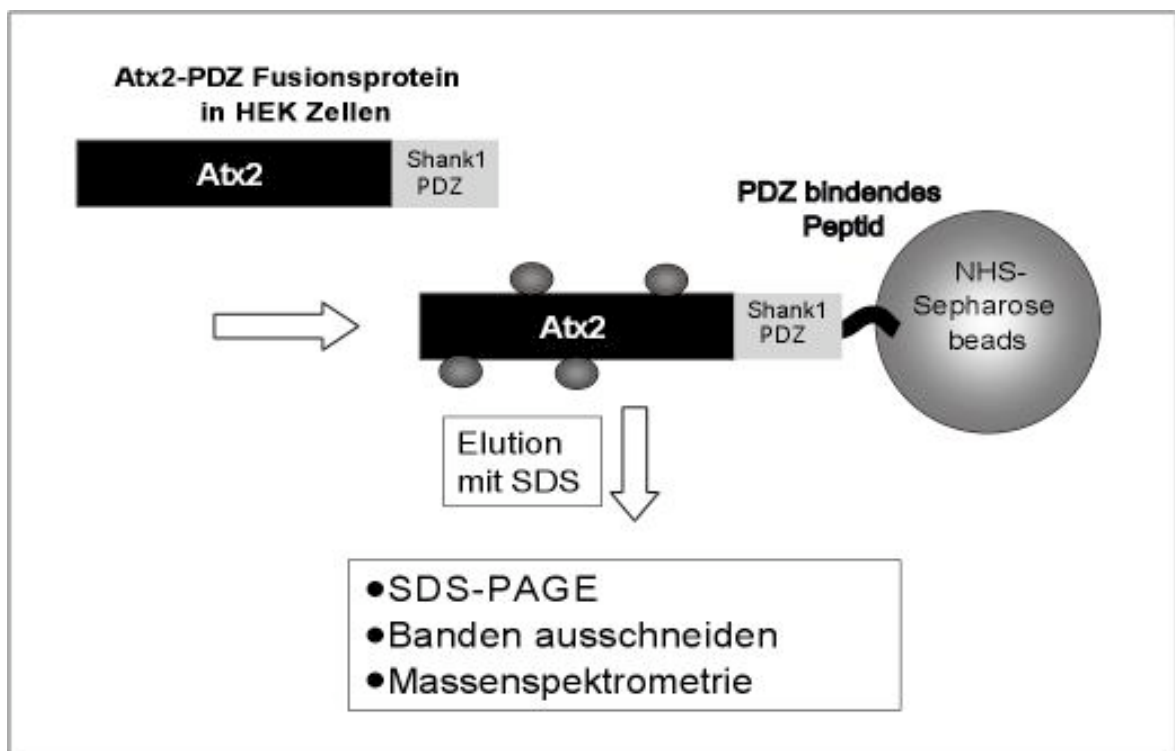


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Affinitätschromatographie. Das Zielprotein Atx2-Q79-PDZ wurde von transient transfizierten HEK-293-Zellen synthetisiert und nach 24 h mit GKAP-Sepharose präzipitiert. Dabei werden Proteinkomplexe aus Atx2-Q79-PDZ-Fusionsprotein (schwarz-grauer Balken) und gebundenen putativen Interaktionsproteinen (graue Ellipsen), die an GKAP-Sepharose gekoppelt vorliegen aufgereinigt. GKAP-Sepharose besteht aus einem PDZ-bindenden Peptid (~), das kovalent an NHS-Sepharose (grauer Kreis) gekoppelt wird. Die Proteinkomplexe wurden mit SDS von der GKAP-Sepharose eluiert und ihrer Größe nach mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinbanden mit Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

3.7.2 Ergebnisse der Affinitätschromatographie

Das Ergebnis der Affinitätschromatographie der pathogenen Atx-2 Form ist in Abbildung 3.17 gezeigt. Das Fusionsprotein Atx2-Q79-PDZ wurde in der 250 kDa Bande nachgewiesen. Als Interaktionsproteine von Atx2-Q79-PDZ wurden zum einen in der 90 kDa Bande das DEAD-Box Protein DDX1 (Q92499) und in der 75 kDa Bande das DEAD-Box Protein DDX21 (Q9NR30) identifiziert. Zum anderen wurden die Poly(A)-Bindungsproteine PABP-1 (Q15097), PABP-3 (Q9H361) und PABP-4 (Q13310) in der 70 kDa Bande nachgewiesen. Darüber hinaus wurden in der 60 kDa Bande Sorting-Nexin-27 (Q96L92/Q5VWB0) und das Protein Fam-98A detektiert (Q8NCA5).

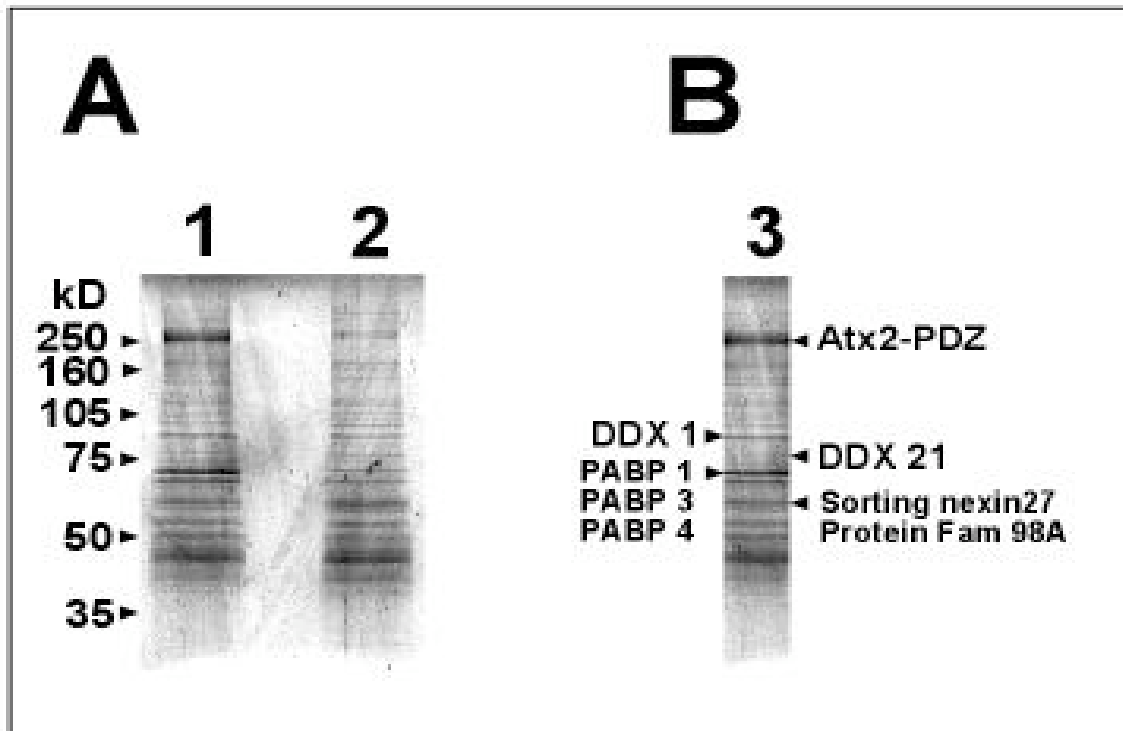


Abb. 3.17: Proteingel nach Affinitätschromatographie und SDS-PAGE. **A:** Dargestellt ist ein Proteingel nach SDS-PAGE mit Coomassie-gefärbten Proteinbanden. Oben links ist der Größenstandard in Kilodalton durch schwarze Pfeile angegeben. **1:** Proteinbanden der Interaktionsproteine der pathogenen Atx-2 Form. **2:** Zellysate untransfizierter HEK-293-Zellen als Kontrolle. **B:** Vergrößerte Darstellung des Proteingels der pathogenen Atx-2 Form. **3:** Die schwarzen Pfeile zeigen die Proteinbanden der pathogenen Atx-2 Form und die der Interaktionsproteine an. Die massenspektrometrische Analyse der Proteinbanden ergab als Interaktionsproteine der pathogenen Atx-2 Form die *DEAD-Box* Proteine DDX1 und DDX21, die Poly(A)-Bindungsproteine PABP-1, -3 und -4, sowie *Sorting-Nexin-27* und Protein *Fam-98A*.

DEAD-Box Proteine sind RNA-Helikasen, die über eine RNA-abhängige ATPase-Aktivität verfügen und eine Rolle in der Umformung von RNP (ribonukleoprotein particle) spielen, was als *Remodeling* bezeichnet wird. Die Poly-(A)-Bindungsproteine (PABP) spielen eine Rolle in der Regulation der mRNA Translation und Stabilisation. Sorting-Nexin-27 ist ein physiologisch in HEK-293-Zellen vorkommendes Diacylglycerolkinase ζ -assoziiertes Protein. Es kolokalisiert mit Transferrin-Rezeptor-positiven Vesikeln (Rincón et al., 2007). Es trägt eine PDZ-Domäne, über die es an GKAP-Sepharose binden konnte und ist deshalb aus dem Gesamtzelllysat extrahiert worden. Es ist kein Interaktionspartner der pathogenen Atx-2 Form. Somit ist dieses Ergebnis als falsch positiv zu bewerten. Das Protein FAM-98A (Q8NCA5) ist das erste Proteinmitglied der Proteinfamilie mit Sequenzhomologie 98. Es interagiert selektiv mit Phosphopantetheinen. Das kodierende Gen liegt auf Chromosom 2p22.3.

3.8 Lokalisation von rekombinantem DEAD-Box Protein 6 (DDx6) in Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*)

Die in dieser Arbeit durchgeführte Affinitätschromatographie ergab, dass pathogenes Atx-2 mit DEAD-Box Proteinen interagieren kann. Daher wurde die subzelluläre Verteilung des DEAD-Box Proteins DDx6 in Hippocampusneuronen untersucht. DEAD-Box Proteine sind spezifische Regulationsproteine im RNA-Metabolismus, die RNA-abhängige ATPase-Aktivität und ATP-abhängige RNA-Helikase Aktivität zeigen (Linder P, 2006). Es wird allgemein angenommen, dass DDx6 am mRNA-Abbau beteiligt ist (Coller et al., 2001). Das Protein DDx6 wurde bereits in dynamischen zellulären Strukturen nachgewiesen, in denen das mRNA-Decapping und der mRNA-Abbau stattfindet, den sogenannten P-bodies (Nonhoff et al., 2007).

Die Fragestellung dieses Versuches war, ob die subzelluläre Verteilung von DDx6 ähnlich der von Atx-2 ist. Dies könnte Rückschlüsse auf die Funktion von Atx-2 zulassen. Über die Interaktion mit DEAD-Box Proteinen könnte Atx-2 den mRNA-Metabolismus beeinflussen, was neue Erkenntnisse zur Pathogenese der SCA2 liefern könnte. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurden pTL-Flag-DDx6 Vektoren (Nonhoff et al., 2007) genutzt. Die primären Hippocampusneurone der Ratte, wurden an Tag 7 in Zellkultur transient mit pTL-Flag-DDx6 transfiziert und 48 h nach Transfektion mit 4% PFA fixiert. Immunzytochemisch wurde das

rekombinante DDx6 mit einem monoklonalen Anti-Flag-Antikörper detektiert und mit dem entsprechenden Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt (Abb. 3.18 A, im grünen Kanal sichtbar). Die Dendriten wurden mit einem polyklonalen MAP2-Antikörper gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 detektiert und mit einem Alexa 633-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt (Abb. 3.18 B, im blauen Kanal sichtbar). Die Überlagerung der Kanäle zeigt, dass das Fusionsprotein DDx6-Flag in Hippocampusneuronen in zytoplasmatischen Granula vorliegt, die nur vereinzelt in den Dendriten nachweisbar sind (Abb. 3.18 C und D, Überlagerung der Kanäle). Bei den zytoplasmatischen Granula könnte es sich um die beschriebenen P-bodies handeln.

