

Spezifische Protein-Interaktoren von Ataxin-2

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Florian Eich
aus Frankfurt am Main

Frankfurt (2008)
(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. Müller

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Zimmermann

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Auburger

Datum der Disputation:

Ergebnisse dieser Arbeit wurden vorab bei folgenden Gelegenheiten präsentiert:

- 2005 16th World Congress on Parkinson Disease & related Disorders in Berlin
Eich F, Nowock J, Auburger G: Protein Interaction of „Similar to golgin-like“ and Ataxin-2
- 2007 III. Meeting on the Molecular Mechanisms of Neurodegeneration in Mailand/Italien
Eich F, Nowock J, Auburger G: Ataxin-2 interacts with „Similar to golgin-like“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Polyglutaminerkrankungen	8
1.2. Die Krankheit SCA2	11
1.3. Das SCA2 Gen	12
1.4. Die Struktur von Ataxin-2	12
1.5. Domänen und Interaktionen von Ataxin-2 im Zusammenhang mit dem RNA-Metabolismus	13
1.6. Interaktoren in Verbindung mit der Endozytose	14
1.7. Ataxin-2 und das Zytoskelett	15
1.8. Parkin als Interaktor	15
1.9. Intrazelluläre Lokalisation	15
1.10. Pbp1, das <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ortholog zu Ataxin-2	16
1.11. Ataxin-2 in <i>Caenorhabditis elegans</i> , Catx2	16
1.12. Ataxin-2 in <i>Drosophila melanogaster</i>	16
2. Zielsetzung der Arbeit	17
3. Material	18
3.1. In dieser Arbeit verwendete Zelllinien	18
3.2. Verwendete Zellkulturmaterialien	18
3.3. Antikörper	19
3.4. Oligonukleotide	21
3.5. DNA-Marker	23
3.6. Proteingrößen-Marker	23
3.7. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	23
3.8. Verwendete Enzyme	24
3.9. Verwendete Laborgeräte	24
3.10. Lösungen und Puffer	25
3.11. Für diese Arbeit verwendete Software	26
4. Methoden	27
4.1. Hefe-2-Hybrid System (<i>Yeast-two-hybrid</i>)	27
4.1.1. Transformation von MaV203	27
4.1.2. β -Galaktosidase Filter Test	28
4.1.3. Flüssig β -Galaktosidase Test	28
4.2. Arbeiten mit Nukleinsäuren	29
4.2.1. Klonierungen	29

4.2.1.1.	Klonierung mittels PCR-Extension	29
4.2.1.2.	Klonierung mittels Adapterinsertion	30
4.2.2.	Plasmidpräparation aus 2 ml Kulturen	31
4.2.3.	Plasmidpräparation aus 250 ml Kulturen	32
4.2.4.	DNA-Sequenzierung	32
4.2.5.	Restriktionsverdau	34
4.2.6.	Ligation	34
4.2.7.	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation	35
4.2.8.	PCR	35
4.2.9.	RACE-PCR	36
4.3.	Zellbiologische Arbeiten/Zellkultur	37
4.3.1.	Subkultivierung adhärent wachsender Zellen	37
4.3.2.	Bestimmung der Zellzahl	37
4.3.3.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
4.3.4.	Transiente Transfektion	38
4.3.4.1.	Liposomale Transfektion	38
4.3.4.1.1.	Transfektion mit Metafectene/Pro	38
4.3.4.1.2.	Transfektion mit Lipofectamine 2000	39
4.3.4.1.3.	Transfektion mit TransIT-COS Transfektion Kit	39
4.3.4.2.	Elektroporation	39
4.3.5.	Immunzytochemie	40
4.3.6.	Grundsätzliches zur Fluoreszenzmikroskopie	40
4.3.7.	VSV-G Transport Experimente	42
4.3.8.	FRAP	42
4.3.9.	EGF Aufnahme-Experimente	43
4.4.	Proteinbiochemie	43
4.4.1.	Expression von GST-Fusionsproteinen	43
4.4.2.	GST- <i>Pulldown</i> Experimente	45
4.4.3.	Herstellung von Zellextrakten	46
4.4.4.	Differentielle Fraktionierung	46
4.4.5.	Bestimmung des Proteingehaltes von Extrakten	47
4.4.6.	Diskontinuierliche SDS-PAGE	47
4.4.7.	<i>Western blot</i>	48
4.4.8.	Immundetektion	49
4.4.9.	ELISA (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)	49
4.4.10.	Koimmunpräzipitation	50
4.4.11.	2D-Gelelektrophorese	51

4.4.12. Silberfärbung von Proteinen	51
4.5. Transkriptomanalyse	52
4.5.1. RNA-Extraktion	52
4.5.2. DNase I Behandlung der RNA-Proben	53
4.5.3. cDNA Synthese	53
4.5.4. Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR	54
4.6. Statistik	51
5. Ergebnisse	55
5.1. Initiale Hefe-2-Hybrid Untersuchung zur Identifikation von Ataxin-2-Interaktoren	55
5.2. Similar to golgin-like als Interaktor von Ataxin-2	57
5.2.1. Mutationsabhängige Interaktion von SIM mit Ataxin-2	57
5.2.2. Interaktionsdomänen auf Ataxin-2 und SIM	58
5.2.3. Expression von SIM-Fusionsproteinen	60
5.2.4. Kolokalisation von Ataxin-2 und SIM	60
5.2.5. GST- <i>Pulldown</i> von Ataxin-2 mit SIM	63
5.2.6. Koimmunpräzipitation mit rekombinanten Proteinen	64
5.2.7. Antikörper gegen SIM	65
5.2.7.1. Zwei anti-SIM Antikörper erkannten eine spezifische Bande	66
5.2.7.2. SIM-IR findet sich nur im Gehirn	67
5.2.8. Koimmunpräzipitation mit endogenen Proteinen	68
5.2.9. 5'-RACE zur Charakterisierung von SIM	70
5.2.10. 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie zur Charakterisierung von SIM	72
5.2.11. Untersuchungen zum VSV-G Transport unter Einfluss von SIM und Ataxin-2 Überexpression	73
5.3. TRAP als Interaktor von Ataxin-2	76
5.3.1. Hefe-2-Hybrid Analyse der Interaktion	76
5.3.2. Kolokalisation von TRAP und Ataxin-2	77
5.3.3. Antikörper gegen TRAP	78
5.3.3.1. Spezifität des TRAP-Antikörpers 8616	78
5.3.3.2. Anti-TRAP 8616 im Vergleich mit dem publizierten Antikörper	79
5.3.3.3. Expressionsmuster	80
5.4. Alpha-Actinin-1 als Interaktor von Ataxin-2	81
5.4.1. Ataxin-2 interagiert mit alpha-Actinin-1 im Hefe-2-Hybrid System	81
5.4.2. Kolokalisation von Ataxin-2 und alpha-Actinin-1	83
5.4.3. Koimmunpräzipitation mit rekombinanten Proteinen	84

5.4.4. Koimmunpräzipitation mit endogenen Proteinen	85
5.4.5. GST- <i>Pulldown</i> von Ataxin-2 mit Alpha-Actinin-1	87
5.4.5.1. Ataxin-2 Subdomänen zur Interaktion mit Alpha-Actinin-1	87
5.4.5.2. Subdomänen von Alpha-Actinin-1 zur Interaktion mit Ataxin-2	89
5.4.5.3. Einfluss der Polyglutaminexpansion auf die Bindung von Ataxin-2 mit Alpha-Actinin-1	90
5.4.6. Analyse der Stressfasern in Fibroblasten von SCA2-Patienten	91
5.4.7. FRAP Analyse der Alpha-Actinin-1 Dynamik	93
5.4.8. Experimente zur EGF-Rezeptor Internalisierung	95
5.4.9. Bindung von alpha-Actinin-1 mit weiteren Proteinen des Endozytoseapparates	101
5.4.9.1. Alpha-Actinin-1 bindet an c-Cbl und CIN-85	101
5.5. Subzelluläre Lokalisation von Ataxin-2	102
5.6. Untersuchungen zum Transkriptom der SCA2 KO-Maus mittels qrt-RT-PCR	103
6. Diskussion	106
7. Zusammenfassung	116
8. Ausblick	118
9. Verwendete Abkürzungen	120
10. Literaturverzeichnis	123
Anhang	
Lebenslauf	
Verzeichnis der akademischen Lehrer	
Danksagung	

Einleitung

1.1. Polyglutaminerkrankungen

Polyglutaminerkrankungen sind neurodegenerative, vererbare Krankheiten, die zur Gruppe der Trinukleotidexpansionserkrankungen gehören (Cummings and Zoghbi 2000). Die Expansion eines Basentriplets im krankheitsauslösenden Gen ist das charakteristische Merkmal dieser Krankheitsfamilie, die in zwei Klassen unterteilt wird. Klasse 1 beinhaltet die Krankheiten, bei denen die Expansion im kodierenden Bereich des Gens liegt, was bei den Polyglutaminkrankheiten der Fall ist. In Klasse 2 liegt die Expansion im nicht-kodierenden Bereich und bewirkt keine Veränderung der Proteinsequenz.

Zu den Polyglutaminerkrankungen sind derzeit neun Krankheiten zu zählen: Chorea Huntington (*Huntington's disease*, HD), die spinocerebellären Ataxien Typ 1 (SCA1), 2 (SCA2), 3 (SCA3/MJD), 6 (SCA6), 7 (SCA7) und 17 (SCA17), die Dentatorubrale Phallidoluysiane Atrophie (DRPLA) und die Spinale und Bulbäre Muskuläre Atrophie (SBMA) (Reddy and Housman 1997; Cummings and Zoghbi 2000; Margolis 2002; Stevanin, Durr et al. 2002; Michalik and Van Broeckhoven 2003; Schols, Bauer et al. 2004). In all diesen Krankheiten besteht die Expansion aus Wiederholungen des Basentriplets CAG, das für Glutamin kodiert. Die Länge der normalen Glutamin-Trakte und der Schwellenwert zur Manifestation der Krankheit variiert zwischen den einzelnen betroffenen Genen. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über unterschiedliche Längen und die Schwellenwerte.

Krankheit	Protein	Abkürzung	n PolyQ (Wt)	n PolyQ (Path)
Chorea Huntington	Huntingtin	HD	6-35	36-200
Spinocerebelläre Ataxie Typ 1	Ataxin-1	SCA1	6-39	40-82
Spinocerebelläre Ataxie Typ 2	Ataxin-2	SCA2	15-24	32-200
Spinocerebelläre Ataxie Typ 3	Ataxin-3	SCA3 (MJD)	16-36	61-84
Spinocerebelläre Ataxie Typ 6	CACNA1A	SCA6	4-20	20-29
Spinocerebelläre Ataxie Typ 7	Ataxin-7	SCA7	4-35	37-306
Spinocerebelläre Ataxie Typ 17	TATA-Box Bindeprotein	SCA17	25-42	47-63
Dentatorubrale Phallidoluysische Atrophie	Atrophin-1	DRPLA	7-34	49-88
Spinale und Bulbäre Muskuläre Atrophie	Androgen Rezeptor	SBMA	9-36	38-62

Tabelle 1: Übersicht der bekannten Polyglutaminkrankheiten nach Butler und Bates (Butler and Bates 2006)

Die Größe der Expansion beeinflusst zudem noch zwei weitere wichtige Faktoren: den Zeitpunkt des Krankheitsausbruches und die Schnelligkeit der Symptom-Progression. Die Expansionslänge korreliert negativ mit dem Krankheitsausbruch, so dass eine größere Expansion einen früheren Ausbruch bedingt, wohingegen die Progression positiv korreliert, so dass eine größere Expansion zu einem früheren Krankheitsausbruch mit schnellerem Fortschreiten der Krankheitssymptome führt (Trottier, Biancalana et al. 1994; Cummings and Zoghbi 2000).

Die genannten Polyglutaminerkrankungen gleichen sich in mehreren Merkmalen (Cummings and Zoghbi 2000). Alle sind durch progressive Neurodegeneration gekennzeichnet, die zu zunehmenden neuronalen Fehlfunktionen und schließlich zum Verlust von neuronalen Zellen führen. Die von der Neurodegeneration betroffenen Gehirnareale sind unterschiedlich verteilt (Abb. 1).

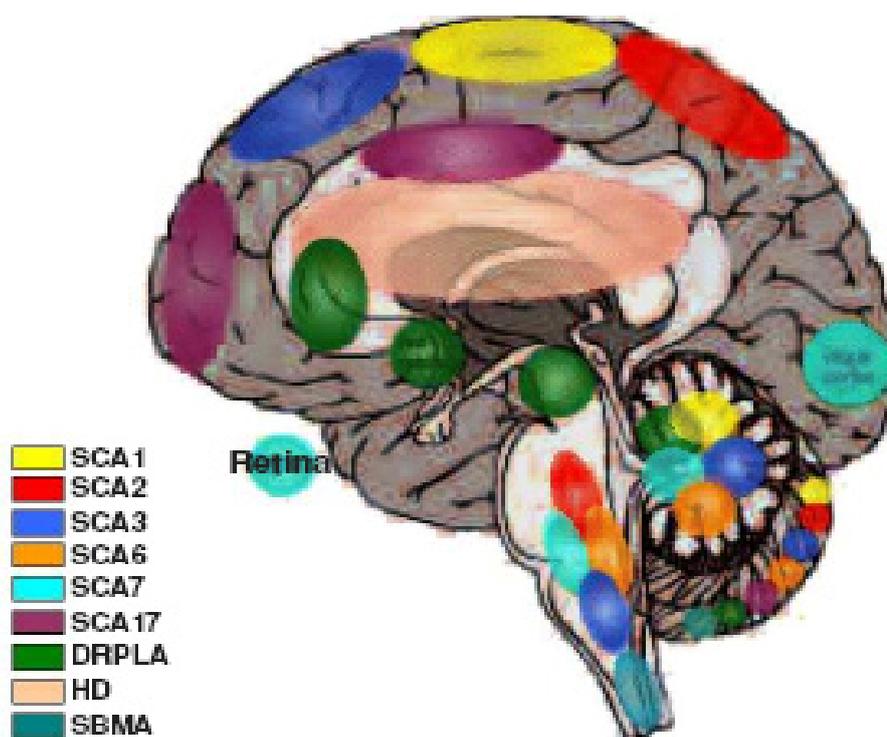


Abbildung 1: Schematische Darstellung der bei den bisher bekannten Polyglutaminkrankheiten vorwiegend betroffenen Hirnregionen (Truant, Raymond et al. 2006).

Beispielsweise kommt es bei HD zu einer Atrophie im Nucleus Caudatus und Putamen und einer Schicht-spezifischen Neurodegeneration des Neocortex, wohingegen bei SCA3/MJD Teile der Basalganglien, des Hirnstamms und Rückenmarks und Neurone im Inneren des Cerebellums degenerieren. Des Weiteren unterscheiden sich auch die betroffenen Zelltypen.

So sind SCA1, SCA2 und SCA6 durch den Verlust von Purkinje-Neuronen in der Rinde des Cerebellums gekennzeichnet, nicht jedoch SCA3/MJD (Truant, Raymond et al. 2006).

Auf der Proteinebene gibt es bis auf die Polyglutamin-Expansion keine Homologien zwischen den verschiedenen Krankheitsproteinen. Die Expression der Proteine ist mit Ausnahme von CACNA1A, dem SCA6 Krankheitsprotein, ubiquitär (Tabelle 1).

Die genauen biologischen Funktionen der Polyglutaminproteine konnten bisher noch nicht geklärt werden, es scheint aber Gemeinsamkeiten zwischen mehreren Polyglutaminproteinen zu geben.

Ein pathognomonisches Merkmal, das von vielen Polyglutaminerkrankungen geteilt wird, sind nukleäre Proteineinschlüsse oder zytosolische Proteinaggregate. Diese treten in degenerierten Neuronen der betroffenen Hirnareale auf und enthalten die expandierten Polyglutaminproteine (Cummings and Zoghbi 2000). Im Fall von SCA2 gibt es keine eindeutigen Befunde über nukleäre oder zytoplasmatische Einschlüsse mit einem Zusammenhang zur Pathogenese der Krankheit. In den Purkinje-Neuronen konnten bisher keine Einschlüsse gezeigt werden, wohingegen Neurone der Pons Einschlüsse zeigen (Koyano, Iwabuchi et al. 2002; Pang, Giunti et al. 2002), deren Häufigkeit im Normalkollektiv nicht ausreichend kontrolliert wurde.