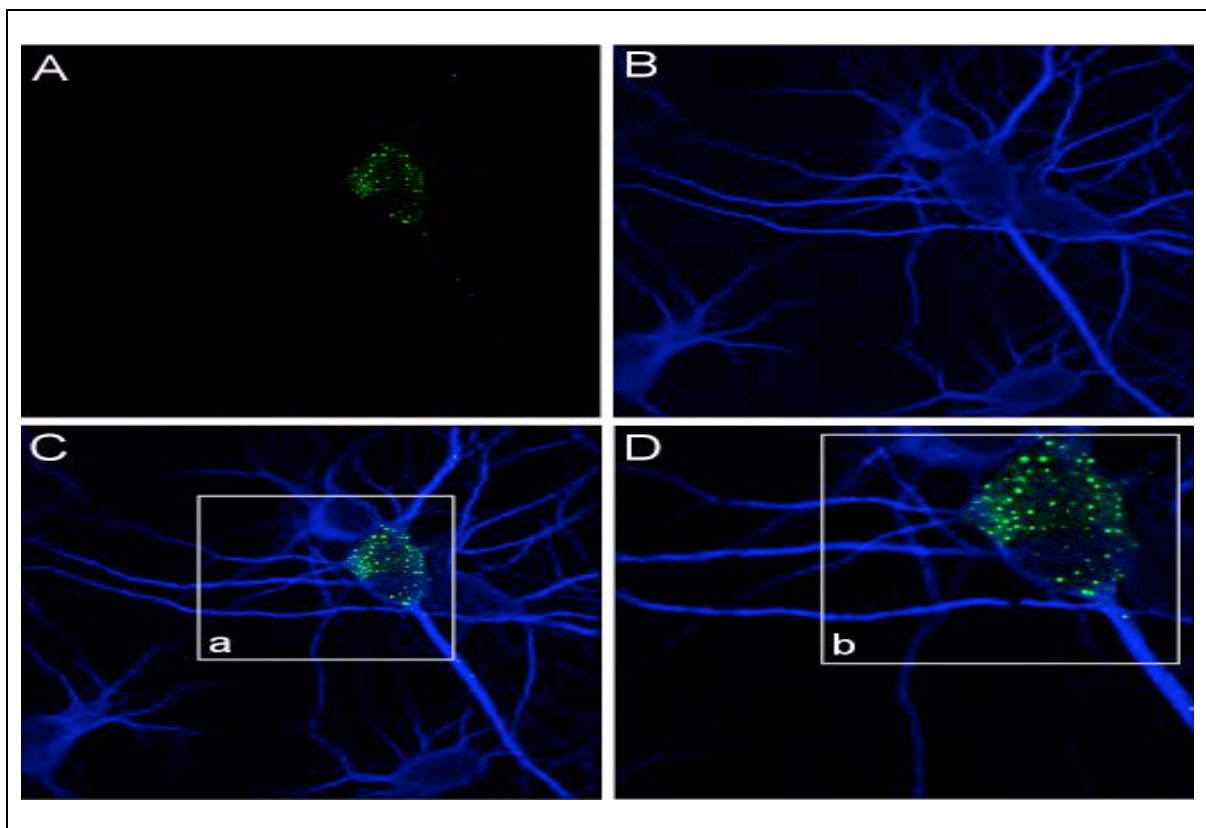


Abb. 3.18: Lokalisation von rekombinantem DDx6 in Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*). Die Hippocampusneurone wurden an Tag 7 transient mit pTL-Flag-DDx6 transfiziert, nach 48 h fixiert und immunzytochemisch untersucht. **A:** DDx6 Färbung mit einem monoklonalen Anti-FLAG-Antikörper (1:2000) und einem Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500). **B:** Die Dendritenfärbung erfolgte mit einem polyklonalen MAP2b-Antikörper (1:1000) gegen das Mikrotubulus-assoziierte Protein-2 und einem Alexa-633-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500). **C:** Die Überlagerung des grünen und blauen Kanals zeigt die Lokalisation von DDx6 im Soma der Neuronen **a:** Ausgewählter Bereich eines Hippocampusneurons **D:** Vergrößerung **b:** Rekombinantes DDx6 ist in primären Hippocampusneuronen in zytoplasmatischen Granula und vereinzelt in Dendriten lokalisiert.

4 Diskussion

Das gemeinsame Merkmal der autosomal-dominant vererbten spinocerebellären Ataxien (SCAs) ist die Neurodegeneration des Kleinhirns mit seinen Efferenzen und Afferenzen. Für die SCA-Familie sind verschiedene Pathogenese-Modelle beschrieben (Dueñas et al., 2006). Genetische Ursache der in dieser Arbeit untersuchten SCA2 ist die mutative Verlängerung einer CAG-Trinukleotidsequenz im Exon-1 des ATXN2-Gens. Die Mutation erzeugt ab einer bestimmten Sequenzlänge von mehr als 32 CAG-Triplets einen dominanten Phänotyp mit progredienter cerebellärer Ataxie. Infolge der Instabilität expandierter Allele kommt es in der Folgegeneration zur Verlängerung der CAG-Sequenz (Manto et al., 2005). Je länger die CAG-reiche Sequenz ist, desto früher und schwerwiegender setzt die Krankheit in der Folgegeneration ein, was als Antizipation bezeichnet wird. Ein CAG-Trinukleotid kodiert die Aminosäure Glutamin und wird durch Transkription des ATXN2-Gens und Translation der Atx-2-mRNA während der Proteinbiosynthese in eine N-terminale Polyglutamin-domäne des Proteins Atx-2 übersetzt. Die SCA2 ist eine Polyglutaminexpansions-Erkrankung, da im Vergleich zur physiologischen Atx-2 Form eine verlängerte Polyglutaminregion des pathogenen Atx-2 Proteins bei SCA2-Patienten zu beobachten ist. Allgemein wird angenommen, dass das mutativ veränderte ATXN2-Gen an Aktivität gewinnt und das krankheits-assoziierte Protein Atx-2 durch neue oder verstärkte Aktivität in der Zelle gekennzeichnet ist (gain of function).

Über die physiologische Funktion von humanem Atx-2 ist bisher wenig bekannt. Humanes Atx-2 ist vermutlich Teil von Polyribosomen, die während der Translation gebildet werden (Satterfield et al., 2006). Es wird allgemein angenommen, dass Atx-2 eine Funktion im RNA-Metabolismus hat (Shibata et al., 2000; Ralser et al., 2005a; Satterfield et al., 2006).

Außerdem sind bereits einige Interaktionsproteine von Atx-2 bekannt, wie das Ataxin-2 Bindeprotein 1 (A2BP1). Es kommt, wie Atx-2, in Purkinje-Zellen und Neuronen des Nucleus dentatus im ZNS vor, bindet an den C-Terminus von Atx-2 und kolokalisiert mit Atx-2 im Endoplasmatischen Retikulum, trans-Golgi-Netzwerk und Zytoplasma. Es wird angenommen, dass der humane A2BP1/Atx-2-Komplex an der RNA-Prozessierung beteiligt ist (Shibata et al., 2000). Versuche an

Caenorhabditis elegans zeigten, dass das A2BP1-Homolog FOX-1 das alternative Spleißen reguliert (Jin et al., 2003; Nakahata et al., 2005). Andere Versuche zeigen, dass Atx-2 in der Keimbahn des Fadenwurms Caenorhabditis elegans an der Translationsregulation und Proliferation beteiligt ist (Ciosk et al., 2004; Maine et al., 2004).

Durch Versuche in der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae ist bekannt, dass Atx-2 am RNA-Export und der posttranskriptionalen Reifung der mRNA beteiligt ist. Außerdem interagiert Atx-2 mit Endophilin-A1 und Endophilin-A3 (Ralser et al., 2005b). Es wird allgemein angenommen, dass Endophilin an der Endozytose von Vesikeln in Synapsen beteiligt ist (Mizuno et al., 2010).

Andere Versuche haben gezeigt, dass das Drosophila melanogaster Atx-2 Homolog ein Regulator der Aktinfilamentformation des Zytoskeletts ist (Satterfield et al., 2002). Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass Atx-2 mit Komponenten des Zytoskeletts wie α -Actinin-1, α -Actinin-2 und Secretogranin-1 interagiert und an verschiedenen Transportprozessen beteiligt ist (Lim et al., 2006).

Die physiologische und pathologische Wirkung von humanem Atx-2 im Organismus ist bisher unklar. In dieser Arbeit sollte daher die subzelluläre Lokalisation von Atx-2 untersucht und putative Atx-2-Interaktionsproteine identifiziert werden. Mittels humaner Ataxin-2 cDNA wurden zunächst eukaryotische Expressionsvektoren für unsere AG Kindler hergestellt. Die Vektoren pEGFP-Atx2-Q22 und pEGFP-Atx2-Q79 dienen zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Atx-2 in primären Hippocampusneuronen der Ratte (Rattus norvegicus) und CHO-K1-Zellen. Um die Wirkung der pathogenen Atx-2 Form zu charakterisieren wurde außerdem ein immunzytochemischer Apoptose-Assay durchgeführt. Zur Identifikation putativer Atx-2-Interaktionspartner wurden die pAtx2-Q22-PDZ und pAtx2-Q79-PDZ Vektoren genutzt und eine neue biochemische Methode eingesetzt: die Affinitätschromatographie nach Brendel et al., 2004.

In den Versuchen zur Lokalisation von Atx-2 in CHO-K1-Zellen und Hippocampusneuronen der Ratte (Rattus norvegicus) wurde untersucht, ob die Länge der Polyglutaminregion die subzelluläre Verteilung von Atx-2 beeinflusst. Es zeigte sich, dass sowohl EGFP-Atx2-Q22 als auch EGFP-Atx2-Q79 in CHO-K1-

Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 3.8 F: physiologisches Atx-2; Abb. 3.8 I: pathogenes Atx-2). Die Länge der Polyglutaminregion scheint also keinen Einfluss auf die Lokalisation von Atx-2 zu haben. Das zur Kontrolle transfizierte Konstrukt pEGFP-N3 war im Zytoplasma und intranukleär nachweisbar (Abb. 3.8 C). Diese Ergebnisse bestätigen ähnliche Versuche mit EGFP-markiertem Atx-2 in COS-1-Zellen, in denen sowohl das mutierte und als auch das physiologische Atx-2 im Zytoplasma nachgewiesen wurden (Huynh et al., 2003).

Diese Ergebnisse sind auch auf Untersuchungen im ZNS übertragbar, wo Atx-2 in Kleinhirngewebe von SCA2-Patienten immunzytochemisch im Zytoplasma von Purkinje-Zellen nachgewiesen wurde (Huynh et al., 2000a). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zur subzellulären Lokalisation von Atx-2 in primären Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*) zeigten ebenfalls die zytoplasmatische Lokalisation der pathogenen und physiologischen Atx-2 Isoform. Beide Atx-2 Isoformen waren weder in den Synapsen noch intranukleär detektierbar. Interessanterweise waren beide Atx-2 Formen vereinzelt als punktförmige Granula in den Dendriten der Hippocampusneurone nachweisbar (Abb. 3.9 und 3.10). Dabei könnte es sich um die in der Literatur bereits als Inklusionen beschriebenen Atx-2 Proteinaggregate handeln oder möglicherweise um Processing-bodies (P-bodies) - einen Ort des mRNA-Abbaus. In der Literatur wurden bei SCA2 bereits zytoplasmatische Inklusionen in Glia-Zellen, humanen Cortex-Neuronen und im Pons beschrieben, von denen angenommen wird, dass sie zytoprotektiv wirken (Probst-Cousin et al., 2004; Pang et al., 2002; Cummings et al., 2001). Allgemein wird angenommen, dass die Pathogenese der SCA2 hauptsächlich durch zytoplasmatische Aggregate in Purkinje-Zellen vermittelt ist und intranukleäre Aggregate in der Pathogenese der SCA2 keine Rolle spielen, zumal sie nicht in Purkinje-Zellen gezeigt werden konnten (Huynh et al., 2000a; Koyano et al., 1999).

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Expressionsmuster von mutiertem und physiologischem Atx-2 im Zytoplasma von Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*) beobachtet (Abb. 3.11/3.12). Dabei schien pathogenes Atx-2 im Zytoplasma stärker exprimiert zu werden und war 48-72 Stunden nach der Transfektion gleichmäßig perinukleär im Zytoplasma verteilt (Abb. 3.12). Die physiologische Atx-2 Form war ebenfalls perinukleär lokalisiert, aber an einigen

Stellen im Zytoplasma eher ungleichmäßig verteilt (Abb. 3.11). Die beobachtete stärkere Expression der mutativ veränderten Atx-2 Form ist nach der Hypothese einer "gain of function" - Mutation auf eine stärkere Aktivität des mutierten Gens zurückzuführen. Auch Huynh und Kollegen haben beobachtet, dass die Expression von mutiertem Atx-2 höher ist, als die des physiologischen Atx-2 (Huynh et al., 2003). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der Transfektionsrate mikroskopisch bestätigt werden und könnte bedeuten, dass die pathogene Atx-2 Form stabiler ist. Diese Hypothese könnte durch Pulse-Chase-Experimente bestätigt werden, indem man die Proteinstabilität radioaktiv markierter Atx-2 Isoformen mit den Vektoren pAtx2-Q22-Flag und pAtx2-Q81-Flag untersucht, die im Rahmen dieser Arbeit für die AG Kindler konstruiert wurden. Diese Methode bietet die Möglichkeit, Informationen über Prozessierung, Transport, Sekretion, Proteinabbau, physikalische und chemische Eigenschaften eines Proteins in Zellkultur zu gewinnen. Dies könnte neue Erkenntnisse zur Pathogenese der SCA2 liefern.

Die Hypothese, dass eine Schädigung des Golgi-Apparates den Zelluntergang durch Apoptose begünstigt (Dueñas et al., 2006; Gonatas et al., 2006) und eine Fragmentierung des Golgi-Apparates bei SCA2 typisch sei (Huynh et al., 2003), konnte in dieser Arbeit mikroskopisch nicht bestätigt werden. Allerdings wurde nach Transfektion der Konstrukte pEGFP-Atx2-Q22 und pEGFP-Atx2-Q79 in Hippocampusneurone der Ratte (*Rattus norvegicus*) innerhalb der ersten vier Tage in Zellkultur ein Dendritenverlust beobachtet (Abb. 3.11/3.12), der bei der pathogenen Atx-2 Form drastischer voranschritt, als bei der physiologischen. Er scheint Ausdruck der neurodegenerativen Wirkung von pathogenem Atx-2 zu sein. Arbeitsgruppen, die humane Purkinje-Zellen bei erblicher Ataxie untersucht haben, beschreiben zu Beginn des neurodegenerativen Prozesses einen Verlust der Dendriten, der bis zur vollständigen Zerstörung des Zellkörpers fortschreitet (Koeppen et al., 1991). Auch im Tierversuch kam es nach Überexpression von mutiertem Atx-2 in Purkinje-Zellen zum progredienten Dendritenverlust und Zelluntergang (Huynh et al., 2000a). Ob die Pathogenese der SCA2 ausschließlich durch die Apoptose-induzierende pathogene Wirkung von mutativ verändertem Atx-2 zu erklären ist, bleibt unklar.

Allgemein wird diskutiert, welche Rolle Apoptose bei neurodegenerativen

Erkrankungen, wie Chorea Huntington (Zhang et al., 2006) und SCA7 spielt (Zander et al., 2001). Giuliano und Kollegen zeigten, dass PC12-Zellen nach Synthese von Proteinen mit mutativ verlängerten Polyglutaminregionen Apoptose einleiten (Giuliano et al., 2003). Interessanterweise sensibilisieren erhöhte Atx-2-Konzentrationen Zellen von Neuroblastom-Tumoren für Apoptose (Wiedemeyer et al., 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass mutierte Proteine mit Polyglutaminregionen Caspasen aktivieren und von diesen gespalten werden können, was ihre Toxizität erhöht (Huynh et al., 2003). Daher wurde die Hypothese formuliert, dass die pathogene Wirkung von mutativ verändertem Atx-2 durch Aktivierung der Apoptosekaskade vermittelt wird. Um diese Frage zu beantworten, wurden die rekombinanten Fusionsproteine EGFP-Atx2-Q22 und EGFP-Atx2-Q79 in Hippocampusneuronen in einem immunzytochemischen Apoptose-Assay (3.6.) mit Hilfe des Anti-Active-Caspase-3 Antikörpers untersucht. Im Apoptose-Assay führte sowohl die Synthese von physiologischem Atx-2 (Abb. 3.14), als auch von pathogenem Atx-2 (Abb. 3.13) zur Aktivierung der Caspase-3. Die quantitative Analyse der Apoptoserate (3.6.1) zeigte anschließend, dass die Anzahl der apoptotischen Zellen nach Überexpression von pathogenem Atx-2 nach 72 Stunden höher war, als nach Überexpression von physiologischem Atx-2 oder EGFP (Abb. 3.15). Dies könnte ein Anzeichen für die Toxizität der mutierten Atx-2 Form sein. Der quantitative Vergleich der Apoptoserate von EGFP, mutiertem und physiologischem Atx-2 ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Ähnliche Ergebnisse von Wiedemeyer und Kollegen zeigen, dass erhöhte Konzentrationen von Wildtyp Atx-2 humane Neuroblastom-Tumorzellen für Apoptose sensibilisieren, während mutiertes Atx-2 die Apoptose-Aktivität nicht erhöht (Wiedemeyer et al., 2003).

Allgemein wird angenommen, dass der SCA2-assoziierte Parkinsonismus-Phänotyp, der durch Degeneration der Substantia nigra entsteht, durch die Interaktion von Atx-2 mit Parkin zu erklären sei. Parkin ist eine Ubiquitinligase, die bei einer autosomal-rezessiven Parkinsonismusform verändert ist und mit Atx-2 in Purkinje-Zellen und Neuronen der Substantia nigra interagieren kann, wobei Parkin mit höherer Affinität an mutiertes Atx-2 bindet, als an Wildtyp Atx-2 (Huynh et al., 2007). Kolkalisationsexperimente mit mutiertem Atx-2 und Parkin zeigten eine verminderte Parkin-Konzentration in Purkinje-Zelldendriten, was auf einen Zusammenhang zwischen Parkin-Konzentration und synaptischer Dysfunktion

hindeutet (Huynh et al., 2007). Diese Ergebnisse und die Beobachtung, dass Atx-2 nicht in hippocampalen Synapsen nachweisbar ist (Abb. 3.9/3.10) lassen vermuten, dass die SCA2 möglicherweise indirekt durch Interaktion von Atx-2 mit bestimmten Proteinen verursacht wird. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in Studien zu SCA1 an Atx-1 und einer assoziierten Ubiquitin Ligase (Cummings et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde die Affinitätschromatographie genutzt, um putative Atx-2-Interaktionspartner in eukaryotischen Zellen in vivo zu identifizieren. Der C-Terminus von GKAP interagiert selektiv mit der PDZ-Domäne von Shank 1 (Brendel et al., 2004). Nach diesem Prinzip wurden die Fusionsproteine Atx2-Q22-PDZ und Atx2-Q79-PDZ über ein PDZ-bindendes Peptid an GKAP-Sepharose gekoppelt, um die an Atx-2 gebundenen endogenen Interaktionsproteine aus HEK-293-Zelllysaten zu präzipitieren. Da artifizielle Interaktionen auftreten können, sollte jedes Ergebnis der Affinitätschromatographie mittels Immunpräzipitation verifiziert werden. Das zur Identifikation putativer Interaktionspartner angefertigte Coomassie-Gel (Abb. 3.17) beweist die Spezifität und Funktionsfähigkeit der Methode. Das Bandenmuster des pathogenen Atx-2 (Atx2-Q79-PDZ) unterschied sich deutlich von dem des Kontrollproteins Marta-2 (M2-PDZ) und Lysate untransfizierter HEK-293-Zellen zeigten keine Proteinbanden. Die Atx-2-spezifischen Banden wurden mittels Massenspektrometrie analysiert, wobei alle Ergebnisse reproduziert werden konnten. Das Atx2-Q79-PDZ Fusionsprotein wurde in der 250 kDa Bande detektiert. Die 90 kDa Bande ist als DDX1 (DEAD-Box Protein 1) identifiziert worden. Die 75 kDa Bande ist als DDX21 (DEAD-Box Protein 21) identifiziert worden. Proteine der DEAD-Box-Familie sind RNA-Helikasen und Schlüsselenzyme im RNA-Metabolismus (Fuller-Pace FV, 2006). Sie sind in eukaryotischen Zellen an Transkription, mRNA-Abbau, Spleissprozess, mRNA-Export, Ribosomensynthese und Translationsinitiation beteiligt und binden dazu an mRNP (Linder et al., 2006; Jankowsky et al., 2006). Interessanterweise besteht eine hohe Sequenzhomologie von DEAD-Box-Proteinen und eukaryotischem Initiationsfaktor-4A (Svitkin et al., 2001). DDX1 ist eine ATP-abhängige RNA-Helikase, die in Zusammenhang gebracht wurde mit dem nukleären RNA-Export in Versuchen an RNA des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (Jeang et al.,

2006). Demnach könnte Atx-2 durch Interaktion mit DDX1 am RNA-Export vom Zellkern ins Zytoplasma beteiligt sein.

DDX21 wird auch als nukleoläre RNA-Helikase-II (RHIII/Gu α) bezeichnet und wurde als Interaktionspartner und Aktivator des Transkriptionsfaktors c-Jun identifiziert, der an der Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt ist (Westermarck et al., 2002). Durch c-Jun wird der programmierte Zelltod im Nervensystem von Säugern reguliert, wobei sein biologischer Effekt von Zelltyp und Entwicklungsstadium abhängig ist (Ham et al., 2000). Folglich könnte Atx-2 durch Interaktion mit DDX21 indirekt auf die c-Jun-vermittelte Apoptosekaskade wirken.

Das in der 60 kDa Bande des Coomassie-Gels identifizierte Protein Sorting-Nexin-27 wurde als artifizielles Ergebnis gewertet, da Sorting-Nexin-27 eine PDZ-bindende Domäne besitzt (Rincón et al., 2007) und deswegen an die GKAP-Sepharose binden konnte. Ein weiteres Protein FAM-98A in der 60kDa Bande ist das erste Proteinmitglied der Proteinfamilie mit Sequenzhomologie 98. Es interagiert selektiv mit Phosphopantethein-Resten.

Außerdem wurden in der 70 kDa Bande die zytoplasmatischen Poly(A)-Bindeproteine PABP-1, PABP-3 und PABP-4 detektiert. In HEK-293-FT-Zellen wurde beobachtet, dass humanes Atx-2 mit Polyribosomen interagiert, indem Atx-2 über das PAM2-Motiv an Poly(A)-Bindeproteine bindet (Shibata et al., 2000). Interessanterweise reguliert Atx-2 die intrazelluläre Konzentration seines Interaktionspartners PABP dahingehend, dass Zellen verminderte PABP-Konzentrationen aufweisen, wenn sie Atx-2 überexprimieren (Nonhoff et al., 2007). Durch Untersuchungen in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist die Funktion des Poly(A)-Bindeproteins 1 (PABP-1) gut untersucht. Das humane PABP-1 interagiert spezifisch über RNA-Erkennungsmotive mit dem 3'-Poly(A)-Schwanz der mRNA und mit den Translations-Initiationsfaktoren eIF-4E, eIF-4A, eIF-3, eIF-4G (vgl. Abb. 4.1).