Bisher kann trotz einer großen Anzahl von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen keine sichere Aussage über die Pathogenizität der Einschlüsse oder Aggregate gemacht werden.

Eine weitere Gemeinsamkeit mehrerer Polyglutaminproteine ist die Verbindung zu RNA-assoziierten Prozessen. Für Huntingtin, Ataxin-1, Ataxin-2 und Ataxin-7 konnten direkte oder indirekte Verbindungen zur RNA gezeigt werden.

Im Falle von Huntingtin konnte eine Beteiligung an der transkriptionalen Regulation durch die Interaktion mit dem CREB-bindenden Protein gezeigt werden (Steffan, Kazantsev et al. 2000), eine weitere Verbindung besteht zu BDNF („*brain derived neurotrophic factor*“), dessen Translation durch die Aktivität von Huntingtin reguliert wird (Bemelmans, Horellou et al. 1999; Perez-Navarro, Canudas et al. 2000; Zuccato, Ciammola et al. 2001; Cattaneo, Rigamonti et al. 2002). Ataxin-1 spielt eine Rolle in der Modulation der Transkription und der RNA-Prozessierung. Es kann direkt an RNA binden (Yue, Serra et al. 2001) und ist am nukleären Export beteiligt (Irwin, Vandelft et al. 2005). Ataxin-7 ist ein Bestandteil des STAGA-Komplexes, der ein transkriptioneller Ko-Aktivator-Komplex ist. Ataxin-7 scheint in diesem Komplex als molekulares Bindeglied zu fungieren (Chen, Peng et al. 2004; Helmlinger, Hardy et al. 2004). Ataxin-7 interagiert mit DNA-bindenden Aktivatoren und kann so spezifisch in die Regulation von Genen eingreifen.

Für Ataxin-2 konnte bisher keine direkte Bindung an RNA gezeigt werden, allerdings bildet Ataxin-2 einen Komplex mit drei RNA-bindenden Proteinen, PABP (*poly-A-binding-protein*) (Ralser, Albrecht et al. 2005; Satterfield and Pallanck 2006), DDX6 (*DEAD/H-box RNA helicase 6*) (Nonhoff, Ralser et al. 2007) und dem Protein A2BP1 (Shibata, Huynh et al. 2000).

Für sieben der neun genannten Polyglutaminproteine konnte eine Interaktion mit Histondeacetylasen gezeigt werden. Lediglich für CACNA1A und Ataxin-2 konnte bisher keine Interaktion dieser Art nachgewiesen werden (Butler and Bates 2006). Histondeacetylasen wirken als Repressoren der Transkription. Dies geschieht durch die Interaktion mit Ko-Repressor-Komplexen und einer daraus resultierenden Remodellierung von Chromatin (Hebbes, Thorne et al. 1988; Norton, Marvin et al. 1990; Lee, Hayes et al. 1993).

Für das Protein Huntingtin konnte über Interaktionsstudien ein Zusammenhang mit verschiedenen Transportvorgängen in der Zelle hergestellt werden. Huntingtin scheint am frühen Endosom und am ER Funktionen zu erfüllen (DiFiglia, Sapp et al. 1995; De Rooij, Dorsman et al. 1996; Pal, Severin et al. 2006). Des Weiteren wird eine Funktion von Huntingtin beim energieabhängigen Transport von endozytotischen, lysosomalen und synaptischen Vesikeln entlang der Mikrotubuli und eine Funktion bei der Internalisierung von EGFR (*epidermal growth factor receptor*) diskutiert (Block-Galarza, Chase et al. 1997; Liu, Deth et al. 1997; Velier, Kim et al. 1998; Song, Perides et al. 2002; Gunawardena, Her et al. 2003; Rao, Bradley et al. 2003; McMahon and Mills 2004; Wu 2004; Gunawardena and Goldstein 2005; Lievens, Rival et al. 2005; Ralser, Nonhoff et al. 2005; Rohrbough and Broadie 2005; Pal, Severin et al. 2006).

1.2. Die Krankheit SCA2

Die Spinocerebelläre Ataxie vom Typ 2, kurz SCA2, ist eine autosomal dominant vererbte neurodegenerative Krankheit und gehört zu den Polyglutaminerkrankungen. Weltweit werden 10-15% aller Ataxien als SCA2 diagnostiziert, allerdings unterliegt die Verbreitung regionalen Schwankungen (Moseley, Benzow et al. 1998).

Klinisch manifestiert die Krankheit größtenteils durch Atrophie des Cerebellum, Ataxie beim Stand, Gehen und der Koordination der Extremitäten. Des Weiteren zeigen sich Sprachstörungen (Dysarthrie) und die Unfähigkeit rasch aufeinander folgende Bewegungen zu wiederholen (Adiadochokinese). Beeinträchtigt ist auch die Augenbewegung, SCA2 Patienten zeigen verlangsamte Sakkaden und Störungen bei der willkürlichen und

unwillkürlichen Bewegung der Augen. Weitere Symptome sind Areflexie (verringerte oder gar fehlende Reflexe) und periphere Neuropathie, ein Levo-Dopa responsives Parkinson-Syndrom und Demenz (Koeppen 1991; Giunti, Sabbadini et al. 1998; Moseley, Benzow et al. 1998; Koeppen 2005). Die Degeneration der Purkinje-Neuronen spielt eine große Rolle für den Krankheitsverlauf, sie stellen die einzigen efferenten Fasern im Kleinhirn dar und sind gleichzeitig die einzigen Zellen des zentralen Nervensystems, die den GluR δ 2-Rezeptor exprimieren (Araki, Meguro et al. 1993). Dieser Rezeptor spielt eine essentielle Rolle bei der Funktion des Kleinhirns und steht mit vielen postsynaptischen Proteinen in Wechselwirkung (Hirano 2006). Fehlt er, kommt es zu Störungen der synaptischen Plastizität und der motorischen Kontrolle (Kashiwabuchi, Ikeda et al. 1995).

1.3. Das SCA2 Gen

Das Gen SCA2 wurde 1996 von drei unabhängigen Gruppen identifiziert und kloniert (Imbert, Saudou et al. 1996; Pulst, Nechiporuk et al. 1996; Sanpei, Takano et al. 1996). Es besteht aus 25 Exonen, umfasst eine genomische Sequenz von 130 kb (Sahba, Nechiporuk et al. 1998) und ist auf Chromosom 12q23-24.1 lokalisiert. Im 5'-Bereich des ersten Exons wird die Polyglutamin-Domäne kodiert, die in 90% aller normalen SCA2 Allele aus 22 Einheiten besteht, und normalerweise mit der DNA-Sequenz (CAG)₈CAA(CAG)₄CAA(CAG)₈ korreliert. Krankheitsauslösende Allele bestehen aus 33-200 CAGs, meist ohne Unterbrechung durch CAA-Triplets. Möglicherweise wirken sich die CAA-Triplets stabilisierend in der Vererbung aus (Choudhry, Mukerji et al. 2001). Eine Besonderheit tritt bei 32-34 CAGs auf, hier konnte eine reduzierte Penetranz beobachtet werden, so dass Menschen mit einer solchen Expansion nicht zwangsläufig erkranken.

Die Expression von SCA2 ist ubiquitär. Aus Transkriptionsstudien geht hervor, dass SCA2 im Gehirn verstärkt in Amygdala, Corpus Callosum, Nucleus Caudatus, Hippocampus, Thalamus, Substantia Nigra und den Purkinje-Neuronen des Cerebellums transkribiert wird (Imbert, Saudou et al. 1996; Pulst, Nechiporuk et al. 1996; Sanpei, Takano et al. 1996; Huynh, Del Bigio et al. 1999).

1.4. Struktur von Ataxin-2

Das Protein Ataxin-2 besteht aus 1312 Aminosäuren (AS) und hat eine rechnerische Masse von etwa 140 kDa (Imbert, Saudou et al. 1996; Pulst, Nechiporuk et al. 1996; Sanpei 1999). Bisher konnte Ataxin-2 keine physiologische Funktion zugewiesen werden.

Strukturell sind vier Domänen als Bestandteil von Ataxin-2 beschrieben (Abb. 2). Im N-terminalen Bereich des Proteins liegt die Polyglutaminregion umgeben von Prolin- und Serinreichen Sequenzen. Das gesamte Protein ist basisch, enthält jedoch einen sauren Bereich, der aus den Aminosäuren 254-475 besteht. In dieser Region liegen die konservierten LSm- (*like Sm*) und LSm-AD- (*like Sm associated domain*) Domänen. Die vierte Domäne ist ein PAM2 Motiv, ein Bindemotiv für Proteininteraktionen. PAM2 ist ein hochkonserviertes Motiv für die Interaktion mit PABC-Domänen enthaltenden Proteinen wie PABP, Paip1, Paip2 und RF3. Für PABP ist die Interaktion bereits dokumentiert (Kozlov, Trempe et al. 2001; Ralser, Albrecht et al. 2005; Satterfield and Pallanck 2006).

Außerdem finden sich innerhalb der LSm- und LSm-AD Domänen eine putative Caspase-3-Schnittstelle (AS 396-399), ein Clathrin-abhängiges trans-Golgi-Signal (AS 414-416) und ein Endoplasmatisches Retikulum-Ausgangssignal (AS 426-428) (Huynh, Figueroa et al. 2000).

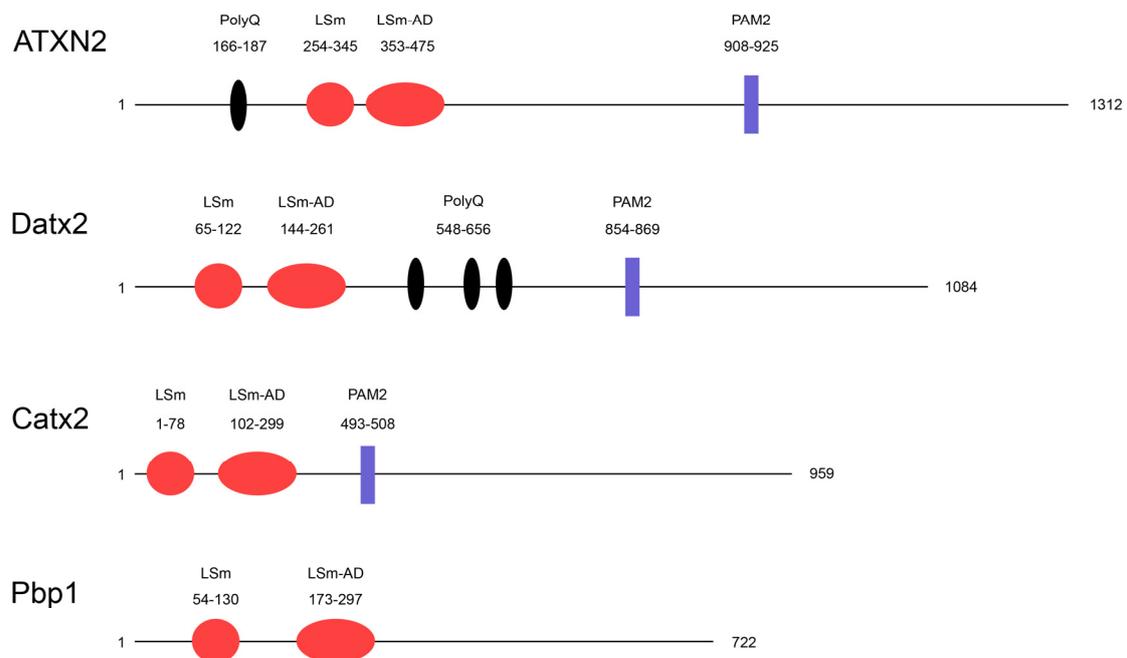


Abbildung 2: Struktur von Ataxin-2 und seinen Homologen in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae*. Polyglutaminbereiche sind mit schwarzen Ellipsen dargestellt, LSm- und LSm-AD-Domänen in rot. Das PAM2-Motiv ist blau dargestellt. Die Zahlen geben die Aminosäureposition der Strukturen und die Gesamtlänge der Proteine wieder.

1.5. Domänen und Interaktionen von Ataxin-2 im Zusammenhang mit dem RNA-Metabolismus

Aufgrund der vorhandenen LSm- und LSm-AD-Domänen und des PAM2-Motives wird ein Zusammenhang von Ataxin-2 mit dem zellulären RNA-Metabolismus vermutet.

Die LSM-Domäne setzt sich aus den Motiven SM1 und SM2, verbunden durch eine Linkersequenz, zusammen (Albrecht and Lengauer 2004). Alle bisher bekannten Sm/LSM Proteine beteiligen sich an RNA-Prozessierungsvorgängen. Dazu werden Komplexe aus sieben LSM-Proteinen gebildet. Die Zusammensetzung der Komplexe kann variieren, so dass ein Komplex von LSM 2-8 im Nukleus pre-mRNA spleißt, während ein Komplex aus LSM 1-7 im Zytosol am RNA-Abbau beteiligt ist (He and Parker 2000; Beggs 2005). Zusätzlich sind die LSM- und LSM-AD-Domäne für die Bindung der DEAD/H-box RNA-Helikase DDX6 zuständig. DDX6 ist ein Bestandteil von *p-bodies* und *stress-granules*, zwei Strukturen die im RNA-Metabolismus eine Rolle spielen. *P-bodies* sind in die RNA-Degradation involviert (Eulalio, Behm-Ansmant et al. 2007), wohingegen *stress-granules* während zellulärem Stress als RNA-Ablageort wirken.

Das PAM2-Motiv ist eine Bindestelle für PABP, das *poly-A-binding-protein*. PABP bindet über seine PABC (*poly-A-binding-protein C-terminal*)-Domäne an Transkriptionsfaktoren, welche das PAM2-Motiv enthalten, und führt sie an den poly(A)-Schwanz der RNA (Kozlov, De Crescenzo et al. 2004).

Weitere Hinweise liefert die Interaktion von Ataxin-2 und A2BP1 (*Ataxin-2 binding protein 1*), A2BP1 besitzt ein RNA-Erkennungsmotiv (Shibata, Huynh et al. 2000). Zusätzlich konnte eine Verbindung von Ataxin-2 mit Polyribosomen nachgewiesen werden (Satterfield and Pallanck 2006).

1.6. Interaktoren in Verbindung mit der Endozytose

Ataxin-2 interagiert mit zwei Mitgliedern der Endophilin-A Familie, Endophilin A1 und A3 (Raiser, Nonhoff et al. 2005; Lim, Hao et al. 2006). Die Endophiline beteiligen sich an verschiedenen Schritten der Endozytose. Sie können die Membrankrümmung über ihre BAR (BIN/Amphiphysin/Rvsp)-Domäne beeinflussen (Gallop, Jao et al. 2006). Zusätzlich dienen die Endophiline als Adaptoren für weitere Schlüsselproteine der Endozytose, Synaptojanin und Dynamin (Ringstad, Nemoto et al. 1997; Cestra, Castagnoli et al. 1999). Eine Beteiligung der Endophiline an der ER-Dynamik wird diskutiert, konnte aber bisher nicht eindeutig demonstriert werden (Modregger, Schmidt et al. 2003).

Außer der Beeinflussung der Membran bei der Endozytose sind die Endophiline auch an der Internalisation von Rezeptoren beteiligt, besonders gut wurde dies an EGFR (*epidermal growth factor receptor*) studiert. Dazu bilden sie einen Komplex mit Cbl (*casitas B-lineage lymphoma*), einer Ubiquitin-Ligase, dem Adaptorprotein CIN-85 (*Cbl-interacting protein of 85 kDa*) und der Kinase Src (*sarcoma viral oncogene homologue*) (Petrelli, Gilestro et al. 2002; Soubeyran, Kowanetz et al. 2002).

1.7. Ataxin-2 und das Zytoskelett

Ataxin-2 bildet einen Komplex mit T- und L-Plastin (Ralser, Nonhoff et al. 2005). In *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Expression von Ataxin-2, Endophilin A1/A3 oder Huntingtin zu toxischen Effekten in Δ sac6-Stämmen führt. Diesen Stämmen fehlt das SAC6-Gen, das für Fimbrin kodiert. Fimbrin bindet an Aktin und stabilisiert Aktinfilamente (Adams, Botstein et al. 1991; Karpova, Tatchell et al. 1995). Das Fimbrin der Hefe hat zwei funktionale Homologe bei den Mammalia, T- und L-Plastin. Diese sind zwar nur zu 40% homolog, können aber bei Expression in der Δ sac6-Hefe den toxischen Effekt der Überexpression von Ataxin-2, Endophilin A1/A3 und Huntingtin reduzieren. Ob hier ein Zusammenhang mit dem in *Drosophila melanogaster* beobachteten Phänotyp (Satterfield, Jackson et al. 2002) besteht, ist nicht geklärt.