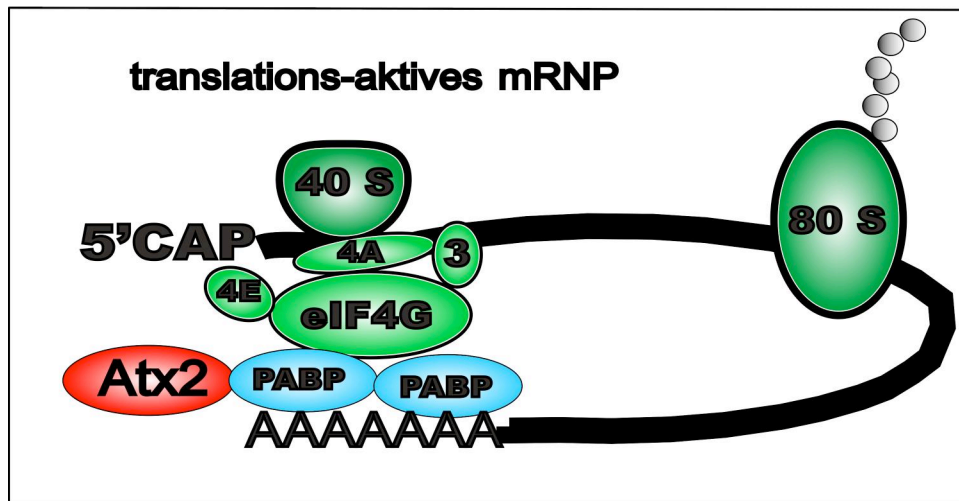


Abb. 4.1: Modell: Interaktion von Atx-2 und PABP während der Translation. Die mRNA wird am Poly(A)-Schwanz (AAAAAAA) von Poly(-)A-Bindeproteinen (PABP) besetzt, die zusammen mit den Translationsinitiationsfaktoren eIF4G, eIF-4E, eIF-4A und eIF-3 durch Bindung an die 7-Methylguanositriphosphat Kopfgruppe (5'CAP) am 5'-Ende eine Ringstruktur bilden (*closed-loop*). Dabei wird die kleine 40S-Untereinheit des Ribosoms rekrutiert, die zusammen mit der 60S-Untereinheit das funktionsfähige 80S Ribosom bildet. Durch Bindung von eIF-3 beginnt die Translation. Das auf der mRNA kodierte Protein wird translatiert. Über die Interaktion von Atx-2 und PABP könnte die Translation und die Bildung der *closed-loop* Struktur reguliert werden (nach Clemens *et al.*, 2000).

Poly(A)-Bindeproteine regulieren die Translationsinitiation durch Bindung an den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF-4G, der über das Kappenbindungsprotein eIF-4E mit der 7-Methylguanositriphosphat Kopfgruppe am 5'-Ende (5'CAP) der mRNA assoziiert ist (Proud CG, 2007). PABP-1 reguliert auch die mRNA-Stabilität, indem es mit eIF-4A, eIF-4E, eIF-4G und mRNA interagiert und aus mRNA und assoziierten Proteinen sogenannte Boten-Ribonukleotidpartikel (mRNP) bildet, die in einer als *closed-loop* Struktur bezeichneten Ringstruktur vorliegen (Wells *et al.*, 1998; Searfoss *et al.*, 2001). Diese Ringstruktur führt zur Rekrutierung der 40S-Untereinheit des Ribosoms und zum Aufsuchen des Startkodons der mRNA. An die 40S-Untereinheit des Ribosoms ist die Aminoacyl-tRNA über den Faktor eIF2 gebunden. Anschließend lagert sich die 60S-Untereinheit des Ribosoms an. Dies führt zur Assemblierung des funktionsfähigen 80S-Ribosoms. Über die Interaktion mit dem Initiationsfaktor eIF-3 beginnt der Translationsstart. Bleibt die mRNP-Ringstruktur erhalten, ist die mRNA translations-aktiv und kann in diesem Zustand mehrfach abgelesen, aber nicht abgebaut werden. Wenn es nach erfolgreichem Ablesen der mRNA am 3'-Ende angekommen ist, beginnt das Ribosom erneut am 5'-Ende in 5'-3'-Leserichtung, was als Recycling des Ribosoms bezeichnet wird. PABP-1 reguliert außerdem die

Translationstermination, indem die Terminationsfaktoren eRF-3 und eRF-1 an den C-Terminus von PABP-1 binden. Das Atx-2 Ortholog in *Caenorhabditis elegans* interagiert mit dem Poly(A)-Bindeprotein 1 und reguliert die Translation (Ciosk et al., 2004). Daher erscheint es möglich, dass auch humanes Atx-2 durch Wechselwirkung mit Poly(A)-Bindeproteinen über ähnliche Funktionen verfügt (vgl. Abb. 4.1).

Darüber hinaus ist das Protein PABP-1 ein Effektor des mRNA-Abbaus. Solange die mRNA in translations-aktiver Form vorliegt, kann sie nicht abgebaut werden. Die mRNA ist gegen den exonukleolytischen Abbau durch spezifische terminale Strukturen und ihre assoziierten Proteine geschützt: eine Kopfgruppe am 5'-Ende und einen 3'-Poly(A)-Schwanz. Die Entfernung dieser terminalen Modifikationen ist der limitierende Faktor für den RNA-Abbau (Meyer et al., 2004). Nach Beendigung der Translation dissoziiert der mRNP. Danach erfolgt der mRNA-Abbau in drei Schritten. Im ersten Abbauschritt wird die mRNA zunächst deadenyliert. Darunter versteht man die Entfernung des 3'-Poly-(A)-Schwanzes der mRNA in translations-inaktiven mRNP mit Hilfe des Enzymkomplexes Ccr4-Pop2-Not. Die Deadenylierung findet in speziellen Granula statt, die allgemein als Processing-bodies (P-bodies) bezeichnet werden (vgl. Abb. 4.2). Dabei wird das Poly(A)-Signal auf 10 bis 15 Nukleotide verkürzt und die gebundenen Poly(A)-Bindeproteine vom mRNP getrennt. Anschließend dissoziieren die restlichen Proteine. Es sind verschiedene mRNA-Abbauwege beschrieben (Meyer et al., 2004). Nach der Deadenylierung kann die mRNA entweder in 5'-3'-Richtung in P-bodies oder in 3'-5'-Richtung im Exosom abgebaut werden. Der 5'-3'-Abbau der mRNA in P-bodies ist durch das Deadenylierungs-abhängige Decapping charakterisiert und bezeichnet den Abbau der 7-Methylguanosintriphosphat Kopfgruppe am 5'-Ende der mRNA, der über die abbauenden Enzyme Dcp1 und Dcp2 erfolgt. Die Hydrolyse der Kopfgruppe am 5'-Ende erfolgt durch DcpS. Danach wird die mRNA in 5'-3'-Richtung durch die 5'-Exonukleasen Xrn1 abgebaut (Meyer et al., 2004).

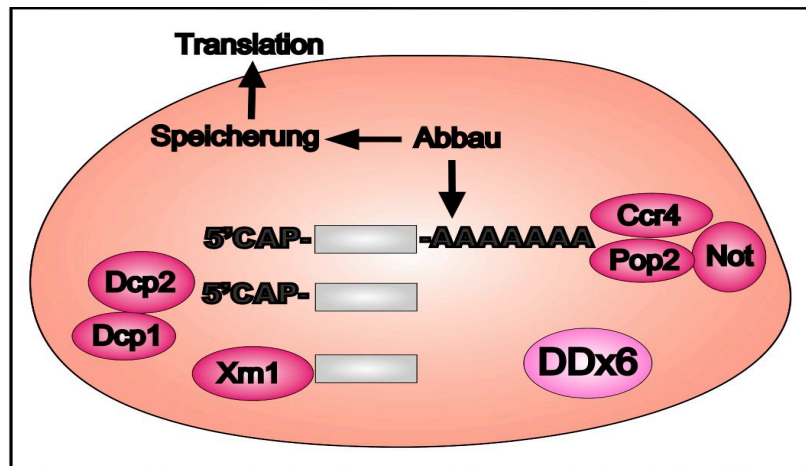


Abb. 4.2: Processing-bodies - Der Ort des 5'-3'-mRNA-Abbaus. Deadenylierung der mRNA am Poly(A)-Signal durch den Enzymkomplex Ccr4-Pop2-Not. Deadenylierungs-abhängiges *Decapping* mit Abbau der 7-Methylguanositriphosphat Kopfgruppe am 5'-Ende (5'CAP) der mRNA über die abbauenden Enzyme Dcp1 und Dcp2. Die Kopfgruppe am 5'-Ende wird durch die 5'-Exonukleasen Xrn1 abgebaut. Das Protein DDX6 (DEAD-Box Protein 6) ist an der Bildung der *P-bodies* beteiligt. (nach Meyer *et al.*, 2004; Kedersha *et al.*, 2005).

Die Regulation der Translation und des mRNA Abbaus wird in eukaryotischen Zellen von P-bodies übernommen (Swisher *et al.*, 2010). Nach aktuellem Wissensstand sind P-bodies Aggregate aus translations-inaktiven mRNP, die assoziiert sind mit Faktoren der Translationsrepression und des mRNA-Abbaus (Parker *et al.*, 2007). Sie sind runde, ca. 0,1-1,0 µm große zytoplasmatische RNA-Granula (Anderson *et al.*, 2006). In diesen dynamischen Strukturen findet das mRNA-Decapping und der weitere 5'-3'-mRNA-Abbau statt (Sheth *et al.*, 2003; Nonhoff *et al.*, 2007). P-bodies der Bäckerhefe unterscheiden sich kaum von denen der Säuger. Sie enthalten die Decapping-Enzyme Dcp1 und Dcp2, die 5'-3'-Exoribonuklease Xrn1, die LSM-Proteine 1-7, Aktivatoren zur Hydrolyse der 7-Methylguanositriphosphat Kopfgruppe der mRNA, das Protein DDX6 und den Ccr4/Not-Komplex zur Deadenylierung der mRNA (Cougot *et al.*, 2004) und speichern durch mikro-RNA (miRNA) reprimierte mRNA (Spector D.L., 2006). Mikro-RNA sind 20 bis 22 Nukleotide lange regulatorische RNA, die posttranskriptionell die Genexpression durch Anlagerung an die 3'-untranslatierte Region der Target-mRNA regulieren (Jackson *et al.*, 2007). Sie verhindern die Akkumulation von Proteinen, indem sie die Translation reprimieren oder den mRNA-Abbau induzieren (Bhattacharyya *et al.*, 2006). P-bodies enthalten weder translations-aktive Komplexe noch Translations-Initiationsfaktoren oder Ribosomen (Andrei *et al.*, 2005). In P-bodies findet keine Translation statt. Vielmehr dienen P-bodies der Speicherung von vorübergehend nicht-translatierter