1.8. Parkin als Interaktor

Parkin, eine E3-Ubiquitin-Ligase, deren Mutation zur autosomal rezessiven Parkinson-Krankheit führt, interagiert unabhängig von einer Polyglutaminexpansion mit dem N-Terminus von Ataxin-2 (Huynh, Nguyen et al. 2007). Es konnte eine Ubiquitinierung von Ataxin-2 durch Parkin gezeigt werden. Weiterhin wurde ein Einfluss von Parkin auf das steady-state-level von Ataxin-2, die Zytotoxizität und die abnormale Golgi-Morphologie in PC-12 Zellen mit regulierbarem Parkin-Expressionsspiegel dargestellt.

Diese Interaktion ist insbesondere im Hinblick auf klinische Beobachtungen interessant, bei denen Parkinsonismus in Verbindung mit SCA2 auftrat (Gwinn-Hardy, Chen et al. 2000; Shan, Soong et al. 2001; Payami, Nutt et al. 2003; Shan, Liu et al. 2004; Simon-Sanchez, Hanson et al. 2005).

1.9. Intrazelluläre Lokalisation

Für Ataxin-2 wurden unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen publiziert. Eine immunzytochemische Lokalisation am Golgi-Apparat in COS-1 und PC-12 Zellen und Hirngewebe der Ratte wurde zweimal beschrieben (Shibata, Huynh et al. 2000; Huynh, Yang et al. 2003). Hierbei wurden auch Expansions-abhängige Veränderungen der Golgi-Morphologie beobachtet. Eine weitere Studie weist Ataxin-2 zwar am Golgi-Apparat in PC-12 Zellen nach, kann aber in weiteren Zelllinien (COS-7, HeLa, SH-SY5Y) dies nicht zeigen. Insbesondere wird hier auch auf die unterschiedliche Immunreaktivität verschiedener Ataxin-2 Antikörper hingewiesen (Turnbull, Storey et al. 2004).

Ergänzend wurde mittels subzellulärer Fraktionierungen versucht die immunzytochemischen Ergebnisse zu bestätigen. Eine eindeutige Klärung für die unterschiedlichen Lokalisationen konnte bisher nicht gefunden werden.

1.10. Pbp1, das *Saccharomyces cerevisiae* Ortholog zu Ataxin-2

Pbp1 ist das Ataxin-2 Ortholog in *Saccharomyces cerevisiae*. Entdeckt wurde Pbp1 als Suppressor eines Wachstumsdefektes (Waldherr, Ragnini et al. 1993). Ataxin-2 und Pbp1 ähneln sich in ihrer Domänenstruktur. Die LSM- und LSM-AD-Domänen sind in beiden Proteinen vorhanden, allerdings sind der Polyglutaminbereich und das PAM2-Motiv in Pbp1 nicht enthalten (Abb. 2). In Interaktionsstudien konnte Pbp1 mit mehreren Proteinen des RNA-Metabolismus in Verbindung gebracht werden. Im Rahmen dieser Studien wurde auch die Bindung an das PABP-Homolog der Hefe, Pab1, entdeckt. Diese Bindung findet unabhängig vom PAM2-Motiv statt, das die Interaktion in höheren Organismen vermittelt (Mangus, Amrani et al. 1998; Ralser, Albrecht et al. 2005). Des Weiteren konnte eine Assoziation von Pbp1 mit Dhh1, einer DEAD/H-box RNA-Helikase, nachgewiesen werden. Diese Helikase interagiert mit LSM-Proteinen und ist Bestandteil des mRNA-decapping-Komplexes, welcher die mRNA-Kappenstruktur entfernt und an der Deadenylierung und dem Abbau von RNA teilhat (Coller, Tucker et al. 2001; Fischer and Weis 2002; Tseng-Rogenski, Chong et al. 2003).

1.11. Ataxin-2 in *Caenorhabditis elegans*, Catx2

Das Ataxin-2 Ortholog in *Caenorhabditis elegans*, Catx2, enthält im Gegensatz zu dem Hefe-Ortholog ein PAM2-Motiv, allerdings nicht im C-terminalen Bereich, sondern in der Mitte des Proteins (Abb. 2). Catx2 bildet einen Komplex mit Cpub1 und scheint translationale Prozesse zu regulieren (Ciosk, DePalma et al. 2004).

Die Verminderung des Expressionsspiegels von Catx2 mittels siRNA löst verschiedene Defekte in der postembryonalen Keimbahn aus und hat einen starken Einfluss auf die frühe embryonale Entwicklung (Ciosk, DePalma et al. 2004). Auch die Geschlechts-Determination in den Gonaden von *C. elegans* ist durch die Verminderung von Catx2 gestört (Maine, Hansen et al. 2004).

1.12. Ataxin-2 in *Drosophila melanogaster*

Datx2, das Ortholog in *Drosophila melanogaster* wurde durch Sequenzvergleiche identifiziert (Satterfield, Jackson et al. 2002). Datx2 weist eine vergleichbare Domänenstruktur ähnlich

der von Ataxin-2 auf. Es enthält LSm- und LSm-AD-Domäne und das PAM2-Motiv. Datx2 enthält auch Polyglutaminbereiche, allerdings nicht zusammenhängend und nicht vor der LSm-Domäne, sondern in der Mitte des Proteins (Abb. 2). Eine Funktion für Datx2 ist bisher noch nicht geklärt, allerdings konnte ein regulativer, dosisabhängiger Effekt von Datx2 auf die Bildung von Aktin-Filamenten gezeigt werden. Aktivitätsreduzierende Mutationen und transgene Überexpression von Datx2 resultieren in erhöhter Sterblichkeit, Sterilität der weiblichen Fliegen, schweren Störungen in der Entwicklung des Fliegenauges und veränderter Morphologie der Sinneshärchen.

Ursächlich für diese Phänotypen scheint eine Störung in der Bildung der Aktinfilamente zu sein. Da die Abundanz von Aktin nicht verändert ist und Datx2 auch keine physikalische Assoziation mit Aktin zeigt, muss von einem indirekten Effekt ausgegangen werden.

Weitere Experimente in der Fliege haben gezeigt, dass Datx2 mit Polyribosomen assoziiert ist. Sowohl das PAM2-Motiv als auch die LSm- und LSm-AD-Domäne können unabhängig voneinander diese Assoziation herstellen. Im Falle des PAM2-Motives wurde eine Interaktion mit PABP gezeigt, welche die Verbindung mit den Polyribosomen zu vermitteln scheint (Satterfield and Pallanck 2006).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Ataxin-2 in seiner zellulären Funktion nicht verstanden ist, aber Hinweise in zwei Richtungen vorhanden sind. Einerseits die Verbindung zum RNA-Metabolismus durch die Domänenstruktur und die Interaktionen mit RNA-assoziierten Proteinen und andererseits eine Verbindung zur Endozytose durch die Interaktion mit den Endophilinen A1 und A3.

2. Zielsetzung der Arbeit

Ataxin-2 konnte als das Protein identifiziert werden, dessen Mutation für für die Spinozerebelläre Ataxie Typ 2 verantwortlich ist (Imbert, Saudou et al. 1996; Pulst, Nechiporuk et al. 1996; Sanpei, Takano et al. 1996). Allerdings ist die zelluläre Funktion von Ataxin-2 bisher nicht bekannt. Mehrere Ansätze zur Funktionsanalyse haben Ataxin-2 mit dem RNA-Metabolismus in Verbindung gebracht (Shibata, Huynh et al. 2000; Ralser, Albrecht et al. 2005; Satterfield and Pallanck 2006; Nonhoff, Ralser et al. 2007), eine Lokalisation am Golgi-Apparat und eine mutationsabhängige Veränderung der Golgi-Morphologie gezeigt (Huynh, Yang et al. 2003) und eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett postuliert (Huynh, Figueroa et al. 2000; Satterfield, Jackson et al. 2002).

Da keiner diese Ansätze bisher eine direkte Funktion von Ataxin-2 zeigen konnte, sollten im Rahmen dieser Arbeit Interaktoren von Ataxin-2 mittels eines Hefe-2-Hybrid Screens

identifiziert werden. Über die Analyse des Proteinnetzwerkes von Ataxin-2 sollten zelluläre Funktionen analysiert und der zelluläre Zusammenhang von Ataxin-2 identifiziert werden. Zur Charakterisierung der Interaktionen sollten *in vitro* Bindungsexperimente mit rekombinantem Protein durchgeführt werden, während mit Kolo-kalisationen und Koimmunpräzipitationen die subzelluläre Lokalisation und die physiologische Existenz der Proteinkomplexe nachgewiesen werden sollte. Anschliessend an die Identifikation spezifischer Interaktoren und die Charakterisierung der Interaktionen sollten dann geeignete Experimente einen Aufschluss über die Funktion von Ataxin-2 geben.

3. Material

3.1. In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz
COS-7	Nierenzelllinie aus der grünen Meerkatze	(Gluzman 1981)
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie	(Shein and Enders 1962)
HeLa	humane Zervix-Karzinom-Zelllinie	(Scherer, Syverton et al. 1953)
U251	humane Gliom-Zelllinie	(Asai, Miyagi et al. 1994)
U343	humane Gliom-Zelllinie	(Asai, Miyagi et al. 1994)
SH-SY5Y	humane Neuroblastom-Zelllinie	(Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978)
SH-SY5Y1.3	humane Neuroblastom-Zelllinie	
SK-N-SH	humane Neuroblastom-Zelllinie	(Biedler, Helson et al. 1973)
SHEP	humane Neuroblastom-Zelllinie	(Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978)

Oligodendrozyten humane Oligodendrozyten

3.2. Verwendete Zellkulturmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS)	PAA, Pasching A
Fötale Kälberserum	PAA
Bovines Serum	Hyclone/Perbio, Bonn
L-Glutamin	Invitrogen
Opti-MEM	Invitrogen
RPMI 1640	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen

Trypsin/EDTA	Invitrogen
Zellkulturschalen, -flaschen und -platten	Corning, Schiphol-Rijk NL Sarstedt, Nümbrecht Becton-Dickinson, Plymouth GB Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger und Deckgläser	Knittel, Braunschweig

3.3. Antikörper

Primär-Antikörper

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Kat. Nr.)
anti-ACTN1 (H-300)	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg (SC15335)
anti-ACTN2	Maus monoklonal	AVIVA, San Diego USA (ARP37422_T200)
anti-ATXN2	Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg (611378)
anti-Calnexin	Kaninchen polyklonal	Stressgen/Biomol, Hamburg (SPA-865)
anti-Calreticulin	Kaninchen polyklonal	Abcam, Cambridge GB (ab4-100)
anti-EEA1	Maus monoklonal	BD Biosciences (610456)
anti-ERGIC	Maus monoklonal	von H.P. Hauri/Basel
anti-GAPDH	Maus monoklonal	Calbiochem/Merck, Darmstadt
anti-Giantin	Kaninchen polyklonal	Abcam (ab24586)
anti-GluR4	Kaninchen polyklonal	Upstate/Millipore, Schwalbach (06-308)
anti-GST	Ziege polyklonal	Amersham/GE, Freiburg (27457701V)
anti-HA	Kaninchen polyklonal	BD Biosciences (631207)
anti-HA	Maus monoklonal	Covance, Princeton USA (MMS_101P)
anti-Living Colors	Kaninchen polyklonal	Clontech/Takara, Heidelberg (632460)
anti-Myc	Maus monoklonal	BD Biosciences

		(631206)
anti-p115	Kaninchen polyklonal	Abcam (ab32796)
anti-p44/42 MAP-Kinase (137F5)	Kaninchen polyklonal	Cell Signalling/NEB, Frankfurt (4695)
anti-phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr 202/Tyr204)	Kaninchen polyklonal	Cell Signalling/NEB (9101)
anti-RENT1	Kaninchen polyklonal	Novus, Littleton USA (NB100-368A)
anti-SNTB1	Maus monoklonal	ABR/Dainova, Hamburg
anti-TGN46	Schaf polyklonal	Morphosys AbD/Serotec, Düsseldorf (AHP500G)

Primäre Peptid-Antikörper vom Kaninchen aus Auftragsarbeiten von Biogenes, Berlin

Bezeichnung	Epitop
anti-SIM 8160	NRRQEERLREQEER
anti-SIM 8162	LEKSGGAEPRGSE
anti-TRAP 8616	NMPMSGNTGENFRK

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller (Kat. Nr.)
anti- Kaninchen Alexa488	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe (A-11010)
anti-Kaninchen Alexa488	Molecular Probes/Invitrogen (A-21441)
anti-Kaninchen Cy2	Jackson Immunochemicals, Newmarket GB (711-125-152)
anti-Kaninchen Cy3	Jackson Immunochemicals (711-165-152)
anti-Kaninchen-HRP	Amersham/GE (NA934V)
anti-Maus Alexa488	Molecular Probes/Invitrogen (A-21200)
anti-Maus Alexa546	Molecular Probes/Invitrogen (A-11003)
anti-Maus Cy2	Jackson Immunochemicals (715-225-150)
anti-Maus Cy3	Jackson Immunochemicals (711-165-150)
anti-Maus-HRP	Amersham/GE (NA931V)
anti-Schaf Cy5	Jackson Immunochemicals (713-176-147)
anti-Ziege-HRP	Santa Cruz (SC2020)

3.4. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Operon, Köln synthetisiert.

Primer No.	Name	Sequenz 5'→3'
1	SIM 5'	atggagcagctacaagatgagacc
2	SIM 3'	gatgatggtgatgttagctccct
3	TRAP 5'	atgatggaaggagatctggttca
4	TRAP 3'	taattaactttgaaagctctat
5	pSportforw	gagctatgacgtcgcacgc
6	pSportrev	cactatagggaaagctggtacgcc
7	LafmidBAforw	gggtttccagtcacgacgtgt
8	LafmidBArev	cacaggaaacagctatgaccatga
9	Adapter 4 UP TRAP in Myc/HA	tcgacgcccgcactagttaattaaggtag
10	Adapter 4 LW TRAP in Myc/HA	cttaattaaactagtgcggccgcg
11	Adapter-6 UP SIM in Myc/HA	tcgacagtgtacagcccgggtgtacaggtag
12	Adapter-6 LW SIM in Myc/HA	ctgtacaaccgggctgtacactg
13	5'SIM Δ-STOP	gaacaagagcacactgca
14	5'SIM Δ-STOP	gtctagatgtacagatgatggtgatgttag
15	5'TRAP-□Δ-STOP	aataagtgccacagggcttttaaaa
16	3'TRAP-□Δ-STOP	aaggtaccgattaactttgaaagctctat
17	5'Trap ohne NotI	aagcggccgcaattcatgctggaaggagat
18	3'Trap ohne NotI	ggtttctctagaaaaatggcatgg
19	Adapter 10 UP SIM in eGFP	aattctgtacagtctagagtgtacaa
20	Adapter 10 LW SIM in eGFP	gatctgtacactctagactgtacag
21	TRAP in pENTR1A rev	tctcgagccattaactttgaaagctctat
22	hatxfrag3for	atgttactgactctgctatcag
23	hatxfrag3rev	cgaattcttaggaggaatatatt
24	hatxfrag2for	atgagaggtcgaacagtaacaa
25	hatxfrag2rev	cctcgagttagcatctcttttgc
26	hatxfrag4for	atgggacaaagaaatagagaag
27	hatxfrag4rev	cctcgagtttgcgtcttcttc
28	hatxfrag5for	atggctgagcaagtaggaaatc
29	hatxfrag5rev	gttcagcaccataactcgagg
30	hatxfrag6for	atgcagcaccaggccgcccaggc
31	hatxfrag6rev	cctcgagtttacaactgctg
32	hatxfrag6dstoprev	cctcgagttcaactgctgttg
33	hatxfrag1for	atgcgctcagcggccgcagc
34	hatxfrag1rev	cctcgagttgccagggccg
35	pENTR1Afor	gcagaaggccatcctgacg
36	pENTR1Arev	cagagatttgagacacggg
37	simil300seqfor	caggagaggcggcaggag
38	simil695seqfor	ctcccaggagcaccag
39	simil300seqrev	ctcctgccgctctcctg
40	simil695seqrev	ctgggtgctcctggggag
41	simil499seqrev	cccgtgctcgtacaggg
42	sim-nterm1-480+stoprev	cctcgagttctattcccaccaccag
43	sim-nterm1-480delstoprev	cctcgagaattcccscggc
44	sim-cterm480-825for	atggccctgtscgsgcsgcg
45	sim-ctermdelstoprev	cctcgagttgstggtggtg
46	TRAPinpENTR1Arev	cctcgagtttaattaagagacactagtctctatcctgacc
47	SIMinNTAPA-UP	aattcctgtacaagatctctagac
48	SIMinNTAPA-LW	ggaacatgttctagaagatctgagct
49	TRAP113forw	gatcccctcaaacagctag