mRNA, bis diese entweder in den Translationsprozess zurückkehrt oder abgebaut wird (Teixeira et al., 2005; Parker & Sheth, 2007). Es wird allgemein angenommen, dass mRNA zwischen der translations-inaktiven Speicherform in P-bodies und der translations-aktiven Form im Zytoplasma wechseln kann. Die Interaktion von Atx-2 mit DDX6 könnte die Funktion haben die nicht-translatierte mRNA in P-bodies zu rekrutieren. Interessanterweise zeigten Nonhoff und Kollegen parallel zu dieser Arbeit, dass Atx-2 über seine LSm-/LSmAD-Domäne mit der ATP-abhängigen RNA-Helikase DDX6 interagiert (Nonhoff et al., 2007). DDX6 wird auch als RCK/p54 bezeichnet und ist am 5'-3'-Abbau der mRNA in P-bodies beteiligt (Cougot et al., 2004). Zum einen ist DDX6 essentiell für die Bildung von P-bodies (Andrei et al., 2005). Zum anderen ist das DDX6-Ortholog Xp54 in *Xenopus laevis* Bestandteil von mRNP. Die entsprechenden Orthologe in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* regulieren die Translationsaktivierung gespeicherter mRNP. Aus Versuchen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist bekannt, dass DDX6 am Umbau von mRNP für die Translation, an der mRNP-Speicherung und ihrem Abbau beteiligt ist, indem DDX6 mit dem Decapping-Enzym Dcp1p und mit Pop2 interagiert, einer Untereinheit des mRNA-Deadenylasekomplexes (Weston et al., 2006). Atx-2 ist nicht entscheidend für die Bildung von P-bodies. Allerdings wird vermutet, dass Atx-2 die Rekrutierung von DDX6 in P-bodies beeinflusst (Nonhoff et al., 2007). Somit wirkt Atx-2 über die Interaktion mit DDX6 an der wesentlichen Schaltstelle zwischen Translationsregulation und mRNA-Abbau. In der vorliegenden Arbeit konnte rekombinantes DDX6 nach Transfektion des Konstruktes pTL-Flag-DDX6 in zytoplasmatischen und dendritischen granulären Strukturen in Hippocampusneuronen der Ratte nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3.18 gezeigt, bildet DDX6 in Hippocampusneuronen kleine Granula, die vermutlich P-bodies darstellen.

Zusammenfassend werden anhand des folgenden Modells die möglichen Funktionen von Atx-2 erläutert und Rückschlüsse zur Pathogenese der SCA2 gezogen. Zunächst ist Atx-2 physiologischerweise durch Interaktion mit A2BP1 an der RNA-Modifikation im Zellkern beteiligt (Abb. 4.3 a).

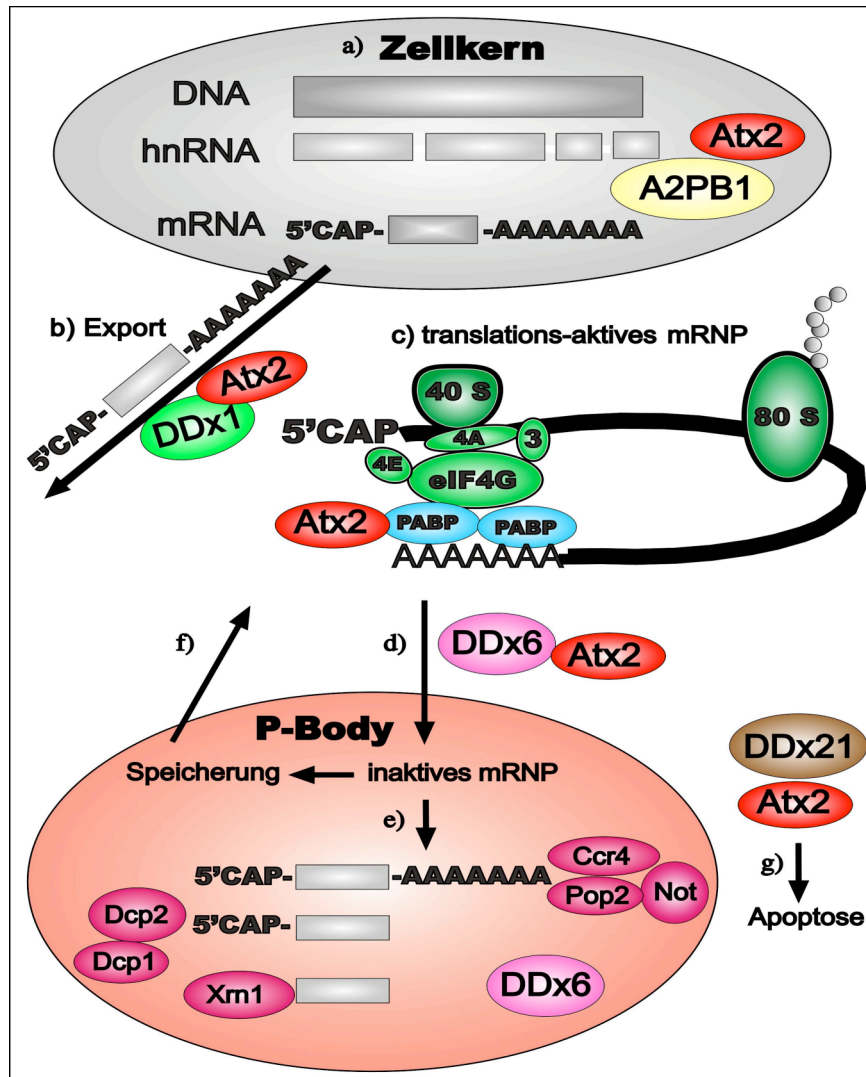


Abb. 4.3: Modell zu möglichen Funktionen von Atx-2 in eukaryotischen Zellen. a) Im Zellkern ist die Transkription dargestellt. An der Modifikation der entstehenden hn-RNA ist ein A2BP1/Atx-2-Komplex beteiligt. b) Am mRNA-Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma wirken das Protein DDx1 und Atx-2 mit. Zur Initiation der Translation lagern sich PABP an das Poly-A-Signal der mRNA an und bilden mit einer Reihe von Initiationsfaktor, wie eIF-4A, eIF-3, eIF-4E und eIF-4G, translations-aktive mRNP. c) Die mRNP liegen als sogenannte *closed-loop* Strukturen vor. Dies ermöglicht es dem 80S-Ribosom die mRNA mehrfach zu translatieren. Anschließend wird die mRNA unter Mitwirkung von DDx6 in *P-bodies* verbracht (d), um dort abgebaut (e) oder gespeichert zu werden und erneut translatiert zu werden (f). Über die Interaktion mit DDx21 kann Atx-2 möglicherweise die Apoptosekaskade aktivieren (g). Atx-2: Ataxin-2, A2BP1: Atx-2 Bindeprotein1, DDx: DEAD-Box-Protein, PABP: Poly(A)-Bindepotein, Ccr4PopNot: Deadenylierendes Enzym, Dcp: 7-Methylguanositriphosphat-Gruppen (5'CAP) abbauendes Enzym, Xrn1: Exonuklease 1.

Das in der Affinitätschromatographie als putatives Interaktionsprotein des pathogenen Atx-2 identifizierte DDx1 ist am Export der mRNA ins Zytoplasma beteiligt, so dass angenommen werden kann, dass Atx-2 ebenfalls am mRNA-Export beteiligt ist (Abb. 4.3 b). Über Poly(A)-Bindepoteine, die an der Bildung der *closed-loop* Struktur von translations-aktiven mRNP beteiligt sind, könnte Atx-2 eine regulatorische Funktion während der Translationsinitiation besitzen (Abb. 4.3 c). Außerdem ist bekannt, dass Atx-2 mit DDx6 interagieren kann (Abb. 4.3 d), das

im Zytoplasma und in P-bodies vorkommt (Nonhoff et al., 2007). Durch Interaktion mit DDX6 könnte Atx-2 an der Rekrutierung von translations-inaktiven mRNP in P-bodies beteiligt sein (Abb. 4.3 d), und sie dem 5'-3'-Abbau oder der vorübergehenden Speicherung zuführen. Da die zelluläre Atx-2-Konzentration die Bildung von P-bodies beeinflusst, könnte Atx-2 damit das Gleichgewicht von Translation und RNA-Abbau regulieren (Abb. 4.3 e) und eine Rückkehr der mRNA aus den P-bodies in den Translationsprozess ermöglichen (Abb. 4.3 f). Der genaue Wirkmechanismus der Interaktion von Atx-2 und DDX6 bleibt Gegenstand künftiger Forschungsarbeiten. Diese sollten den Wirkmechanismus von DDX6 auf den mRNA-Metabolismus näher untersuchen, um Rückschlüsse über die Pathogenese der SCA-2 ziehen zu können. Außerdem wurde DDX21 als Interaktionsprotein der pathogenen Atx-2 Form identifiziert. Möglicherweise erklärt diese Interaktion die Aktivierung der Apoptosekaskade (Abb. 4.3 g), wie sie im Apoptose-Assay der vorliegenden Arbeit durch Nachweis der Caspase-3 Aktivität gezeigt wurde. Daher sollte die genaue Interaktion von Atx-2 und DDX21, die Funktion von DDX21 auf Zellebene und der Zusammenhang mit der Pathogenese der SCA-2 Gegenstand weiterer Forschungsvorhaben sein.

5 Zusammenfassung

Die spinocerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2) ist eine autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung aus der Gruppe der spinocerebellären Ataxien. Die Neurodegeneration betrifft die Purkinje-Zellen des Cerebellums mit seinen Afferenzen und Efferenzen (Schols et al., 2004). Genetische Ursache der SCA2 ist eine mutative, repetitive CAG-Trinukleotid-Sequenz in Exon-1 des Ataxin-2 Gens (ATXN2-Gen), die eine Polyglutaminregion im Protein Ataxin-2 (Atx-2) kodiert. Durch Mutation des ATXN2-Gens entsteht ein verändertes Genprodukt mit toxischer Wirkung in der Zelle (gain of toxic function). Leitsymptom der SCA2 ist eine cerebelläre Ataxie, die mit nicht-cerebellären neurologischen Symptomen einhergeht. Atx-2 kommt im menschlichen Organismus ubiquitär vor. Seine Funktion ist bisher unbekannt. Es wird angenommen, dass Atx-2 eine Funktion im RNA-Metabolismus hat (Ralser et al., 2005a). Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die subzelluläre Verteilung des Proteins Atx-2 immunzytochemisch zu untersuchen und putative Interaktionsproteine zu identifizieren. Mittels eukaryotischer Expressionsvektoren wurde die subzelluläre Lokalisation der pathogenen und physiologischen Atx-2 Isoform untersucht. In primären Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*) und in CHO-K1-Zellen wurde eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung der Atx-2 Isoformen beobachtet. Außerdem wurden die Atx-2 Isoformen in kleinen Granula in den Dendriten von Hippocampusneuronen der Ratte (*Rattus norvegicus*) nachgewiesen. Deswegen wurde das bereits bekannte Atx-2-Interaktionsprotein DDx6 (DEAD-Box Protein 6) ebenfalls in Hippocampusneuronen untersucht und in zytoplasmatischen und dendritischen Granula nachgewiesen. Da Atx-2 Veränderungen der Dendritenmorphologie von Hippocampusneuronen verursachte, wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Beide Atx-2 Isoformen sensibilisieren Hippocampusneurone für Apoptose, was anhand der Enzymaktivität von Caspase-3 objektiviert wurde. Mit der Affinitätschromatographie, einer neuen biochemischen Methoden zur Identifikation putativer Atx-2-Interaktionsproteine, wurden die Proteine DDx1 (DEAD-Box Protein 1), DDx21 (DEAD-Box Protein 21), PABP-1, PABP-3, PABP-4 (Poly(A)-Bindungsprotein-1, -3 und -4), Sorting Nexin-27 und Protein Fam 98A als Bindungsproteine der pathogenen Atx-2 Isoform identifiziert.