50	TRAP447forw	gttgagttaagcctgatgc
51	TRAP740forw	gcataacaatggcatttggga
52	TRAP1046forw	ggtgaaatacacaagtggcc
53	TRAP1446forw	gtgggcaaagactattctgc
54	TRAP1829forw	caaagctgacattccacttg
55	TRAP2240forw	gtcagagctcagggaaattc
56	TRAP2609forw	gggcaacactggagagaatt
57	TRAP3012forw	gtacagcccctagtggacat
58	TRAP3067rev	gagctgtgactgcttgaag
59	TRAP2795rev	caaggctggatgacgaagta
60	TRAP2362rev	ctgcatctggtgccacatg
61	TRAP1918rev	cacatatagccttcaagcag
62	TRAP1617rev	ctcttctgttgatgacct
63	TRAP1216rev	gtttagcatagagaatggcc
64	TRAP878rev	ccaccactgcaaggttctc
65	TRAP478rev	gagacattcagcatcaggc
66	TRAP245rev	cttgagttctgtgcaggc
67	Mutagenese SIM Δ-STOP1	gctaaacatcacatcatcggggccaccagctttctg
68	Mutagenese SIM Δ-STOP2	caagaaagctgggtggcccgatgatggtgatgtttagc
69	Mutagenese SIM Δ-STOP3	gctaaacatcacatcatcggggccaccagctttctg
70	Mutagenese SIM Δ-STOP4	caagaaagctgggtggcccgatgatggtgatgtttagc
71	SIMinpgex6p1-UP	aattcatgtacacccgggtctagac
72	SIMinpgex6p1-LW	tcgagtctagaccgggtgtacatg
73	SIMdelinpgex6p1-UP	aattcatgtacacccgggtgtacac
74	SIMdelinpgex6p1-LW	tcgagtgtacacccgggtgtacatg
75	SIM366forw	ttgggaggagctgttcaaactca
76	SIM856rev	ctgccacagcctctcatcctg
77	SIM781forw	ggagaggctgctggacgaggtg
78	SIM1277rev	tgaccgctcttagatgaatggga
79	SIM1231forw	tgccgagaacaggagctaaacat
80	SIM1708rev	aagcatggcagcctatcccaaacc
81	SIM31forw	cacccattctggtcctctggt
82	SIM180forw	atggcagtagcctgacacattc
83	SIM432-87forw	ccccacccgcgatgtca
84	SIM432-516rev	gctctggggccaggggttcag
85	SIM466-131forw	gccgcagccaagaaaaagtta
86	SIM466-672rev	tcacgtagcctctcctctgtctc
87	SIM479spec733frw	gaggcggcaggaggagcagaag
88	SIM479spec1164rev	tccaccacataagggcaaactcg
89	SIM432spec1181for	tgagccccagtcacacaag
90	SIM432spec1811rev	ttcaaaaagcatggcagcctatcc
91	SIM334spec24for	gggacccagggttcgcacatcta
92	SIM334spec478rev	cctcctgccgctctcctgttcta
93	SIM479spec667for	gtgaacaggaggagaggctgcatg
94	SIM479-1281rev multi	cgaagccgctgctggtcggccc
95	SIMinpgex2tup	gtaccgtgtacactcgagcttagag
96	SIMinpgex2tlw	aattctctagactcgagtgtacacg
97	alle647rev	ctgttcacgtagcctctcctctgtctc
98	SIM361forw	gaagcttgggaggagctgttcaaactca
99	SIM361rev	tgagttgaacaagctcctccaagcttc
100	SIM Nterm Epitop1	caggagacaggaggagaggctac
101	SIM Nterm Epitop2	gaggctacgtgaacaggaggagag
102	SIM Cterm Epitop1	ctcttcagctccacccgacttc
103	SIM Cterm Epitop2	ctcggagcctctgtgctctc
104	TRAP881-1098forw	ggaattctcacagatgtcatcaaaaagtc

105	TRAP881-1098rev	cctcgagttaattaaacttttgaaagctctatcag
106	TRAP629-1098forw	ggaattctcaatatcaatgccacctgctg
107	TRAP881-1098forw	ggaattcacagatgtcatcaaaaagtc
108	TRAP629-1098forw	ggaattcaatatcaatgccacctgctg
109	AD12-Atxfragsinpenr-up	aattcaagcttcacaaagtggtcgacc
110	AD12-Atxfragsinpenr-lw	tcgaggtcgaccactttgtgaagctgaatt
111	ACTN1CH1For	gaagaattccagcagagaaagacattcacggca
112	ACTN1CH2For	gaagaattctcagccaaggaagggctgctc
113	ACTN1Spec1For	gaagaattccttatggaagactacgagaagctg
114	ACTN1Spec2For	gaagaattcctggcagagaagttccggcag
115	ACTN1Spec3For	gaagaattcgaggacctgcaggacacctc
116	ACTN1Spec4For	gaagaattcctaggcaagcagtttgagacc
117	ACTN1EF1For	gaagaattccagatgaatgagttccgggcc
118	ACTN1EF2For	gaagaattcggagaagcagaattgcccgc
119	ACTN1CH1Rev	gttctcgagggcaagcgcaggatgatgttcc
120	ACTN1CH2Rev	gttctcgaggtgtagaagctatacacgtaagt
121	ACTN1Spec1Rev	gttctcgagattcagcaaccactcctcatagcc
122	ACTN1Spec2Rev	gttctcgagctccagagcttcccttcgctt
123	ACTN1Spec3Rev	gttctcgagctccgtcagagcttggtccct
124	ACTN1Spec4Rev	gttctcgaggttctctacctcattgatgttct
125	ACTN1EF1Rev	gttctcgaggtcggctgtctcggcggga
126	ACTN1EF2Rev	gttctcgagatcataaccaagctgatgaggca
127	ACTN1Spec2For2	gggaattcctggaccacctggcagagaag
128	ACTN1Spec2Rev2	gctcgagcagtttctcggctccgctccag

3.5. DNA-Marker

Bezeichnung	Hersteller (Kat. Nr.)
TrackIt™ 100 bp DNA Ladder	Invitrogen (10488-058)
TrackIt™ 1 kb DNA Ladder	Invitrogen (10488-072)

3.6. Proteingrößen-Marker

Bezeichnung	Hersteller (Kat. Nr.)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot (SM1811)
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, München (161-0374)

3.7. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in Analysenqualität (*pro analysi*) von den folgenden Firmen erworben: AppliChem, Darmstadt; Fluka, Neu-Ulm; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Sigma-Aldrich, Deisenhofen.

Die folgende Tabelle listet die Verbrauchsmaterialien und verwendeten Kits auf.

Bezeichnung	Hersteller (Kat. Nr.)
Amicon Filter Ultra 5kDa/30kDa	Millipore, Schwalbach

	(900508/903008)
DNase I Amplifikation Grade Kit	Invitrogen (18068-015)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (K1612)
Fujifilm Super RX NIF100	Fuji Photo Film, Düsseldorf (93043)
GeneElute HP Plasmid Maxiprep Kit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (NA0310-1KT)
GSH-Sepharose 4b	Amersham/GE (17-0756-01)
Immun-Blot PVDF Membran 0,2 µm	Bio-Rad (162-0177)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (11668-019)
MaV203 Kompetente Hefezellen	Invitrogen (11445-012)
Metafectene, Metafectene/Pro	Biontix, München (T020- 1.0/T040-1.0)
Nucleofector-Adult Normal Human Dermal Fibroblast (NHDF-Adult)	Amaxa, Köln (VPD-1001)
Qiaquick Maxiprep Kit	Qiagen, Hilden (12162)
Qiaquick PCR-Purification Kit	Qiagen (28106)
Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ECL)	Pierce, Rockford USA (34080)
TransIT-COS	Mirus/MoBitec, Göttingen (MIR 2190)

3.8. Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller (Kat. Nr.)
AmpliTaq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt (N8080171)
Platinum PFX DNA Polymerase	Invitrogen (11708-03)
Diverse Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt

3.9. Verwendete Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav Varioklav	Biomedis, Gießen
Bakterieninkubator Series 25 Incubator Shaker	New Brunswick, Edison USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank B6120(1)	Heraeus, Hanau
Brutschrank MCO 18AIC	Sanyo, Düsseldorf

Elektrophoresekammer Minigel Twin 010-130	Whatman/Biometra, Göttingen
Feinwaage Sartorius Analytic A120S	Sartorius, Göttingen
Inverses Mikroskop Leica 090-135.001	Leica, Bensheim
Konfokales Laserscan Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Konfokales Laserscan Mikroskop TCS 4D	Leica
Laborwaage PE1600	Mettler-Toledo, Gießen
MS2 Minishaker	IKA, Wilmington USA
pH-Meter 210 Microprozessor	Hanna, Kehl am Rhein
Polymax 1040 Orbitalschüttler	Heidolph, Schwabach
Powerpac 200	Bio-Rad
Powersupply E122	Consort/Peqlab, Erlangen
Rotator 2-1175	NeoLab, Heidelberg
Sonicator	Bandelin Elektronik, Berlin
Sterilbank LaminAir HB2448	Heraeus
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Transferkammer Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Wasserbad 1083	GLW, Würzburg
Zentrifuge 4-15C	Sigma, Osterode
Zentrifuge 5702	Eppendorf
Zentrifuge Mefafuge 1.0R	Heraeus
Zentrifuge Sorvall RC5B Highspeed Centrifuge	Heraeus

3.10. Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
TBE-Puffer	89 mM Tris pH 8, 89 mM Borsäure, 1mM EDTA
2 x Ladepuffer	250 mM Tris/HCl, 20 % Glycerol, 4 % SDS, 10% β -Mercaptoethanol, 0,005 % Bromphenolblau und 5 % Wasser
Fraktionierungspuffer	0,25 M Sucrose, 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 25 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 200 μ g/ml Cycloheximide, 1 % Phosphatase Inhibitor Cocktail 1+2 (Sigma), 250 U/ml RNAsin, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 1 mM PMSF
KCM-Puffer	500 mM KCL, 150 mM CaCl ₂ , 250 mM MgCl ₂
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton, 5 g Yeastextrakt, 10 g NaCl, 1,5 ml 1M NaOH, ad 1 l H ₂ O
Lysispuffer	50 mM Hepes, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM NaF,

	1 mM Na ₃ VO ₄ , 150 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,1 % NP-40, cOmplete™ Protease-Inhibitor Tablette (Roche), 1mM PMSF
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris, pH 8,1-8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
TEN	50 mM Tris pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,3 mM NaCl
TE-Puffer	10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA
Transferpuffer	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % Methanol
TSB-Puffer	LB-Medium, 10 % PEG 3000(w/v), 5 % DMSO, 20 mM MgCl ₂ , pH 6,1
X-Gal-Lösung	100 µl X-Gal in DMF, 60 µl 2-Mercaptoethanol und 10 ml Z-Puffer
YAPD	20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 20 g Glukose, 100 mg/l Adeninhemisulfat
YTA	16 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 l + 50 µg/ml Ampicillin
Z-Puffer	16,1 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, 5,5 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 0,75 g KCl, 0,246 g MgSO ₄ ·7H ₂ O ad 1 l H ₂ O, pH 7

3.11. Für diese Arbeit verwendete Software

Name	Funktion (Hersteller)
Adobe Acrobat 7.0	Bearbeitung von PDF-Dateien (Adobe)
Adobe Photoshop CS2	Bildbearbeitung (Adobe)
EndNote X	Literaturverwaltung (Thomson ISI ResearchSoft)
MS Office 2003	Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Präsentationen (Microsoft)
NCBI Blast N	Nukleotidsequenzanalyse (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)
NCBI Blast P	Proteinsequenzanalyse (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)
Genecards	Proteinanalyse (http://www.genecards.org/index.shtml)
Ligation Calculator	Berechnung von DNA-Mengen zur Ligation (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html)
Protein Explorer	Proteinanalyse (http://www.umass.edu/microbio/chime/pe_beta/pe/protexpl/frntdoo2.htm)

Smart	Proteinanalyse (http://smart.embl-heidelberg.de/)
GraphPad Prism 4	Statistik (GraphPad Software)
ExPASy	Proteinanalyse (http://www.expasy.org/)

4. Methoden

4.1. Hefe-2-Hybrid System (*Yeast-two-hybrid*)

Dieser Arbeit vorangehend wurde ein Hefe-2-Hybrid Experiment als Auftragsarbeit bei der Firma Invitrogen durchgeführt. Ein Ataxin-2 Konstrukt mit einem auf ein Glutamin reduzierten Polyglutamintrakt wurde im „ProQuest two-hybrid system with Gateway technology“ (Invitrogen) als Köder eingesetzt. Das Konstrukt wurde in das Plasmid pDest32, das Köderplasmid des Systems kloniert, und mit einer humanen adulten cDNA-Bank in den Hefestamm MaV203 co-transformiert. Transformierte Hefen wurden auf –Leu –Trp –His + 3AT Agarplatten selektiert. Potentielle Interaktoren wurden durch die Aktivierung der LacZ und URA3 Reportergene validiert. Die cDNA-Bank Plasmide wurden aus den positiv getesteten Hefen isoliert und sequenziert. Um den Einfluss des Polyglutamintraktes auf die Bindung zu untersuchen, wurden Ataxin-2 Konstrukte mit 22 und 79 Glutaminen in pDest32 kloniert und mit den positiv getesteten cDNA-Bank Klonen von „Similar to golgin-like“ und Trap ko-transformiert. Die Bindung wurde mit qualitativen β -Gal Filter-Tests und semiquantitativen flüssig β -Gal-Tests analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion mit „Similar to golgin-like“ reproduziert und eine Analyse mit Deletionskonstrukten von „Similar to golgin-like“ zur Identifikation der Bindungsregion durchgeführt.

4.1.1. Transformation von MaV203

Die im Kit beigelegte PEG/LiAc (40% PEG 4000, 0,1 M LiAc in TE-Puffer) Lösung wurde im Wasserbad auf Raumtemperatur gebracht, und vor der Benutzung gut durchmischt. Die kompetenten Hefen wurden im 30 °C Wasserbad für maximal 90 Sekunden aufgetaut und 100 μ l der Zellsuspension wurden in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. 100 ng Vektor-DNA wurden zu den Zellen gegeben, und die Suspension wurde durch vorsichtiges Pipettieren durchmischt. Nun wurden 600 μ l der PEG/LiAc Lösung zugegeben und das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation im Wasserbad bei 30 °C mit einer erneuten Durchmischung durch Invertieren des Reaktionsgefäßes alle 10 Minuten. Nach der Inkubation wurden 35,5 μ l DMSO zugegeben, die Suspension

durchmischt und ein Hitzeschock für 20 Minuten bei 42 °C im Wasserbad ausgeführt. Nach dem Hitzeschock wurden die Hefezellen bei 400 x g sedimentiert und der Überstand sorgfältig entfernt. Die Hefezellen wurden in 100 µl steriler physiologischer Salzlösung (0,9 % NaCl) resuspendiert und für 48-72 h bei 30 °C auf Agar-Selektionsplatten ausplattiert.

4.1.2. β -Galaktosidase Filter Test

Ein β -Galaktosidase Filter Test gibt eine qualitative Aussage zur Interaktion von zwei Proteinen im Hefe-2-Hybrid System. Die Interaktion und die daraus resultierende Aktivierung des LacZ-Gens führen zur Expression des Enzyms β -Galaktosidase. Die Aktivität der β -Galaktosidase wird durch Zugabe von X-Gal, einem artifiziellen Substrat der β -Galaktosidase detektiert. X-Gal wird durch Hydrolyse zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl gespalten, 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird durch Oxidation zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, einem tiefblauen Farbstoff.

Die zu untersuchenden Hefe-Transformanten wurden auf einer YAPD-Agarplatte herangezogen, und dann als einzelne Punkte auf eine Nitrozellulose-Membran repliziert. Diese Membran wurde dann auf eine YAPD-Platte gelegt und für 18-24 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Membran für 30 Sekunden in flüssigem Stickstoff untergetaucht und direkt danach in eine neue Petrischale überführt. Die neue Petrischale wurde vorher mit Filterpapier ausgelegt, das mit 8 ml X-Gal-Lösung (100 µl X-Gal in DMF, 60 µl 2-Mercaptoethanol und 10 ml Z-Puffer) getränkt wurde.

Die Hefen wurden dann mit der X-Gal-Lösung für 24 h bei 30 °C inkubiert, und die Blaufärbung der Kolonien über diesen Zeitraum beobachtet.

4.1.3. Flüssig β -Galaktosidase Test

Mittels des flüssig- β -Galaktosidase Tests können quantitative Aussagen zur Interaktionsstärke im Hefe-2-Hybrid System gemacht werden. Im Gegensatz zum Filter-Test wurde hier o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) als chromogenes Substrat verwendet. ONPG wird durch Hydrolyse zu Galaktose und dem gelben Farbstoff o-Nitrophenol dessen Menge photometrisch bei 420 nm gemessen werden kann.

Isolierte Kolonien wurden in 2,5 ml Selektionsmedium über Nacht bei 30 °C im Schüttler inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde in 5 ml YAPD inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1-1,5 wachsen gelassen. Die OD₆₀₀ zum Zeitpunkt der Entnahme aus dem Schüttler wurde für die späteren Berechnungen notiert. 1,5 ml der Zellsuspension wurden dann in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die Zellen bei 14000 x g für 30 Sekunden sedimentiert. Die Zellen wurden dann in 1,5 ml Z-Puffer resuspendiert und erneut bei 14000

x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in 300 µl Z-Puffer aufgenommen und 100 µl dieser Suspension wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und mit 100 µl steriler 0,5 mm Glasskugeln aufgefüllt. Die Zellen wurden dann mit den Glaskugeln 1-2 Minuten gevortext, um die Hefen aufzuschließen.

Nun wurden 700 µl Z-Puffer und 1,9 µl 2-Mercaptoethanol zu jedem Extrakt zugegeben. Nach der Zugabe von 160 µl einer 4 mg/ml ONPG-Lösung in Z-Puffer wurden die Reaktionsgefäße bei 30 °C im Wasserbad inkubiert und die Zeit gemessen. Durch die Zugabe von 400 µl 1M Na₂CO₃ wurde die Reaktion nach Einsetzen der Farbreaktion gestoppt. Die Reaktionsgefäße wurden nun für 5 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert und der Überstand in eine saubere Küvette überführt. Die Absorption von o-Nitrophenol wurde dann bei 420 nm gemessen und die β-Galaktosidase Einheiten nach der folgenden Formel berechnet:

$$\beta\text{-Gal Einheiten} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

hierbei sind: t = Zeit der Inkubation in Minuten

V = Volumen der Kultur in der Messung in ml

OD₄₂₀ = Absorption von o-Nitrophenol

OD₆₀₀ = Zelldichte zum Beginn des Experiments

Eine β-Gal Einheit ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol ONPG zu Galaktose und o-Nitrophenol innerhalb einer Minute hydrolysiert. Um die Quantifizierung statistisch auszuwerten, wurden von jedem Transformanden 5 isolierte Klone jeweils als Triplikat untersucht.

4.2. Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.2.1. Klonierungen

Zur Herstellung rekombinanter Proteine und der Expression von Fusionsproteinen in Zellen mussten die offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*) der entsprechenden Proteine in Expressionsvektoren kloniert werden. In dieser Arbeit wurden zwei Klonierungsschemata angewendet.

4.2.1.1. Klonierung mittels PCR-Extension

Bei dieser Methode werden Schnittstellen für Restriktionsenzyme mittels PCR (*Polymerase chain reaction*) an die zu klonierende Nukleotidsequenz angefügt. Schematisch ist dieser Vorgang in Abbildung 3 dargestellt. Die Primer binden an ihre Konsensus-Sequenz auf dem

Template (grün) (Abb. 3A), die Polymerase synthetisiert von 5' in 3' Richtung und synthetisiert dann auch den Überhang (rot), der die Sequenz für die gewünschte Schnittstelle und eventuell benötigte zusätzliche Nukleotide beinhaltet (Abb. 3B). Zusätzlich zum Ausgang*template* enthält die Reaktion zu Beginn des nächsten Zyklus dann bereits erweiterte *Template*-Sequenzen (Abb. 3C) die im nächsten Schritt mit den *antisense*-Primern oder aber mit bereits elongierten *Template*-Einzelsträngen binden (Abb. 3D) und dann zu dem abgebildeten *Template* mit angehängten Schnittstellen (Abb. 3E) aufgefüllt werden. Das so erhaltene modifizierte *Template* kann dann mittels Restriktionsverdau behandelt werden und das Fragment in den vorher mit den identischen Enzymen aufgeschnittenen Vektor ligiert werden (siehe 4.2.6. Ligation).

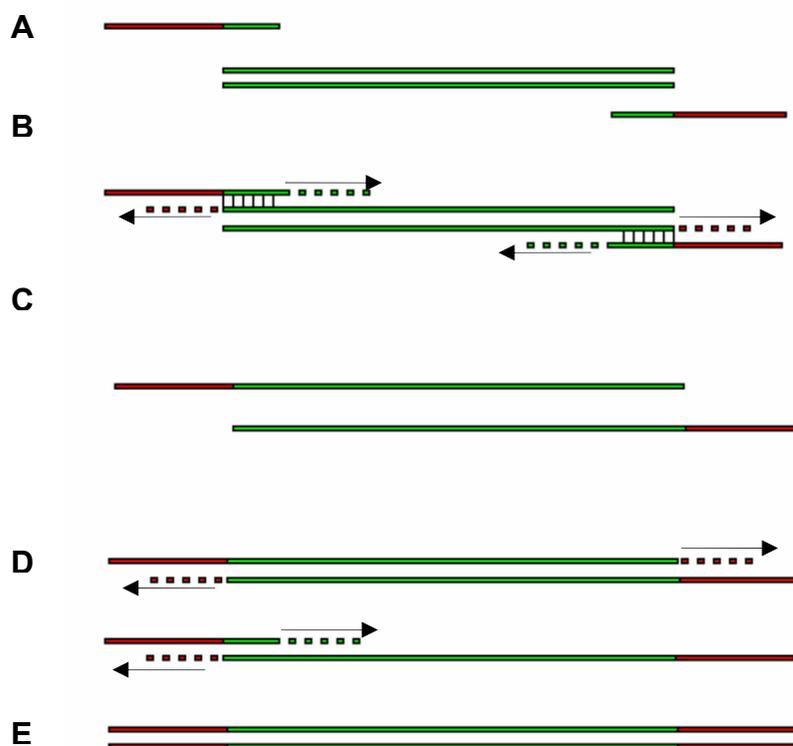


Abbildung 3: Schematische Darstellung der PCR-Extension

4.2.1.2. Klonierung mittels Adapterinsertion

Die Adapterinsertionsmethode wird angewendet, wenn auf dem Insert und dem Vektor Schnittstellen zwar nur einmal vorkommen, die Verwendung dieser Schnittstellen aber zu einer Verschiebung des Leserahmens führen würde. Der Adapter ist so aufgebaut, dass beide Enden kompatibel zu den offenen Schnittstellen des Vektors sind und die Schnittstellen für das Insert so dazwischen liegen, dass der Leserahmen erhalten bleibt.

Der Adapter wird aus Oligonukleotiden zusammengesetzt, die zusammen auf 95 °C erhitzt werden, und dann bei langsamer Abkühlung in der gewünschten Form aneinander binden.

Um den Adapter einzufügen, wird der Vektor (grün) mit geeigneten Restriktionsenzymen aufgeschnitten (Abb. 4A und B), und mit dem Adapter (rot und türkis) ligiert (Abb. 4C). Der modifizierte Vektor (Abb. 4D) wird dann an den für das Insert spezifischen, und durch den Adapter eingefügten Schnittstellen (türkis) erneut aufgeschnitten (Abb. 4E) und das Insert (schwarz) durch Ligation eingefügt (Abb. 4F).

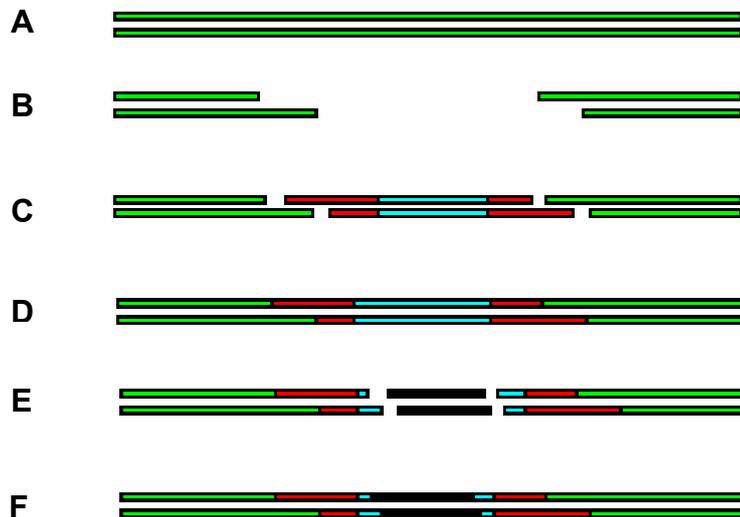


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Adapterinsertionsmethode

4.2.2. Plasmidpräparation aus 2 ml Kulturen

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurde die Methode der alkalinen Lyse verwendet. Dazu wurde eine einzelne Kolonie oder eine Probe einer Glycerinkultur in 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

Die Zellen wurden am darauf folgenden Tag bei 4000 x g in einem 2 ml Reaktionsgefäß sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl Resuspensionspuffer mit RNase resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lysis-Puffer zugegeben und das Gefäß 6-8 Mal invertiert. Die Lösung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann wurden 200 µl Neutralisationspuffer zugegeben. Um die Zelltrümmer und gefällten Proteine zu entfernen, wurde die Lösung bei 16000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. 600 µl des Überstandes wurde entnommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 900 µl Ethanol zugegeben, und mit einer Zentrifugation bei 16000 x g für 20 Minuten die DNA präzipitiert. Der Überstand wurde sorgsam entfernt und 700 µl 70 % Ethanol zugegeben. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 16000 x g für 10 Minuten. Danach wurde der Überstand entfernt und das Pellet luftgetrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 30-50 µl TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

4.2.3. Plasmidpräparation aus 250 ml Kulturen

Um im größeren Maßstab Plasmid-DNA von hoher Reinheit zu gewinnen, wurden Plasmid-Präparationen aus 250 ml Kulturen durchgeführt. Dazu wurden GenElute Maxiprep Kits der Firma Sigma verwendet.

250 ml LB-Medium wurden mit 5 ml Starterkultur angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit 4000 x g in 50 ml Röhrchen sedimentiert und das Medium verworfen. Zum Bakterien-Pellet wurden dann 12 ml Resuspensionslösung mit RNase A zugegeben und die Bakterien durch Vortexen resuspendiert. Hierbei war darauf zu achten, dass die Bakterien vollständig resuspendiert wurden. Danach wurden 12 ml Lysis-Puffer zugegeben und das Röhrchen mehrmals invertiert. Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von der Zugabe von 12 ml Neutralisationslösung und erneutem mehrmaligem Invertieren. Als Nächstes wurden 9 ml Bindelösung zugegeben, und das Lysat in Filterspritzen gefüllt. Nach 5 Minuten in der Filterspritze wurde das Lysat durch den Filter in die vorher equilibrierten Säulen gedrückt. Die Säulen wurden dann bei 3000 x g für 2 Minuten zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgten ein Waschschrift mit 12 ml Waschpuffer 1 und ein Schritt mit 12 ml Waschpuffer 2. Danach wurde die Säule in ein frisches Röhrchen gesteckt und es wurden 3 ml Elutionspuffer auf die Membran der Säule gegeben. Nach 5 Minuten wurde die DNA für 5 Minuten bei 1000 x g eluiert.

Es folgten eine photometrische Quantifizierung und Reinheitsprüfung der DNA und ein analytischer Restriktionsverdau oder eine Sequenzierung.

4.2.4. DNA-Sequenzierung

Um nach einer erfolgten Klonierung die DNA Sequenz eines Klonen zu überprüfen, wurden alle in dieser Arbeit erwähnten Klone sequenzverifiziert. Hierzu wurde das BigDye® Terminator System benutzt.

Die zu sequenzierende DNA wurde in folgende Reaktion mit spezifischen Sequenzierprimern eingesetzt:

DNA	200-500 ng
Primer	3,2 pMol
BigDye	8 µl
H ₂ O	auf 20 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Mit der Probe wurde dann das folgende PCR-Programm durchgeführt:

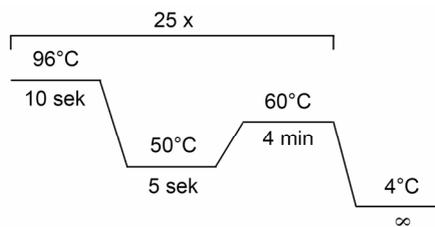


Abbildung 5: Schematische Darstellung des PCR-Programms zur Sequenzierung.

In einem Amplifikationszyklus wurde die Probe für 10 Sekunden auf 96 °C erhitzt, dann für 5 Sekunden bei 50 °C und für 4 Minuten bei 60 °C inkubiert. Bei 96 °C denaturiert die doppelsträngige DNA, so dass die Primer während der folgenden Inkubation bei 50 °C ihre spezifische Sequenz binden können, und bei 60 °C erfolgte für 4 Minuten die Elongation des durch Primer und Template gebildeten Doppelstranges. Dieser Zyklus wurde 25-mal wiederholt, danach wurde die Probe auf 4 °C heruntergekühlt und entnommen.

Es folgte die Aufreinigung der Probe mittels NaOAC/EtOH Fällung:

PCR-Produkt	20 µl
H ₂ O	14,5 µl
3M NaOAC	3 µl
95 % EtOH	62,5 µl
Gesamtvolumen	100 µl

Der Ansatz wurde gut durchmischt, und dann für 20 Minuten bei Raumtemperatur zum Präzipitieren stehen gelassen. Es folgten 20 Minuten bei 16000 x g in einer Tischzentrifuge, nach denen der Überstand vorsichtig entfernt wurde. Durch Zugabe von 250 µl 70 % EtOH wurde die Probe gewaschen, und danach erneut bei 16000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt, und die präzipitierten PCR-Produkte wurden luftgetrocknet. Die getrocknete Probe wurde dann bei -20 °C gelagert oder direkt in 5 µl einer Formamid/ 25 mM EDTA-Dextran blau (5:1) Lösung für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. 2,5 µl der denaturierten Probe wurden zur Sequenzierung in ein vorher angefertigtes Poly-Acrylamid-Gel geladen.

Das Gel wurde folgendermaßen angesetzt:

Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1)	8,4 ml
5 x TBE	12 ml
H ₂ O	14 ml
Urea	21 g
10 % APS	300 µl

TEMED

20 µl

Der Ansatz wurde 2 Stunden auf dem Magnetrührer durchmischt und dann mit einer Spritze durch einen 22 µm Filter gedrückt und sofort zwischen die Elektrophoreseplatten gegossen. Nach etwa 30 Minuten war das Gel auspolymerisiert. Es wurde nun in das Sequenziergerät eingebaut, und das Sequenzierprogramm nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Konstrukte in dieser Arbeit wurden sequenzverifiziert.