6 Abkürzungsverzeichnis

AAAAA-	Poly-A-Signal der mRNA
Aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ADCA	autosomal-dominante cerebelläre Ataxien
AG	Arbeitsgruppe
Anti-Active-Caspase-3	Antikörper gegen die aktivierte Caspase-3
Anti-MAP2	Antikörper gegen Mikrotubulus-assoziiertes Protein 2
Apaf-1	engl.: apoptotic protease activating factor 1
as	antisense Primer
AraC	Cytosin-Arabinosid
ATG	Startkodon
ATCC	engl.: American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
Atx-2	Ataxin-2 Protein
Atx2-Q22-FLAG	FLAG-Ataxin-2 Fusionsprotein mit 22 Glutaminresten
Atx2-Q81-FLAG	FLAG-Ataxin-2 Fusionsprotein mit 81 Glutaminresten
Atx2-Q22-PDZ	PDZ-Ataxin-2 Fusionsprotein mit 22 Glutaminresten
Atx2-Q79-PDZ	PDZ-Ataxin-2 Fusionsprotein mit 79 Glutaminresten
ATXN	Ataxin-Gen
ATXN2	Ataxin-2 Gen
Atx-2-mRNA	mRNA von Ataxin-2
A2BP1	Ataxin-2 Bindungsprotein 1
bax	engl.: bcl-2-associated x protein
BBS	engl.: BES-buffered phosphate saline
bcl-2	engl.: B-cell lymphoma 2 protein
BES	engl.: Bis-2-hydroxyethyl-2-aminoethanesulfonic acid
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C-	Carboxy-
CAA	Cytosin-Adenin-Adenin Triplett
CaCl ₂	Calciumchlorid
CACNA1A	1A-Untereinheit des P/Q-Kalziumkanals
CAG	Cytosin-Adenin-Guanin Triplett
Ccr4/Pop2/Not	Deadenylase-Komplex
CD95	Fas-Rezeptor, transmembranales Glykoprotein
CD95L	Fas-Ligand
cDNA	engl.: complementary desoxyribonucleic acid
CHO-K1	Ovarialzelllinie des chinesischen Hamsters (engl.: chinese hamster ovary)
closed-loop	Formation aus RNA und Proteinen zur Translationsinitiation
c-Jun	Transkriptionsfaktor
cm	Zentimeter
COS-1	Zelllinie aus Nierenzellen der grünen Meerkatze (lat.: Cercopithecus aethiops)

CPSF	engl.: cleavage and polyadenylation specificity factor
CTG	Cytosin-Thymin-Guanin
Cyt c	Cytochrom c
Dcp	engl.: decapping enzyme
DDx	DEAD-Box Protein
DDx1	DEAD-Box Protein 1
DDX6	DEAD-Box Protein 6
DDx21	DEAD-Box Protein 21
Dhh1	Hefe-Homolog des humanen DEAD-Box Proteins 6
DMEM	Zellmedium (engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DRPLA	Dentatorubrale pallidolysische Atrophie
E	Entwicklungstag
ECL	engl.: enhanced chemiluminiscence
E. coli XL1 Blue	Escherichia coli Zelllinie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	engl.: enhanced green fluorescent protein
EGFP-Atx2-Q22	EGFP-Ataxin-2 Fusionsprotein mit 22 Glutaminresten
EGFP-Atx2-Q79	EGFP-Ataxin-2 Fusionsprotein mit 79 Glutaminresten
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
eRF	engl.: eukaryotic release factor
FADD	engl.: Fas-associated deathdomain
F12-HAM	Nährmedium
FCS	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
Flag	Flag-Epitop von Fusionsproteinen
FOX-1	Homolog des Ataxin-2 Bindeproteins 1 in C. elegans
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GKAP	Guanylatkinase-assoziiertes Protein
GKAP-Peptid	Peptid aus 10 Aminosäuren von GKAP
h	Stunde
HBSS	Waschlösung (engl.: Hank's buffered salt solution)
HD	Chorea Huntington
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie (engl.: Human embryonic kidney 293)
HEPES	2-4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1 (engl.: human immunodeficiency virus)
hn-RNA	heteronukleäre RNA
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase)
HSP70	Hitzeschockprotein 70
kb	Kilo-Basen
KCM	Nährmedium (engl.: Kupffer cell medium)
kDa	Kilo-Dalton

I	Liter
LB-Agar	Nährboden (nach Bertani G., 1951)
L-Dopa	Levodopa
L _{Sm} -Domäne	RNA-Interaktionsdomäne von Atx-2 (engl.: like Sm)
L _{SmA} -Domäne	Interaktionsdomäne von Atx-2 (engl.: like Sm-associated domain)
L _{Sm} -Proteine	RNA-bindende Proteinfamilie
M	Molar
μ	Mikro- (Einheit: 10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
mA	Milli-Ampere
MAP2	Mikrotubulus-assoziiertes Protein 2
Marta-2	engl.: MAP2-RNA transacting protein
mg	Milligramm
MG-132	Proteasom-Inhibitor
min	Minute(n)
miRNA	mikro-RNA
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid
mRNP	engl.: messenger ribonucleoprotein particle
N-	Aminosäureterminus
NGS	Ziegenserum (engl.: normal goat serum)
nm	Nanometer
p	Vektor
p53	Tumor-Suppressorprotein
p54/RCK	Dead-Box Protein 6 (DDx6)
PABP	Poly(A)-Bindeprotein
PAB-1	Poly(A)-Bindeprotein in <i>C. elegans</i>
PABP1	humanes Poly(A)-Bindeprotein 1
PABC	C-terminale Domäne des Poly(A)-Bindeproteins
PAM2	PABP-Interaktionsmotiv 2
pAtx2-Flag	Flag-Vektor mit Atx-2 cDNA
pAtx2-Q22-Flag	Flag-Vektor mit Atx-2 cDNA mit 22 Glutaminresten
pAtx2-Q81-Flag	Flag-Vektor mit Atx-2 cDNA mit 81 Glutaminresten
pAtx2-PDZ	PDZ-Vektor mit Atx-2 cDNA
pAtx2-Q22-PDZ	PDZ-Vektor mit Atx-2 cDNA mit 22 Glutaminresten
pAtx2-Q79-PDZ	PDZ-Vektor mit Atx-2 cDNA mit 79 Glutaminresten
P-bodies	Ort des RNA-Abbaus (engl.: processing bodies)
Pbp1	Hefe-Homolog von Atx-2 (engl.: Pab1p-binding protein)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung; enthält Tris (engl.: phosphate buffered saline tris buffer)
PC12-Zellen	Ratten-Phäochromocytom-Zelllinie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD-95/Dlg/ZO-1
pEGFP	EGFP-Vektor

pEGFP-Atx2	EGFP-Vektor mit Atx-2 cDNA
pEGFP-Atx2-Q22	EGFP-Vektor mit Atx-2 cDNA mit 22 Glutaminresten
pEGFP-Atx2-Q79	EGFP-Vektor mit Atx-2 cDNA mit 79 Glutaminresten
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration, $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$
pmol	Pico-Mol (Einheit: 10 ⁻¹²)
PMSF	Proteaseinhibitor (engl.: phenylmethylsulphonyl fluoride)
Poly(Q)	Polyglutaminregion
prä-mRNA	Vorläufer der messenger-RNA
PSD	postsynaptische Dichte
pSTAG-TEV	Vektor
pTL-FLAG-DDx6	Vektor mit DDx6 cDNA und Flag-Sequenz
RHII/Gu α	nukleoläre RNA Helikase II (entspricht DDx21)
RIPA-Puffer	Radio-Immun-Präzipitations-Assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleotidpartikel
rpm	engl.: revolutions per minute
RRM	RNA-Erkennungsmotiv (engl.: RNA recognition motif)
RT	Raumtemperatur
s	sense Primer
SBM	engl.: SH3 domain binding motif
SBMA	Spinobulbäre Muskelatrophie
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SCA2	Spinocerebelläre Ataxie Typ 2
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
Shank 1	engl.: SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1
SH3-Domäne	engl.: Src homology 3 domain
snRNP	kleine nukleäre Ribonukleotidpartikel (engl.: small nuclear ribonucleotid particle)
Sm-Motiv	engl.: RNA splicing motif
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TATA-BP	TATA-Box Bindeprotein
TGA	Stoppkodon
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UPS	Ubiquitin Proteasom System
UV	Ultraviolett
Q22	22 Aminosäuren Glutamin
Q79	79 Aminosäuren Glutamin
Q	Glutamin
V	Volt
vGLUT	Antikörper gegen den vesikulären Glutamattransporter

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
x	-fach
Xrn1	5'-Exoribonuklease 1
ZNS	Zentralnervensystem
5'-3'	Leserichtung auf der DNA oder RNA
5'-CAP	7-Methylguanosintriphosphatgruppe der mRNA
40S	kleine ribosomale Untereinheit
60S	große ribosomale Untereinheit
80S	funktionsfähiges Ribosom

7 Literaturverzeichnis

Aguiar J, Fernandez J, Aguilar A, Mendozaa Y, Vazquez M, Su´arez J, Berlanga J, Cruz S, Guillen G, Herrera L, Velazquez L, Santos N, Merino N (2006). Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice. *Neurosci Lett.* 392(3):202-206.

Albrecht M, Golatta M, Wu U, Ilnert and Lengauer T (2004a). Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *Eur J Biochem.* 271(15):3155-3170.

Albrecht M, Lengauer T (2004b). Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochem and Biophys Res Commun.* 316(1):129-138.

Anderson P, Kedersha N (2006). RNA granules. *J Cell Biol.* 172(6):803-808.

Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Lührmann R (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA.* 11(5):717-727.

Armstrong J, Bonaventura I, Rojo A, Gonzalez G, Corral J, Nadal N, Volpini V, Ferrer I (2005). Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) with white matter involvement. *Neurosci Lett.* 381(3):247-251.

Babovic-Vuksanovic D, Snow K, Patterson MC, Michels VV (1998). Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA 2) in an infant with extreme CAG repeat expansion. *Am J Med Genet.* 79(5):383-387.

Bertani G (1951). Studies on lysogeny. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 62(3):293-300.

Bhalla K, Phillips HA, Crawford J, McKenzie OL, Mulley JC, Eyre H, Gardner AE, Kremmidiotis G, Callen DF (2004). The de novo chromosome 16 translocations of two patients with abnormal phenotypes (mental retardation and epilepsy) disrupt the A2BP1 gene. *J Hum Genet.* 49(6):308-311.

Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006). Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress. *Cell.* 125(6):1111-1124.

Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, Kindler S (2004). Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J.* 384(2):239-246.

Bürk K, Abele M, Fetter M, Dichgans J, Skalej M, Laccone F, Didierjean O, Brice A, Klockgether T (1996). Autosomal dominant cerebellar ataxia type I clinical features and MRI in families with SCA1, SCA2 and SCA3. *Brain.* 119(5):1497-1505.

Bürk K, Globas C, Bösch S, Gräber S, Abele M, Brice A, Dichgans J, Daum I, Klockgether T (1999). Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Brain*. 122(4):769-777.

Buhmann C, Bussopulos A, Oechsner M (2003). Dopaminergic response in parkinsonian phenotype of Machado-Joseph disease. *Mov Disord*. 18(2):219-221.

Buselmaier W, Tariverdian G (2004) *Humangenetik*. 3. Auflage, Springer-Verlag Heidelberg, S. 226-227.

Cancel G, Dürr A, Didierjean O, Imbert G, Bürk K, Lezin A, Belal S, Benomar A, Abada-Bendib M, Vial C, Guimarães J, Chneiweiss H, Stevanin G, Yvert G, Abbas N, Saudou F, Lebre AS, Yahyaoui M, Hentati F, Vernant JC, Klockgether T, Mandel JL, Agid Y, Brice A (1997). Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: a study of 32 families. *Hum Mol Genet*. 6(5):709-715.