4.2.5. Restriktionsverdau

Um Plasmide im Rahmen einer Klonierung mit spezifischen Enden aufzuschneiden oder um Plasmide mittels eines spezifischen Bandenmusters zu charakterisieren, wurden Restriktionsverdau eingesetzt. Ein typischer analytischer Verdau wurde nach dem folgenden Schema angesetzt:

DNA	0,3-0,5 µg
10 x Reaktionspuffer	1 µl
Restriktionsenzym	3 U/µg DNA
10 x BSA	1 µl
H ₂ O	auf 10 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Zur Restriktion bei Klonierungen wurden bis zu 5 µg DNA eingesetzt und das Gesamtvolumen auf 50 µl erhöht. Die Mengen an Puffer und BSA wurden dann entsprechend erhöht. Die Analyse erfolgte mittels eines Agarose-Gels und DNA-Färbung durch Ethidiumbromid.

4.2.6. Ligation

DNA-Fragmente können durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3`Hydroxyl- und 5`Phosphat-Enden verbunden werden. Diese Reaktion wird von einer Ligase unter der Hydrolyse von ATP katalysiert.

Der typische Ligationsansatz sah folgendermaßen aus:

Vektor-DNA	konzentrationsabhängig
Insert-DNA	konzentrationsabhängig
10 x Ligationspuffer mit ATP	1 µl
T4 DNA-Ligase (400 U/µl)	0,5 µl

H ₂ O	auf 10 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Das Verhältnis zwischen Vektor- und Insert-DNA wurde zwischen 1:3 und 1:10 variiert. Zur Berechnung der Mengen wurde folgende Website genutzt: http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html

Die Ligation wurde über Nacht bei 4 °C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde der Liagtionsansatz in *E.coli* DH5α Bakterien transformiert.

4.2.7. Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

E.coli DH5α wurden in 250 LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,6 herangezogen. Danach wurden die Bakterien 10 Minuten bei 4 °C und 4000 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden vorsichtig in 25 ml TSB-Puffer resuspendiert und mit 15 % Glycerin versetzt. Die Bakteriensuspension wurde dann in Proben zu 150 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Bakterien bei -80 °C gelagert.

Um die Bakterien zu transformieren, wurden sie auf Eis aufgetaut. Parallel dazu wurde die zu transformierende DNA mit 20µl 5 x KCM-Puffer und Aqua bidest auf 100 µl aufgefüllt. 100 µl der Bakteriensuspension wurden zu dem DNA-Ansatz gegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgten 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur.

Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank geschüttelt. Aliquots dieses Ansatzes wurden auf einer Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

4.2.8. PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) wird benutzt um spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* zu vervielfältigen. Hierzu werden flankierende Oligonukleotide und das Enzym DNA-Polymerase eingesetzt. Eine typische PCR-Reaktion wurde wie folgt angesetzt.

	Volumen	Endkonzentration
Template	1 µl	80-200 ng
10 x Reaktionspuffer	1 µl	1 x
<i>Primer 1</i> (10 µM)	1 µl	200 nM
<i>Primer 2</i> (10 µM)	1 µl	200 nM

dNTP Mix (10mM)	1 μ l	0,2 mM je dNTP
Polymerase (5 U/ μ l)	0,2-0,5 μ l	1-2,5 Units
Wasser	auf 50 μ l	
Gesamtvolumen	50 μ l	

Danach wurde der Ansatz in einem *Thermocycler* mit dem folgenden Programmablauf inkubiert (Abb. 6)

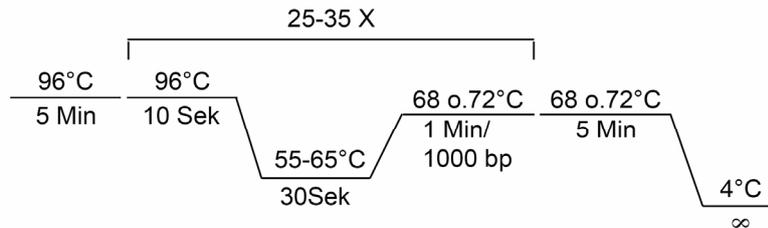


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines PCR-Programms

Dieser Ablauf beginnt mit einer initialen Denaturierung der DNA für 5 Minuten bei 96 °C; danach kommt der Bereich der Amplifikation. Jeder der 25 bis 35 Zyklen besteht aus einem Denaturierungsschritt, der Bindung der Oligonukleotide an das *Template* und der Elongation. Die Temperatur-Variablen in diesem Teil richteten sich nach dem Schmelzpunkt T_m der Oligonukleotide und nach der Elongationstemperatur der eingesetzten Polymerase, 72 °C bei der Taq- und 68 °C bei der Pfx-Polymerase. Die Zeit der Elongation wurde an die Größe des erwarteten Amplifikats mit 1 Minute für 1000 Basenpaare angepasst. Nach Ablauf der Amplifikationszyklen wurde die Reaktion für 5 Minuten auf Elongationstemperatur gelassen, damit die Polymerase unvollständige Amplifikate fertig stellen konnte. Abschließend wurde die Reaktion auf 4 °C heruntergekühlt und dann direkt weiter verarbeitet oder bei -20 °C für eine spätere Verwendung eingefroren.

4.2.9. RACE-PCR

Die *rapid amplification of cDNA ends* PCR, kurz RACE-PCR ist eine Methode, mit der unbekannte Sequenzen am 5'- oder 3'-Ende eines Gens identifiziert werden können.

Dazu wird die RNA mittels reverser Transkription in einzelsträngige cDNA überschrieben und der unbekannte Bereich mittels flankierender *Primer* amplifiziert.

4.3. Zellbiologische Arbeiten/Zellkultur

4.3.1. Subkultivierung adhärent wachsender Zellen

Zur Subkultivierung adhärent wachsender Zellen wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen von der Kulturschale und voneinander wurden 2 ml einer 0,05 % Trypsin / 53 mM EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben, und die Zellen mit der Lösung für ca. 3 Minuten inkubiert. Die vereinzelt Zellen wurden mit frischem Medium zur Inaktivierung des Trypsins versetzt, und dann in einem 15 ml-Röhrchen bei 500 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in einem definierten Volumen resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Danach wurden die Zellen in neue Kulturgefäße überführt.

4.3.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ein Aliquot aus einer suspendierten Zellkultur wurde mit einer 0,1 % Trypanblau / PBS Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Die gefärbte Suspension wurde bei aufgelegtem Deckglas seitlich in die Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt.

Es wurde der Mittelwert von 4 Großquadraten bestimmt. Ein Großquadrat hat eine Fläche von 1 mm^2 , und bei plan aufliegendem Deckglas eine Höhe von 0,1 mm. Daraus ergibt sich ein Rauminhalt von $0,1 \text{ mm}^3$. Zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter wird der Mittelwert der Zellzahl mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert.

4.3.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen für längere Zeit aufzubewahren, wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, bei 500 x g sedimentiert und nach einmaligem Waschen mit PBS mit 1 ml einer 5 % DMSO / 70 % Serum / 25 % DMEM Lösung aufgenommen. Diese Suspension wurde in Cryo-Röhrchen überführt, und für einen Tag bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Röhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und direkt in ein $37 \text{ }^\circ\text{C}$ Wasserbad überführt. Nachdem die Suspension angetaut war, wurden die Zellen so schnell wie möglich in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Danach wurden die Zellen für 1 Minute bei 500 x g sedimentiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät.

4.3.4. Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion ermöglicht die kurzzeitige Expression rekombinanter Proteine in einer eukaryontischen Zelle. Dazu wird Plasmid-DNA, die für das rekombinante Protein kodiert, in die Zelle eingebracht und dort transkribiert und translatiert. Da die Fremd-DNA in der Host-Zelle wieder abgebaut wird, spricht man von der transienten Transfektion. In dieser Arbeit wurden je nach Zelltyp unterschiedliche Verfahren eingesetzt, die liposomale Transfektion und die Elektroporation.

4.3.4.1. Liposomale Transfektion

Bei diesem Prinzip wird die DNA mittels Liposomen, d. h. Vesikeln, die leicht mit der Zellmembran fusionieren, in die Zelle transferiert. Dort werden die Liposomen abgebaut, und die DNA gelangt, da sie die Kernhülle nicht durchdringen kann, bei der nächsten Zellteilung in den Kern.

4.3.4.1.1. Transfektion mit Metafectene/Pro

Für HEK293 Zellen zeigte sich die Transfektion mit Metafectene und Metafectene/Pro als besonders effizient. Die Transfektion einer 10 cm Kulturschale wurde folgendermaßen durchgeführt:

In zwei sterilen Reaktionsgefäßen wurden jeweils 500 µl OptiMEM Medium vorgelegt. Danach wurde in eines der Gefäße 10 µg zu transfizierende DNA gegeben und gut durchmischt. In das andere Gefäß wurden 40 µl Metafectene oder Metafectene/Pro gegeben, und mittels Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach 5 Minuten wurden beide Suspensionen miteinander versetzt, und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch leichtes Rütteln und Schwenken gleichmäßig über den Zellen verteilt. 3-6 Stunden nach der Zugabe der Transfektionssuspension wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden 24-36 Stunden nach der Transfektion geerntet.

Sollten andere Kulturgefäße, z.B. 24-well-Platten verwendet werden, wurden die Mengen gemäß der Herstellerangaben angepasst.

4.3.4.1.2. Transfektion mit Lipofectamine 2000

Lipofectamine 2000 wurde bei HeLa Zellen eingesetzt. Für die Transfektion einer 10 cm Kulturschale wurden 500 µl OptiMEM in zwei Reagiergefäßen vorgelegt, und 10 µg DNA in das eine und 50 µl Lipofectamine 2000 in das andere Gefäß gegeben. Die Suspensionen wurden mit der Pipette durchmischt und dann zusammengeführt, indem die DNA-Lösung langsam in die Lipofectamine 2000 Suspension gegeben wurde. Die Suspension wurde danach für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise zu den Zellen gegeben und mittels Rütteln verteilt. Nach 3-6 Stunden wurde das Medium gewechselt, die Zellen wurden 24-36 Stunden nach der Transfektion weiter verarbeitet.

Sollten andere Kulturgefäße, z.B. 24-*well*-Platten verwendet werden, wurden die Mengen gemäß der Herstellerangaben angepasst.

4.3.4.1.3. Transfektion mit TransIT-COS Transfektion Kit

Für die Transfektion von COS-7 Zellen wurde das TransIT-COS Transfektion Kit verwendet. COS-7 Zellen wurden nach folgendem Ansatz in 24-*well*-Platten transfiziert.

Die COS-7 Zellen werden am Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro *well* ausgesät.

Folgender Ansatz wurde zur Transfektion eingesetzt:

Zu 50 µl OptiMEM Medium wurde 1 µl TransIT-COS Reagenz zugegeben; die Suspension wurde gevortext und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 0,25 µl TransIT-COS Boss Reagenz zugegeben und der Ansatz mit der Pipette durchmischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 20 Minuten, nach der 500 ng der zu transfizierenden DNA zugegeben wurden, gefolgt von weiteren 20 Minuten Inkubation. Danach wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 3-6 Stunden wurde das Medium gewechselt, nach 24 Stunden wurden die Zellen weiter verarbeitet.

4.3.4.2. Transfektion durch Elektroporation

Patienten- und Kontroll-Fibroblasten wurden mittels Elektroporation transfiziert, da die liposomale Transfektion sehr ineffizient war.

Bei der Elektroporation wird die Plasmamembran durch einen Spannungspuls für DNA durchlässig gemacht, so dass die Plasmid-DNA aus dem Umgebungsmedium in die Zelle eindringt.

Zur Transfektion wurde das Nucleofector-System mit dem Kit für adulte humane Fibroblasten von Amaxa verwendet. Die zu transfizierenden Zellen wurden trypsiniert und

gezählt. Dann wurden 5×10^5 Zellen pro Ansatz mit 2 µg hochreinsten Plasmid-DNA und 100 µl der Nucleofector-Lösung vermischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Dann wurde am Nucleofector-Gerät das Programm U-23 (hohe Effizienz) oder P-22 (hohe Überlebensrate der Zellen) gewählt und durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen aus der Küvette entnommen und in eine Kulturschale überführt. Die Expression rekombinanter Proteine konnte nach 12-16 Stunden beobachtet werden.

4.3.5. Immunzytochemie

COS-7 Zellen oder hippocampale Neurone aus der Ratte wurden auf 12 mm Deckgläsern in einer 24-well-Kulturplatte kultiviert. Im Falle einer Transfektion wurde diese mit Lipofectamine 2000 oder Metafectene/Pro nach Herstellerangaben durchgeführt. 24 Stunden nach der Transfektion oder (im Falle der Neurone) nach 7 Tagen in Kultur wurden die Zellen bei Raumtemperatur in 4 % PFA-Lösung für 20 Minuten fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit einer Lösung von 0,5 % Triton X-100 und 5 % Chemiblocker oder BSA inkubiert. Dies permeabilisierte die Zellen und blockierte unspezifische Bindungen. Darauf folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur, gefolgt von drei Waschschritten mit PBS und der anschließenden einstündigen Inkubation mit dem Fluorophor-markierten sekundären Antikörper unter Lichtausschluss.

Abschließend wurden die Zellen noch dreimal gewaschen und dann mit ProLong Antifade Reagenz auf Objektträgern eingebettet.

Die Bilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 System aufgenommen.

4.3.6. Grundsätzliches zur Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Verwendung fluoreszenzmikroskopischer Methoden sind einige grundlegende Aspekte zu beachten, um eine optimale Bildgebung zu erreichen.

Der augenscheinlichste Punkt ist die Auflösung eines Bildes, die niedrigste Distanz bei der zwei Punkte des Bildes voneinander getrennt sichtbar sind. Die optische Auflösung eines Bildes wird größtenteils durch die numerische Apertur des verwendeten Objektivs im Zusammenhang mit dem eingesetzten Kondensator und der Wellenlänge des verwendeten Lichts bestimmt. Hier gilt das Abbe'sche Gesetz, so dass die vereinfachte Formel $R = 0,61 \cdot \lambda / NA^{obj}$ (R =Auflösung, λ =Wellenlänge des verwendeten Lichts, NA^{obj} =Numerische Apertur des Objektivs) zur Berechnung der maximalen Auflösung des optischen Systems herangezogen werden kann. Hierbei ist zu beachten, dass die Vergrößerung die Auflösung nicht beeinflusst. Ein weiterer Richtwert ist, dass die Vergrößerung nicht größer als das

tausendfache der numerischen Apertur sein sollte, da ab diesem Punkt nur noch das Bild vergrößert wird, aber keine Verbesserung der Auflösung eintritt.

Der nächste Schritt, die Digitalisierung des Bildes, wandelt den kontinuierlichen Farb- und Intensitätsverlauf des optischen Bildes in eine elektronisch verarbeitbare Form um. Dazu wird das Bild in kleine, normalerweise quadratische Blöcke aufgeteilt (Pixel) und danach jedem Pixel ein diskreter Helligkeitswert zugeteilt. Diese Schritte heißen *digital sampling* und *pixel quantisation*. Bei der *pixel quantisation* ist entscheidend, mit welcher Bit-Tiefe das Bild aufgenommen wird. Die Bit-Tiefe legt fest, wieviele Abstufungen benutzt werden um diskrete Helligkeits- und Farbwerte darzustellen und legt die Farb- und Intensitätsauflösung des Bildes fest.

Das *digital sampling* betrifft die räumliche Auflösung des Bildes, so dass die Bit-Tiefe hier nicht zum Tragen kommt. Um ein scharfes Bild zu erhalten, muss die Anzahl der Pixel pro aufgenommenem Bildpunkt groß genug sein, um die optische Auflösung wiederzugeben. Bei konventioneller (Fluoreszenz-)Lichtmikroskopie wird die maximale Pixelzahl durch die Größe des CCD-Chips der Kamera festgelegt, bei Laserscan-Mikroskopen durch die Pixelzahl des Detektors.

Prinzipiell ist eine möglichst hohe Pixelzahl wünschenswert, um die optische Auflösung ohne Informationsverlust in das digitale Format zu übertragen. Dazu sollte die digitale Auflösung gleich oder größer der optischen Auflösung des Mikroskopes sein. Die Grundlage dazu ist im Nyquist Theorem beschrieben und besagt, dass der Messintervall (die Anzahl der Pixel) mindestens das Doppelte der höchsten Auflösung betragen muss. Vereinfacht gesagt bilden zwei Pixel den Abstand R (die optische Auflösung) ab, bei besonders hochaufgelösten Bildern werden drei Pixel verwendet. Durch die Beachtung dieser Regeln wird ein Informationsverlust während des Digitalisierens vermieden und die optimale Auflösung eines Bildes erreicht.

Weitere Faktoren mit großem Einfluss sind die Signalstärke und die *signal-to-noise-ratio*. Bei Verwendung von Fluoreszenz-Mikroskopie korreliert die Signalstärke mit der Menge an gebundenem Primär- und Sekundärantikörper im Falle von immunzytochemischer Detektion und mit dem Expressionspiegel, wenn fluoreszierende Fusionsproteine eingesetzt werden. Eine optimale Signalstärke liefert ein Signal, das mit möglichst geringer elektronischer Verstärkung und niedriger Anregungsenergie zu detektieren ist. Dadurch wird das Ausbleichen des Präparates während der Bildaufnahme reduziert und die Anregung von Autofluoreszenz durch hohe Lichtintensität vermieden.

Die *signal-to-noise-ratio* beschreibt den Unterschied zwischen Signal und Hintergrundrauschen. Hauptsächlich Quellen für Hintergrundrauschen sind hohe elektronische Verstärkung (resultierend aus einer niedrigen Signalstärke) und Streulicht.

Streulicht kann aus Ebenen ausserhalb des Fokus kommen oder durch ungünstige Filterkombinationen mit detektiert werden. Bei der Wahl der Filter ist darauf zu achten, dass die Filter möglichst eng an die gewünschten Wellenlängen von Excitation und Emission angepasst sind, insbesondere bei Mehrfachfluoreszenzen ist darauf zu achten, dass die Wellenlängen sich nicht überschneiden. Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion von Streulicht ist die Verwendung eines konfokalen Systems, da hier das Streulicht aus anderen Ebenen als der Fokusebene den Detektor nicht erreicht.

4.3.7. VSV-G Transport Experimente

Der intrazelluläre Transport des *vesicular stomatitis virus-glycoproteins* (VSV-G) kann mit Hilfe einer temperatursensitiven Mutante des VSV-G, an die GFP gekoppelt ist, untersucht werden.

Hierzu werden HeLa-Zellen mit dem Fusionskonstrukt und putativen Effektorstrukturen kotransfiziert. Die Zellen werden nach der Transfektion für 2-3 Stunden bei 37 °C inkubiert, danach wird die Temperatur auf 39,5 °C erhöht, um eine reversible Fehlfaltung und die daraus resultierende Retention im ER zu induzieren. Die Zellen bleiben am besten über Nacht, mindestens aber 10 Stunden bei 39,5 °C.

Um den Transport zu visualisieren, werden die Zellen zunächst für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dies führt zu einem eindeutigen Bild bei t_0 , danach wird 32 °C warmes Medium zu den Zellen gegeben. Zu den Zeitpunkten t_0 , t_{30} und t_{60} werden die Zellen dann in 3 % PFA, pH 7,4 für 15 Minuten fixiert. Falls notwendig, können die Zellen danach noch immunzytochemisch gefärbt oder direkt eingedeckelt werden.

4.3.8. FRAP

Um die Dynamik von Alpha-Actinin-1-GFP in Kontroll- und Patientenfibroblasten zu untersuchen, wurde *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) verwandt. Hierbei wird ein definierter Bereich in der Zelle durch hohe Laserintensität gebleicht und die Rückkehr der Fluoreszenz in den gebleichten Bereich gemessen. Dadurch kann einerseits bestimmt werden, welcher Teil der Fluorophor-Population in dem gebleichten Areal mobil ist und welcher stationär und andererseits kann die Geschwindigkeit der Rückkehr bestimmt werden.

Um diese Experimente durchzuführen, wurden Kontroll- und Patientenfibroblasten mittels Elektroporation mit Alpha-Actinin-1-GFP transfiziert und auf Deckgläsern ausgesät.

24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit einem Leica TCS 4D Mikroskop mit den entsprechenden Filtern und einem PL Fluotar Objektiv (100×, 1.3 NA) gesteuert durch die Software SCAN Ware 5.10 aufgenommen.

Für das FRAP-Experiment wurden für jede untersuchte Zelle fünf zu bleichende Bereiche und ein Referenzbereich festgelegt. Dann wurden fünf Bilder vor dem Bleichvorgang aufgenommen, der Bleichvorgang mit 100 Iterationen vorgenommen und 60 Bilder im Abstand von 1,5 Sekunden zur Verfolgung der Fluoreszenzintensität aufgenommen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und Graphpad.

4.3.9. EGF Aufnahme-Experimente

Ein etabliertes Modell zur Untersuchung von Rezeptorinternalisierungen und der daraus resultierenden Signaltransduktion ist die Stimulation von Zellen mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*). Die Zellen werden durch Serumentzug ausgehungert und dann mit EGF stimuliert. Die Internalisation kann durch den Einsatz von fluoreszenzmarkiertem EGF am Mikroskop verfolgt werden, die Signaltransduktion kann durch den Nachweis von Phosphorylierungen dargestellt werden.

Den Zellen wurde 24 Stunden vor dem Versuch das Serum entzogen. Eine Stunde vor Durchführung des Versuchs wurden die Zellen in einem Nass-Eisbad gekühlt inkubiert. Dadurch wurde das *Recycling* des EGF-Rezeptors gestoppt, so dass ein nur auf die Stimulation zurückzuführendes Signal verfolgt werden konnte. Dem Medium wurde zu diesem Zeitpunkt 100 ng EGF / ml zugegeben. Nach Ablauf der Stunde wurden die Zellen dann in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert und nach 0, 2, 5 und 10 Minuten zur mikroskopischen Analyse mit 4 % PFA fixiert (siehe 4.3.6.) oder zur Analyse der Phosphorylierungen lysiert (siehe 4.4.1. und 4.4.7.).

4.4. Proteinbiochemie

4.4.1. Expression von GST-Fusionsproteinen

Die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E.coli* liefert große Mengen an rekombinantem Protein, das für *in vitro* Untersuchungen zur Proteinbindung verwendet werden kann.

Bei der Expression sind mehrere wichtige Punkte zu berücksichtigen. Durch die große Menge an Protein kann es zu Degradationen des Fusionsproteins durch die Bakterien kommen, einem Umstand dem durch die Verwendung von Stämmen mit deletierten Proteasen entgegengewirkt werden kann.

Ein zweiter Faktor ist die Induktion der Proteinexpression, die durch drei Faktoren gesteuert werden kann: die Dauer und Stärke der Induktion und die Temperatur während

Wachstums- und Induktionsphase. Der wichtigste dieser Faktoren ist die Temperatur, sie steuert die generelle Aktivität und die Wachstumsrate der Bakterien und hat dadurch den größten Einfluss. Die Induktionsstärke wird durch die Menge an IPTG reguliert. IPTG induziert den T7-Promotor der Bakterien und dadurch die Expression des GST-Fusionsproteins. In Abhängigkeit von der Temperatur kann so die Geschwindigkeit der Proteinexpression gesteuert werden, allerdings kann auch hier eine Sättigung erreicht werden und bei zu hoher IPTG-Menge auch eine durch die große Proteinmenge bedingte schnellere Degradation des Fusionskonstrukts hervorgerufen werden. Die Dauer der Induktion ist im Zusammenhang mit der Wachstumskurve der Bakterien zu beachten. Wenn die Kulturen überwachsen, beginnen die Bakterien abzusterben und damit das Fusionsprotein zu degradieren. Die optimale Dauer, Induktionsstärke und Temperatur müssen in Pilotexperimenten bestimmt werden, um möglichst undegradiertes Fusionsprotein zu erhalten.

Um GST-Fusionsproteine zu exprimieren, wurden in dieser Arbeit *E.Coli* BL21-Gold(DE3)pLysS Bakterien (Amersham) verwendet. Bei allen Arbeiten mit diesem Stamm wurde zusätzlich zum Selektionsmedium für das transformierte Plasmid Chloramphenicol (30 µg/ml) eingesetzt, um eine Kontamination auszuschließen. Das hier beschriebene Protokoll wurde als Ausgangspunkt verwendet, wenn Optimierungsschritte notwendig waren.

Die Bakterien wurden mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und einzelne Klone in 2 ml 2 x YTA-Medium über Nacht angezogen. 100 µl dieser Kultur wurden am nächsten Morgen in 2 ml frisches Medium gegeben und für 2 h bei 37 °C geschüttelt. Dann wurde ein Aliquot von 100 µl entnommen (Kontrolle ohne Induktion) und der Rest der Kultur mit 0,25 mM IPTG bei 37 °C induziert. Nach 2 h wurden weitere 100 µl entnommen (Induktion). Beide Proben wurden mit 2 x Ladepuffer für 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht und die Expression des Fusionskonstruktes mittels SDS-PAGE und *Western blot* untersucht.

Von positiven Klonen wurde eine 10 ml Kultur über Nacht angesetzt. Diese Kultur wurde am nächsten Morgen in 250 ml 2 x YTA inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Dann wurde mit 0,25 mM IPTG für 4 Stunden bei 37 °C induziert. Danach wurden die Bakterien bei 4000 x g für 10 Minuten pelletiert und das Pellet in 10 ml TEN-Puffer (50 mM Tris pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,3 mM NaCl) aufgenommen. Dann erfolgte die Zugabe von 1 ml Lysozym (10 mg/ml in TEN) und 4 mM DTT und eine Inkubation von 15 Minuten auf Eis. Nach dieser Inkubation wurden 200 µl 10% NP-40 zugegeben und das Lysat über Nacht bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Morgen wurde das Lysat auf Eis aufgetaut und 15 mL NaCl-Mg (1,5 M NaCl, 12 mM MgCl₂) und 100 µg DNaseI zugegeben.

Es folgte eine einstündige Inkubation auf Eis, während der das Lysat immer wieder mit einer 10 ml-Pipette dissoziiert wurde. Danach wurde das Lysat bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Fusionsprotein befand sich im Überstand und wurde, wenn notwendig, unter Verwendung einer Amicon-Ultra-Säule bei 3000 x g und 4°C konzentriert. Der Überstand wurde dann aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und *Western blot*.

4.4.2. GST-Pulldown-Experimente

GST-*Pulldown*-Experimente werden verwendet, um Proteinbindungen *in vitro* nachzuweisen und können dazu verwendet werden Interaktionsdomänen und Bindungseigenschaften zu untersuchen.

Um Proteindegradationen vorzubeugen, wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt und wiederholtes Auftauen der Proteinextrakte vermieden. Im Vorfeld des GST-*Pulldowns* ist die optimale Beladung der GSH-Sepharose mit GST-Fusionsprotein zu bestimmen. Hierbei wird untersucht wieviel rekombinantes Protein eingesetzt werden muss, um die GSH-Sepharose vollständig zu beladen und so die Effizienz des *Pulldowns* zu maximieren. In diesem Schritt kann auch eine Degradation des GST-Fusionsproteins geprüft werden und Veränderungen der Puffer und Temperatur ausprobiert werden.

Die eingesetzten Bindungspartner und unterschiedlichen GST-Konstrukte sollten im Vorfeld so titriert werden, dass sie eine möglichst gleichförmige Detektion im *Western blot* erlauben. So kann verhindert werden, dass Schwankungen in der Proteinkonzentration einzelner Konstrukte die Ergebnisse verfälschen.

In dieser Arbeit wurde das folgende Protokoll verwendet.

50 µl eines 50/50 GSH-Sepharose 4B (Amersham)/PBS-Gemisches wurde mit der vorher bestimmten Menge an GST-Fusionsprotein für 2 Stunden bei 4 °C und Rotation inkubiert. Danach wurde die Probe für 1 Minute bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand zur späteren Analyse entnommen. Die sedimentierte Sepharose wurde mit 1 ml Lysispuffer gewaschen und erneut 1 Minute bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und 300 µl des Zelllysates mit dem zu untersuchenden Bindungspartner zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C und Rotation für 4 Stunden. Dann wurde die Sepharose dreimal wie oben beschrieben gewaschen und dann mit 25 µl 2 x Ladepuffer und 25 µl Lysispuffer für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, wodurch die Proteine von der Sepharose gelöst werden. Danach wurde die Sepharose bei 13000 x g für 1 Minute sedimentiert und Aliquots des Überstandes mittels SDS-PAGE und *Western blot* untersucht.

4.4.3. Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann je nach Zelltyp entweder durch Abspülen der Zellen von der Kulturschale (HEK293, HeLa) oder durch Abkratzen mit einem Zellschaber aus Kunststoff (COS, Fibroblasten, MDA-MB468) aus der Gewebekulturschale in 10 ml PBS entnommen. Die Zellen wurden bei 500 x g sedimentiert und dann in eiskaltem Lysispuffer für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile bei 16000 x g für 20 Minuten abzentrifugiert und der Überstand entnommen. Der Überstand wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Alternativ wurden die Zellen mit PBS gewaschen, das PBS vollständig abgesaugt und die Kulturschale in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Danach konnte die Kulturschale bei -80 °C aufbewahrt werden. Um den Extrakt herzustellen wurde die Schale dann auf Eis inkubiert, und nach dem Antauen der Zellen, erkennbar durch leichten Niederschlag der Luftfeuchtigkeit, wurden 500 µl - 3 ml eiskalter Lysispuffer zu den Zellen gegeben. Nach 20 Minuten auf Eis wurden die Zellen abgespült oder mit dem Zellschaber abgekratzt und das Lysat für 20 Minuten bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Für Elisa-Experimente wurden die Extrakte nach Herstellerangabe präpariert. Hierzu wurden die Zellen auf einer 10 cm - Schale kultiviert, eventuelle Behandlungen durchgeführt und die Zellen danach mit eiskaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde abgenommen und die Zellen für 10 Minuten mit 500 µl Elisa-Lysispuffer (#9803 Cell Signalling) auf Eis inkubiert. Danach wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 Minuten bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

4.4.4. Differentielle Fraktionierung

Da Ataxin-2 eine geringe Abundanz aufweist, wurde die differentielle Fraktionierung eingesetzt, um Proteinextrakte mit einem höheren Anteil an Ataxin-2 für die Immunpräzipitation von endogenen Komplexen zu isolieren.

Als Ausgangsmaterial wurden 4 Mäusehirne in 10 ml Fraktionierungspuffer (0,25 M Sucrose, 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 200 µg/ml Cycloheximide, 1 % Phosphatase Inhibitor Cocktail 1+2 (Sigma), 250 U/ml RNAsin, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF) im Dounce-Homogenisator homogenisiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellkerne und Zelltrümmer wurden dann bei 1000 x g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Vom

Überstand wurde ein Aliquot entnommen. Der postnukleäre Überstand wurde bei 10000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, um die Mitochondrien zu sedimentieren. Das mitochondriale Pellet wurde in Lysis-Puffer aufgenommen und ein Aliquot entnommen, ebenso vom postmitochondrialen Überstand. Der postmitochondriale Überstand wurde dann bei 100000 x g und 4 °C für eine Stunde zentrifugiert (der Überstand bildet die zytosolische Fraktion), das Pellet wurde in 2-3 ml Lysispuffer (50 mM Hepes, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 150 mM NaCl, 5 % Glycerin, 0,1 % NP-40, cOmplete™ Protease-Inhibitor Tablette (Roche), 1mM PMSF) aufgenommen und bildet die leichte Membranfraktion. Die zytosolische Fraktion wurde dann mit Millipore-Amicon Säulen bei 4000 x g und 4 °C konzentriert, bis das Volumen an die leichte Membranfraktion angeglichen war. Von beiden Fraktionen wurden Aliquots zur Analyse entnommen.

Die Analyse der Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und *Western blot*. Hierzu wurden die prozentualen Anteile der Fraktionen berechnet und die Lademengen angeglichen, um die unterschiedlichen Volumina der Fraktionen auszugleichen.

Als Markerproteine zur Überprüfung der Fraktionierung wurden verwendet:

Zytosolische Fraktion	EEA1
Leichte Membranfraktion	Calnexin

4.4.5. Bestimmung des Proteingehaltes von Extrakten

Um den Proteingehalt eines Zellextraktes zu bestimmen, wurde eine photometrische Proteinbestimmung nach Bradford mittels Rotiquant durchgeführt. Dazu wurde Rotiquant im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und 100 µl dieser Verdünnung mit 1 µl Proteinextrakt vermischt. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Referenz wurden BSA-Lösungen bekannter Konzentration eingesetzt und mittels linearer Regression die Funktion der Referenzgeraden bestimmt. Die Proteinkonzentration des Zellextraktes wurde durch Einsetzen der gemessenen Absorption in diese Funktion errechnet. Um Messfehler zu reduzieren, wurde jede Messung als Triplikate durchgeführt.