Chen DH, Brkanac Z, Verlinde CL, Tan XJ, Bylenok L, Nochlin D, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Fernandez M, Cimino PJ, Bird TD, Raskind WH (2003). Missense mutations in the regulatory domain of PKC gamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet*. 72(4):839-849.

Chen P, Ma M, Shang H, Su D, Zhang S, Yang Y (2009). Copy number variation of trinucleotide repeat in dynamic mutation sites of autosomal dominant cerebellar ataxias related genes. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi = Chinese Journal of medical genetics* 26(6):626-633.

Choudhry S, Mukerji M, Srivastava AK, Jain S, Brahmachari SK (2001). CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms. *Hum Mol Genet*. 10(21):2437-2446.

Ciosk R, DePalma M, Priess JR (2004). ATX-2, the *C. elegans* ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline. *Development*. 131(19):4831-4841.

Clemens MJ, Bushell M, Jeffrey IW, Pain VM, Morley SJ (2000). Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ*. 7(7):603-615.

Coller JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R (2001). The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA*. 7(12):1717-1727.

Cougot N, Babajko S, Séraphin B (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol*. 165(1):31-40.

Cummings CJ, Sun Y, Opal P, Antalffy B, Mestril R, Orr HT, Dillmann WH, Zoghbi HY (2001). Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet*. 10(14):1511-1518.

Cummings CJ, Reinstein E, Sun Y, Antalffy B, Jiang Y, Ciechanover A, Orr HT, Beaudet AL, Zoghbi HY (1999). Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron*. 24(4):879-892.

Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B, DeFranco DB, Orr HT, Zoghbi HY (1998). Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet*. 19(2):148-154.

David G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, Benomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel JL, Brice A (1997). Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet*. 17(1):65-70.

Dueñas AM, Goold R, Giunti P (2006). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*. 129(6):1357-1370.

Evert BO, Wullner U, Klockgether T (2000). Cell death in polyglutamine diseases. *Cell Tissue Res*. 301(1):189-204.

Everett CM, Wood NW (2004). Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain*. 127(11):2385-2405.

Figueroa KP, Pulst SM (2003). Identification and expression of the gene for human ataxin-2-related protein on chromosome 16. *Exp Neurol*. 184(2):669-678.

Filla A, De Michele G, Banfi S, Santoro L, Perretti A, Cavalcanti F, Pianese L, Castaldo I, Barbieri F, Campanella G (1995). Has spinocerebellar ataxia type 2 a distinct phenotype? Genetic and clinical study of an Italian family. *Neurology*. 45(4):793-796.

Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM (2004). Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med*. 10(10):1055-1063.

Fuller-Pace FV (2006). SURVEY AND SUMMARY: DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res*. 34(15):4206-4215.

Furtado S, Farrer M, Tsuboi Y, Klimek ML, de la Fuente-Fernández R, Hussey J, Lockhart P, Calne DB, Suchowersky O, Stoessel AJ, Wszolek ZK (2002). SCA-2 presenting as parkinsonism in an Alberta family: clinical, genetic, and PET findings. *Neurology*. 59(10):1625-1627.

Geschwind DH, Perlman S, Figueroa CP, Treiman LJ, Pulst SM (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.

Giuliano P, de Cristofaro T, Affaitati A, Pizzulo GM, Feliciello A, Criscuolo C, De Michele G, Filla A, Avvedimento EV, Varrone S (2003). DNA damage induced by polyglutamine-expanded proteins. *Hum Mol Genet.* 12(18):2301-2309.

Giuliano M, Lauricella M, Calvaruso G, Carabillo M, Emanuele S, Vento R, Tesoriere G (1999). The Apoptotic Effects and Synergistic Interaction of Sodium Butyrate and MG132 in Human Retinoblastoma Y79 Cells. *Cancer Res.* 59(21):5586-5595.

Giunti P, Sabbadini G, Sweeney MG, Davis MB, Veneziano L, Mantuano E, Federico A, Plasmati R, Frontali M, Wood NW (1998). The role of the SCA2 trinucleotide repeat expansion in 89 autosomal dominant cerebellar ataxia families. Frequency, clinical and genetic correlates. *Brain.* 121(3):459-467.

Gonatas NK, Stieber A, Gonatas JO (2006). Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *J Neurol Sci.* 246(1-2):21-30.

Gorgoni B, Gray NK (2004). The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 3(2):125-141.

Gunawardena S, Goldstein LS (2005). Polyglutamine diseases and transport problems: deadly traffic jams on neuronal highways. *Arch Neurol.* 62(1):46-51.

Gwinn-Hardy K, Chen JY, Liu HC, Boss M, Seltzer W, Adam A, Singleton A, Koroshetz W, Waters C, Hardy J, Farrer M (2000). Spinocerebellar ataxia type 2 with parkinsonism in ethnic Chinese. *Neurology.* 55(6):800-805.

Ham J, Eilers A, Whitfield J, Neame SJ, Shah B (2000). c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 60(8):1015-1021.

Harding AE (1982). The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth'. *Brain.* 105(1):1-28.

He W, Parker R (2000). Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Curr Opin Cell Biol.* 12(3):346-350.

Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407(6805):770-776.

Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth RG, Sherr M, Sumner AJ, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Viera-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA, Margolis RL (1999). Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet.* 23(4):391-392.

Hughes, A.C., Errington, R., Fricker-Gates, R. and Jones, L (2004). Endophilin A3 forms filamentous structures that colocalise with microtubules but not with actin filaments. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 128(2):182-192.

Huynh D.P., Maalouf M., Silva A.J., Schweizer F.E., Pulst S.M.(2009) Dissociated fear and spatial learning in mice with deficiency of ataxin-2. PLoS ONE 4(7):6235-6235.

Huynh DP, Nguyen DT, Pulst-Korenberg JB, Brice A, Pulst SM (2007). Parkin is an E3 ubiquitin-ligase for normal and mutant ataxin-2 and prevents ataxin-2 induced cell death. *Exp Neurol.* 203(2):531-541.

Huynh DP, Yang HT, Vakharia H, Nguyen D, Pulst SM (2003). Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum Mol Genet.* 12(13):1485-1496.

Huynh DP, Figueroa K, Hoang N, Pulst SM (2000a). Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat Genet.* 26(1):44-50.

Huynh DP, Scoles DR, Ho TH, Del Bigio MR, Pulst SM (2000b). Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells. *Ann. Neurol.* 48(5):737-744.

Huynh DP, Del Bigio MR, Ho DH, Pulst SM (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.

Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, Stevanin G, Dürr A, Zühlke C, Bürk K, Clark HB, Brice A, Rothstein JD, Schut LJ, Day JW, Ranum LP (2006). Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet.* 38(2):184-190.

Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier JM, Weber C, Mandel JL, Cancel G, Abbas N, Dürr A, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y, Brice A (1996). Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet.* 14(3):285-291.

Infante J, Berciano J, Volpini V, Corral J, Polo JM, Pascual J, Combarros O (2004). Spinocerebellar ataxia type 2 with Levodopa-responsive parkinsonism culminating in motor neuron disease. *Mov Disord.* 19(7):848-852.

Infante J, Combarros O, Volpini V, Corral J, Llorca J, Berciano J (2005). Autosomal dominant cerebellar ataxias in Spain: molecular and clinical correlations, prevalence estimation and survival analysis. *Acta Neurol Scand.* 111(6):391-399.

Jackson RJ, Standart N (2007). Review: How do MikroRNAs Regulate Gene Expression? *Sci STKE.* 367(re1):1-13.

Jankowsky E, Bowers H (2006). Remodeling of ribonucleoprotein complexes with DExH/D RNA helicases. *Nucleic Acids Res.* 34(15):4181-4188.

Jeang KT, Yedavalli V (2006). SURVEY AND SUMMARY. Role of RNA helicase in HIV-1 replication. *Nucleic Acids Res.* 34(15):4198-4205.

Jin Y, Suzuki H, Maegawa S, Endo H, Sugano S, Hashimoto K, Yasuda K, Inoue K (2003). A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J.* 22(4):905-912.

Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, 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.

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet.* 8(3):221-228.

Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol.* 169(6):871-884.

Kiehl TR, Nechiporuk A, Figueroa KP, Keating MT, Huynh DP, Pulst SM (2006). Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 339(1):17-24.

Kiehl TR, Shibata H, Vo T, Huynh DP, Pulst SM (2001). Identification and expression of a mouse ortholog of A2BP1. *Mamm Genome.* 12(8):595-601.

Kim E, Naisbitt S, Hsueh YP, Rao A, Rothschild A, Craig AM, Sheng M (1997). GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol.* 136(3):669-678.

Kindler S, Wang H, Richter D, Tiedge H (2005). RNA Transport and Local Control of Translation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:223-245.

Klockgether T, Lüdtke R, Kramer B, Abele M, Bürk K, Schöls L, Riess O, Laccone F, Boesch S, Lopes-Cendes I, Brice A, Inzelberg R, Zilber N, Dichgans J (1998). The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain.* 121(4):589-600.

Koeppen AH (2005). The pathogenesis of spinocerebellar ataxia. *Cerebellum.* 4(1):62-73.

Koeppen AH (1991). The Purkinje cell and its afferents in human hereditary ataxia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 50(4):505-514.

Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T (1994). Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet.* 6(1):9-13.

Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW, Ranum LP (1999). An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8) *Nat Genet.* 21(4):379-384.

Koyano S, Uchihara T, Fujigasaki H, Nakamura A, Yagishita S, Iwabuchi K (1999). Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study. *Neurosci Lett.* 273(2):117-120.

Kozak M (1990). Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci.* 87(21):8301-8305.

Kozlov G, Trempe JF, Khaleghpour K, Kahvejian A, Ekiel I, Gehring K (2001). Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci.* 98(8):4409-4413.

La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.* 352(6330):77-79.

Lastres-Becker I, Rüb U, Auburger G. 2008 Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum.* 7(2):115-24.

Lee WY, Jin DK, Oh MR, Lee JE, Song SM, Lee EA, Kim GM, Chung JS, Lee KH (2003). Frequency analysis and clinical characterization of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6 and 7 in Korean patients. *Arch Neurol.* 60(6):858-863.

Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabó G, Rual JF, Fisk CJ, Li N, Smolyar A, Hill DE, Barabási AL, Vidal M, Zoghbi HY (2006). A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell.* 125(4):801-814.

Linder P (2006). Dead-box proteins: a family affair-active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res.* 34(15):4168-4180.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86(1):147-157.

Löffler G, Petrides PE (Hrsg.) (2003). *Biochemie und Pathobiochemie.* Petrides PE (Hrsg.) 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 213ff.

Lu CS, Wu Chou YH, Yen TC, Tsai CH, Chen RS, Chang HC (2002). Dopa-responsive parkinsonism phenotype of spinocerebellar ataxia type 2. *Mov Disord.* 17(5):1046-1051.

Maine EM, Hansen D, Springer D, Vought VE (2004). *Caenorhabditis elegans atx-2 Promotes Germline Proliferation and the Oocyte Fate.* *Genetics.* 168(2):817-830.

Mandel M, Higa A (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53(1):159-162.

Mangus DA, Evans MC, Jacobson A (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* 4(7):1-14.

Manto MU (2005). The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum*. 4(1):2-6.

Martin CL, Duvall JA, Ilkin Y, Simon JS, Arreaza MG, Wilkes K, Alvarez-Retuerto A, Whichello A, Powell CM, Rao K, Cook E, Geschwind DH (2007). Cytogenetic and molecular characterization of A2BP1/FOX1 as a candidate gene for autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 144B(7):869-876.

Meyer S, Temme C, Wahle E (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 39(4):197-216.

Mizuno N, Jao CC, Langen R, Steven AC (2010). Multiple modes of endophilin-mediated conversion of lipid vesicles into coated tubes: implications for synaptic endocytosis. *J Biol Chem*. First Published on May 18, 2010 as a Manuscript M110.143776, p. 1-15.

Nakahata S, Kawamoto S (2005). Tissue-dependent isoforms of mammalian Fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities. *Nucleic Acids Res*. 33(7):2078-2089.

Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I (2001). SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet*. 10(14):1441-1448.

Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, Yaspo ML, Lehrach H, Krobitsch 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.

Okouchi M, Ekshyyan O, Maracine M, Aw TY (2007). Neuronal apoptosis in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*. 9(8):1059-1096.

Orozco Diaz G, Nodarse Fleites A, Cordovés Sagaz R, Auburger G (1990). Autosomal dominant cerebellar ataxia: clinical analysis of 263 patients from a homogeneous population in Holguín, Cuba. *Neurology*. 40(9):1369-1375.

Orozco G, Estrada R, Perry TL, Araña J, Fernandez R, Gonzalez-Quevedo A, Galarraga J, Hansen S (1989). Dominantly inherited olivopontocerebellar atrophy from eastern Cuba. Clinical, neuropathological, and biochemical findings. *J Neurol Sci*. 93(1):37-50.

Orr HT (2001). Beyond the Qs in the polyglutamine diseases. *Genes Dev*. 15(8):925-932.

Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ Jr, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP, Zoghbi HY (1993). Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet*. 4(3):221-226.

Pang JT, Giunti P, Chamberlain S, An SF, Vitaliani R, Scaravilli T, Martinian L, Wood NW, Scaravilli F, Ansorge O (2002). Neuronal intranuclear inclusions in SCA2: a genetic, morphological and immunohistochemical study of two cases. *Brain*. 125(Pt 3):656-663.

Parker R, Sheth U (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*. 25(5):635-646.

Payami H, Nutt J, Gancher S, Bird T, McNeal MG, Seltzer WK, Hussey J, Lockhart P, Gwinn-Hardy K, Singleton AA, Singleton AB, Hardy J, Farrer M (2003). SCA2 may present as levodopa-responsive parkinsonism. *Mov Disord*. 18(4):425-429.

Probst-Cousin S, Acker T, Epplen JT, Bergmann M, Plate KH, Neundörfer B, Heuss D (2004). Spinocerebellar ataxia type 2 with glial cell cytoplasmic inclusions. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*. 75(3):503-505.

Proud CG (2007). Review Article. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J*. 403(2):217-234.

Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau GA, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C, Sahba S (1996). Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet*. 14(3):269-276.

Ragothaman M, Sarangmath N, Chaudhary S, Khare V, Mittal U, Sharma S, Komatireddy S, Chakrabarti S, Mukerji M, Juyal RC, Thelma BK, Muthane UB (2004). Complex phenotypes in an Indian family with homozygous SCA2 mutations. *Ann Neurol*. 55(1):130-133.

Ralser M, Albrecht M, Nonhoff U, Lengauer T, Lehrach H, Krobitsch S (2005a). An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2. *J Mol Biol*. 346(1):203-214.

Ralser M, Nonhoff U, Albrecht M, Lengauer T, Wanker EE, Lehrach H, Krobitsch S (2005b). Ataxin-2 and huntingtin interact with endophilin-A complexes to function in plastin-associated pathways. *Hum Mol Genet*. 14(19):2893-2909.

Riess O, Laccone FA, Gispert S, Schols L, Zuhlke C, Vieira-Saecker AM, Herlt S, Wessel K, Epplen JT, Weber BH, Kreuz F, Chahrokh-Zadeh S, Meindl A, Lunkes A, Aguiar J, Macek M, Jr., Krebsova A, Macek M, Sr., Burk K, Tinschert S, Schreyer I, Pulst SM, Auburger G (1997). SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients. *Neurogenetics* 1(1):59-64.

Riess O, Schmidt T, Schöls L (2001). Autosomal dominant vererbte spinocerebellare Ataxien. *Klinik, Genetik und Pathogenese*. *Deutsches Ärzteblatt*. 98(23):1546-1558.

Riley BE, Orr HT (2006). Review: Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev*. 20(16):2183-2192.

Rincón E, Santos T, Avila-Flores A, Albar JP, Lalioti V, Lei C, Hong W, Merida I (2007). Proteomic identification of sorting nexin 27 as a diacylglycerol kinase ξ -associated protein: new diacylglycerol kinase roles in endocytic recycling. *Mol Cell Proteomics*. 6(6):1073-1087.

Ross CA (2004). Huntington's disease: new paths to pathogenesis. *Cell*. 118(1):4-7.

Rüb U, Gierga K, Brunt ER, de Vos RA, Bauer M, Schöls L, Bürk K, Auburger G, Bohl J, Schultz C, Vuksic M, Burbach GJ, Braak H, Deller T (2005). Spinocerebellar ataxias types 2 and 3: degeneration of the pre-cerebellar nuclei isolates the three phylogenetically defined regions of the cerebellum. *J Neural Transm*. 112(11):1523-1545.

Rüb U, Burk K, Schols L, Brunt ER, de Vos RA, Diaz GO, Gierga K, Ghebremedhin E, Schultz C, Del Turco D, Mittelbronn M, Auburger G, Deller T, Braak H (2004). Damage to the reticulotegmental nucleus of the pons in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3. *Neurology*. 63(7):1258-1263.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74:5463-5467.

Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, Sasaki H, Wakisaka A, Tashiro K, Ishida Y, Ikeuchi T, Koide R, Saito M, Sato A, Tanaka T, Hanyu S, Takiyama Y, Nishizawa M, Shimizu N, Nomura Y, Segawa M, Iwabuchi K, Eguchi I, Tanaka H, Takahashi H, Tsuji S (1996). Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nat Genet*. 14(3):277-284.

Satterfield TF, Jackson SM, Pallanck LJ (2002). A *Drosophila* homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation. *Genetics*. 162(4):1687-1702.

Satterfield TF, Pallanck LJ (2006). Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Human Molecular Genetics*. 15(16):2523-2532.

Sheng M, Kim E (2000). The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci*. 113(11):1851-1856.

Sheth U, Parker R (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*. 300(5620):805-808.

Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE (1997). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*. 90(3):549-558.

Schmidt T, Lindenberg KS, Krebs A, Schols L, Laccone F, Herms J, Rechsteiner M, Riess O, Landwehrmeyer GB (2002). Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol.* 51(3):302-310.

Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 3(5):291-304.

Searfoss A, Dever TE, Wickner R (2001). Linking the 3' poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eukaryotic translation initiation factor 5b (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. *Mol Cell Biol.* 21(15):4900-4908.

Shibata H, Huynh DP, Pulst SM (2000). A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. *Hum Mol Genet.* 9(9):1303-1313.

Sobczak K, Krzyzosiak WJ (2005). CAG repeats containing CAA interruptions form branched hairpin structures in spinocerebellar ataxia type 2 transcripts. *J Biol Chem.* 280(5):3898-3910.

Sobczak K, Krzyzosiak WJ (2004). Patterns of CAG repeat interruptions in SCA1 and SCA2 genes in relation to repeat instability. *Hum Mutat.* 24(3):236-247.

Spector DL (2006). SnapShot: Cellular Bodies. *Cell.* 127(5):1070-1071.

Svitkin YV, Pause A, Haghghat A, Pyronnet S, Witherell G, Belsham GJ, Sonenberg N (2001). The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA.* 7(3):382-394.

Swisher KD, Parker R (2010). Localization to, and Effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on Stress Granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 5(4):10006.

Taroni F, DiDonato S (2004). Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci.* 5(8):641-655.

Tarun SZ Jr, Sachs AB (1995). A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev.* 9(23):2997-3007.

Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA.* 11(4):371-382.

Timchenko LT, Caskey CT (1996). Trinucleotide repeat disorders in humans: discussions of mechanisms and medical issues. *FASEB J.* 10(14):1589-1597.

Velázquez-Pérez L, Rodríguez-Labrada R, Canales-Ochoa N, Sanchez-Cruz G, Fernandez-Ruiz J, Montero JM, Aguilera-Rodríguez R, Diaz R, Almaguer-Mederos LE, Truitz AP (2010). Progression markers of Spinocerebellar ataxia 2. A twenty years neurophysiological follow up study. *J Neurol Sci.* 290(1-2):22-26.

Velázquez-Pérez L, Seifried C, Santos-Falcón N, Abele M, Ziemann U, Almaguer LE, Martínez-Góngora E, Sánchez-Cruz G, Canales N, Pérez-González R, Velázquez-Manresa M, Viebahn B, von Stuckrad-Barre S, Fetter M, Klockgether T, Auburger G (2004). Saccade velocity is controlled by polyglutamine size in spinocerebellar ataxia 2. *Ann Neurol.* 56(3):444-447.

van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, Maat-Kievit JA, Dooijes D, Notermans NC, Lindhout D, Knoers NV, Kremer HP (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology.* 58(5):702-708.

van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, Krieger E, van de Graaf R, de Koning I, Maat-Kievit A, Leegwater P, Dooijes D, Oostra BA, Heutink P (2003). A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet.* 72(1):191-199.

Waters MF, Minassian NA, Stevanin G, Figueroa KP, Bannister JP, Nolte D, Mock AF, Evidente VG, Fee DB, Muller U, Durr A, Brice A, Papazian DM, Pulst SM (2006). Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet.* 38(4):447-451.

Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB (1998). Circulation of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell.* 2:135-140.

Westermarck J, Weiss C, Saffrich R, Kast J, Musti AM, Wessely M, Ansorge W, Séraphin B, Wilm M, Valdez BC, Bohmann D (2002). The DEXD/ H-box RNA helicase RHII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *Embo Journal.* 21(3):451-460.

Weston A, Sommerville J (2006). SURVEY AND SUMMARY. Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucleic Acids Research.* 34(10):3082-3094.

Wiedemeyer R, Westermann F, Wittke I, Nowock J, Schwab M (2003). Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene.* 22:401-411.

Yomono HS, Kurisaki H, Hebisawa A, Sakiyama Y, Saito Y, Murayama S (2010). Autopsy case of SCA2 with Parkinsonian phenotype. *Rinsho Shinkeigaku.* 50(3):156-162.

Zander C, Takahashi J, El Hachimi KH, Fujigasaki H, Albanese V, Lebre AS, Stevanin G, Duyckaerts C, Brice A (2001). Similarities between spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) cell models and human brain: proteins recruited in inclusions and activation of caspase-3. *Hum Mol Genetics.* 10(22):2569-2579.

Zhang Y, Leavitt BR, van Raamsdonk JM, Dragatsis I, Goldowitz D, MacDonald ME, Hayden MR, Friedlander RM (2006). Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *The EMBO Journal*. 25:5896-5906.

Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet*. 15(1):62-69.

Zoghbi HY, Orr HT (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*. 23:217-247.

8 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Gal für die Ermöglichung dieser Arbeit im Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum in Hamburg bedanken. Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Kindler für die Vergabe der Doktorarbeit, die wissenschaftliche Anleitung in seinem Labor und die kompetente fachliche Betreuung bedanken. Bei Frau Dr. Monika Rehbein und Herrn Sönke Harder möchte ich mich für die wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Für die Einarbeitung in verschiedene Labormethoden und die angenehme Atmosphäre im Labor möchte ich mich bei Hans-Hinrich Hönck, Janin Schütt, Nelly Schröder, Gwen Kollmorgen, Katrin Falley, Jacob Neumann und Claudia Schob bedanken. Darüber hinaus möchte ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik danken, mit denen jederzeit fachliche Gespräche möglich waren. Meinen Eltern und Freunden danke ich für ihre liebevolle Unterstützung und Ermutigung auf diesem Weg.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese 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 Angabe (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.

Johanna-Clarissa Alt