4.4.6. Diskontinuierliche SDS-PAGE

Bei dieser Methode werden Proteine in einem Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gel entsprechend ihrer Ladung und Größe aufgetrennt. Das im Ladepuffer enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken, durch das SDS werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgebrochen und diese in eine ellipsoide Form gezwungen.

So können die Proteine entsprechend ihrer Ladung, die proportional zu ihrer Größe ist, elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden ein Sammel- und ein Trenn-Gel übereinander geschichtet. Das niedrig-prozentige Sammelgel führt dazu, dass sich an der Grenze zum Trenngel eine scharfe Proteinbande bildet, die ein reproduzierbares Eintreten in das Trenngel sicherstellt.

In dieser Arbeit wurden 8-12 %-ige Trenngele (Tabelle 2) verwendet, auf die ein 3,9 %-iges Sammelgel geschichtet wurde. Die Elektrophorese wurde in Biometra-Elektrophorese-Kammern in Laufpuffer (25 mM Tris, pH 8,1-8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) durchgeführt.

Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese mit Ladepuffer (250 mM Tris/HCl, 20 % Glycerol, 4 % SDS, 10% β -Mercaptoethanol, 0,005 % Bromphenolblau und 5 % Wasser) für 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mittels *Western blot* (siehe 4.4.7.) oder Silberfärbung (siehe 4.4.12.) weiter bearbeitet.

	8 %	10 %	12 %	Sammelgel
30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid	4 ml	5 ml	6 ml	650 μ l
Tris/HCl pH 8,9	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
Tris/HCl pH 6,9	-	-	-	1,25 ml
Wasser	7,05 ml	6,05 ml	5,05 ml	3,05 ml
10 % SDS	150 μ l	150 μ l	150 μ l	50 μ l
10 % APS	50 μ l	50 μ l	50 μ l	25 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l	5 μ l

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamid-Gele

4.4.7. *Western blot*

Beim *Western blot* werden Proteine durch Elektrophorese aus einem Gel auf eine Membran aus Nitrozellulose oder Polyvinylidifluorid (PVDF) übertragen, wo sie aufgrund hydrophober Wechselwirkung haften bleiben und somit für Antikörper zur Immundetektion zugänglich. Das Trennungsmuster aus dem Gel bleibt hierbei erhalten.

In dieser Arbeit wurde ein *Western-blot*-Protokoll verwendet, bei dem die Proteine im *Tank-blot*-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen wurden.

Die PVDF-Membran wurde in Methanol angefeuchtet und dann blasenfrei auf das Gel aufgelegt. Auf die Membran und auf die andere Seite des Gels wurde dann mit Transfer-Puffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % Methanol) angefeuchtetes Whatman-Filterpapier gelegt. Dieses *sandwich* wurde zwischen zwei in Transfer-Puffer getränkte Faser-

Schwämme gelegt und in den Tank eingesetzt. Der Transfer wurde mit 100 V / 250 mA für eine Stunde durchgeführt.

4.4.8. Immundetektion

Mittels Immundetektion werden Proteinbanden auf PVDF-Membranen aus *Western blot*-Experimenten sichtbar gemacht. Die Immundetektion basiert auf der Bindung von Antikörper und Epitop. Ein primärer Antikörper bindet spezifisch an ein oder mehrere Epitope auf einem Protein. Nachdem diese Bindung stattgefunden hat, wird ein sekundärer Antikörper gegen die Immunglobulinklasse des primären Antikörpers eingesetzt. Dieser sekundäre Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) konjugiert. Das Enzym HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol oder dessen Derivaten in die oxidierte Form, wobei eine detektierbare Chemilumineszenz entsteht. Diese Lumineszenz kann dann auf Röntgenfilmen dauerhaft abgebildet werden.

Zunächst wurden die Membranen mit einer Lösung von 5 % Magermilchpulver in PBS mit 0,1 % Tween20 (PBS-T) für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Dann folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in PBS-T, die abhängig vom Antikörper von einer Stunde bei Raumtemperatur bis zur Inkubation über Nacht bei 4 °C variiert wurde. Danach wurde die Membran dreimal in PBS-T gewaschen, und dann mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert und erneut dreimal mit PBS-T gewaschen. Danach erfolgte die chemilumineszente Detektion mittels des ECL-Pico-Kits der Firma Pierce. Diese Lumineszenz wurde zur Belichtung von Röntgenfilmen verwendet.

4.4.9. Elisa (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Ein Elisa ist eine immunologische Nachweismethode, die spezifische Antikörper zur Messung diverser Faktoren einsetzt. In dieser Arbeit wurde Elisa zum quantitativen Nachweis von Phosphorylierungen verwendet.

Das Elisa-Prinzip basiert auf einem immobilen Antikörper, der das Messobjekt bindet, und einem sekundären Detektionssystem, bei dem ein weiterer Antikörper gegen das Messobjekt eingesetzt und durch einen sekundären Antikörper nachgewiesen wird. Dadurch kann anhand der Stärke der Immunreaktion die Menge des Messobjektes quantifiziert werden.

Zellysate (4.4.1.) wurden so verdünnt, dass die Proteinkonzentration für den jeweiligen Elisa im optimalen Bereich lag. Danach wurden 100 µl der Lysate mit 100 µl Verdünnungs-Lösung (0,1 % Tween-20, 0,1 % Natrium-Azid) gemischt und in die einzelnen

Wells der Elisa-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde dann mit Klebefolie dicht verschlossen und über Nacht bei 4 °C und orbitalem Schwenken inkubiert. Danach wurden die einzelnen Wells der Mikrotiterplatte viermal mit 200 µl Waschpuffer (1 % Tween-20, 0,5 % Kathon® CG/ICP in PBS) gewaschen und dann 100 µl der Detektionsantikörperlösung zugegeben. Die Platte wurde wieder so mit Folie abgedichtet, dass die Wells gut verschlossen waren und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Erneut wurde viermal gewaschen und dann für 30 Minuten bei 37 °C mit 100 µl einer Lösung mit HRP-gekoppeltem Sekundär-Antikörper inkubiert. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde viermal gewaschen und dann 100 µl einer TMB-Lösung (0,05 % 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin, 0,1 % H₂O₂) zugegeben und mit dieser 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der 10 Minuten wurden 100 µl Stop-Lösung (0,05 % eines ungesättigten α - und β -Carbonyls) zugegeben und die Absorption bei 450 nm innerhalb der nächsten 30 Minuten auf einem Tecan Infinite M200 *Platereader* gemessen.

4.4.10. Koimmunpräzipitation

Zum Nachweis einer Komplexformierung zweier Proteine wurde die Koimmunpräzipitation eingesetzt. Hierbei wird mit einem spezifischen Antikörper einer der Komplexpartner präzipitiert und der mögliche Komplexpartner im Präzipitat detektiert.

Einige Maßnahmen zur Optimierung der Koimmunpräzipitation sollten bei der Planung des Experiments in Betracht gezogen werden. Als erstes ist zu prüfen, ob beide Proteine in ausreichender Menge vorhanden und detektierbar sind. Bei geringer Abundanz eines Proteins empfiehlt sich die Fraktionierung des Ausgangsmaterials, um eine höhere Proteinkonzentration zu erlangen. Ein weiterer Vorteil hierbei ist, dass mögliche kreuzreagierende Proteine aus dem Lysat eliminiert werden, wenn sie in anderen Fraktionen vorliegen. Zusätzlich liefert die Fraktionierung Daten über die subzelluläre Verteilung eines Proteins.

Ein weiterer zu beachtender Faktor ist die Auswahl der geeigneten Präzipitationsmatrix. Abhängig vom Subtyp des eingesetzten Antikörpers können mit Protein A oder Protein G gekoppelter Agarose oder einem Gemisch aus beiden bessere Präzipitationen erzielt werden. Einhergehend mit dieser Optimierung sollte auch die Menge des Antikörpers so eingestellt werden, dass der Antikörper im Verhältnis zum Epitop im Überfluss ist, also im Idealfall sämtliches Protein mit dem Antikörper komplexiert und dann mit der Agarose, die im Verhältnis zum Antikörper im Überfluss vorliegt, präzipitiert wird. Durch diese Optimierung wird sichergestellt, dass die Präzipitation des Antikörpers und des gebundenen Proteins optimal durchgeführt wird und dadurch die Detektion des Bindungspartners erleichtert wird.

Besondere Aufmerksamkeit sollte auch der Zusammensetzung des Lysispuffers gewidmet werden. Die Detergenzkonzentration ist hier der wichtigste Faktor, sie sollte so gewählt sein, dass möglichst viel Protein bei der Extraktion in Lösung geht, aber nicht so hoch, dass sie schwache Bindungen zwischen Proteinen löst.

Um Koimmunpräzitationen durchzuführen, wurden Proteinextrakte für mindestens 12 Stunden bei 4 °C und Rotation mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Die Antikörper-Protein-Komplexe wurden mit Protein A/G Agarose bei 4 °C und Rotation für zwei Stunden präzipitiert. Die Agarose wurde dann bei 1500 x g sedimentiert und drei- bis fünfmal mit Lysispuffer gewaschen. Die sedimentierte Agarose wurde nach dem letzten Waschschrift mit SDS-Ladepuffer bei 95 °C für 5 Minuten aufgekocht und die Überstände danach mit SDS-PAGE und *Western blot* analysiert.

4.4.11. 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wird verwendet, um Proteine aus komplexen Proteingemischen durch zwei orthogonal zueinander ausgeführte Trenntechniken in hoher Auflösung zu isolieren.

Die in dieser Arbeit abgebildeten Gele wurden verwendet, um einen Protein-*spot* für *Similar to golgin-like* (SIM) zu isolieren und mittels Massenspektrometrie die Aminosäuresequenz zu bestimmen.

Für die erste Dimension wurde ein 10 % Tricin, 6 M Urea-Polyacrylamid-Gel verwendet, das nach der Elektrophorese in einer sauren Lösung (100 mM Tris, 150 mM HCl, pH 2) für 30 Minuten in 50-100-fachem Gelvolumen inkubiert wurde. Danach wurde die zweite Dimension in einem 16 % Tricin-Gel aufgetrennt.

Diese Methode wurde bereits verwendet, um mitochondriale Komplexe mit hydrophoben Membran-assoziierten Proteinen in hoher Auflösung zu analysieren. Im Falle von SIM sollte durch die pH-Verschiebung eine bessere Trennung von dem *spot* der schweren Kette des in der Immunpräzitation eingesetzten Antikörpers erreicht werden, der im eindimensionalen Gel auf derselben Höhe läuft.

4.4.12. Silberfärbung von Proteinen

Um Protein-*spots* oder Banden aus Gelen zu isolieren und dann massenspektrometrisch weiterzubearbeiten, müssen diese im Gel sichtbar gemacht werden. Die Silberfärbung nutzt das Prinzip aus, dass Silberionen von den Seitenketten der Aminosäuren Asparaginsäure, Cystein und Glutaminsäure reduziert werden. Diese Reduktion dient einer nachfolgenden

Entwicklerreaktion als Kristallisationskeim für die Reduktion weiterer Silberionen, bis sich an der Stelle im Gel, an der sich Proteine befinden, braune bis schwarze Flecken abzeichnen. Die Silberfärbung zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 ng.

Die in dieser Arbeit erstellten Gele wurden zuerst für 15 Minuten in 50 % Methanol / 10 % Essigsäure / 100 mM Ammonium-Acetat fixiert. Hierbei war zu beachten, dass Carbonyl-freies Methanol verwendet wurde, wenn eine Analyse mit Massenspektrometrie geplant war. Danach wurden die Gele zweimal mit Wasser für 30 Minuten gewaschen. Es folgte eine Sensibilisierung des Gels durch eine Inkubation mit 0,005 % Thiosulfat für 15 Minuten. Nun wurde das Gel für 15 Minuten mit einer 0,1 % Silber-Nitrat-Lösung inkubiert und danach sofort für wenige Sekunden mit Wasser gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des Entwicklers, einer 0,036 % Formaldehyd / 2 % Natrium-Carbonat Lösung für 1-2 Minuten. Die Entwicklerreaktion wurde gestoppt, indem das Gel für 15-60 Minuten in eine 50 mM EDTA-Lösung gelegt wurde. Wenn eine massenspektrometrische Auswertung geplant war, wurde die Lösung nach ca. 5 Minuten erneuert, um die Konzentration von später störendem Formaldehyd so schnell wie möglich zu reduzieren. Nach der Inkubation wurde das Gel zweimal mit Wasser gewaschen und konnte direkt weiterbearbeitet oder aber für mehrere Tage gelagert werden.

4.5. Transkriptomanalyse

4.5.1. RNA-Extraktion

Gesamt-RNA wurde aus Cerebellum, Mittelhirn und Leber von Wildtyp- und SCA2-Knock-Out Mäusen mit Trizol®-Reagenz gewonnen. Zu 50-100 mg Gewebe wurde 1 ml Trizol®-Reagenz gegeben und das Gewebe mit einem Pellet Pestle® Motor homogenisiert. Die Proben wurden dann zur vollständigen Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform zu den Homogenaten gegeben, der Ansatz 15 Sekunden kräftig geschüttelt und dann für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Homogenat wurde dann bei 4 °C mit 12000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Während der Zentrifugation bilden sich drei Phasen, eine Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine wässrige Phase. Die RNA befindet sich in der wässrigen Phase, die oberhalb der Interphase liegt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Hier wurden dann 500 µl Isopropanol zugegeben um die RNA zu präzipitieren. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur gefolgt von zehn Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g befand sich die RNA in einem gelartigen Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und das Pellet mit 1 ml 75 % EtOH bei 4 °C mit 7500 x g für

fünf Minuten gewaschen. Der Überstand wurde entnommen und die RNA luftgetrocknet, bevor das Pellet in 50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und für zehn Minuten bei 60 °C inkubiert wurde. Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wurde mit einem Photometer die Absorption bei 260 nm gemessen.

4.5.2. DNase I Behandlung der RNA-Proben

Mit der DNase Behandlung wurden Verunreinigungen durch genomische DNA aus den RNA-Proben entfernt. Dazu wurde folgender Ansatz gemacht:

RNA	1 µg
DNase Reaktions-Puffer 10X	1 µl
DNase I (1U/µl)	1 µl
DEPC-Wasser	auf 10 µl

Dieser Ansatz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA wurde die Reaktion gestoppt, und die Proben bei 65 °C für 10 Minuten inkubiert. Die Reverse Transkription der RNA-Probe wurde dann direkt durchgeführt oder die Probe wurde bei -20 °C eingefroren.

4.5.3. cDNA Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das *First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Fermentas verwendet. Als Template der Reaktion wurde DNase behandelte RNA verwendet.

Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

RNA, DNase behandelt	10 µl (= 1 µg RNA)
Random hexamer primer (0,2 µg/µl)	1 µl

Nach Zugabe des Primers wurde die Probe für 5 Minuten auf 70 °C erhitzt. Danach wurden in dieser Reihenfolge zugegeben:

Reaktionspuffer 5 x	4 µl
RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
dNTP-Mix 10 mM	2µl

Danach wurde die Probe durchmischt und mittels kurzer Zentrifugation alle Tropfen zusammengeführt. Darauf folgte eine fünfminütige Inkubation bei 25 °C nach der 2 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl) zugegeben wurden.

Der Reaktionsansatz wurde dann bei 25 °C für 10 Minuten und danach bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Aufheizen auf 70 °C für 10 Minuten gestoppt. Die hergestellte cDNA wurde auf Eis gekühlt und dann bei -20 °C eingefroren.

4.5.4. Quantitative *real-time* RT-PCR

Quantitative *real-time* RT-PCR wurde mit einem ABI Prism 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) in 96-well *Optical Reaction* Platten (Applied Biosystems) durchgeführt. Der folgende Ansatz wurde für jedes *well* der Platte angesetzt.

cDNA (25-30 ng)	6 µl
Taqman® Assay	1 µl
Taqman® Universal PCR Master Mix	10 µl
No AmpErase®UNG	
DEPC-Wasser	3 µl

Die PCR wurde nach dem folgenden Schema (Abb. 7) durchgeführt:

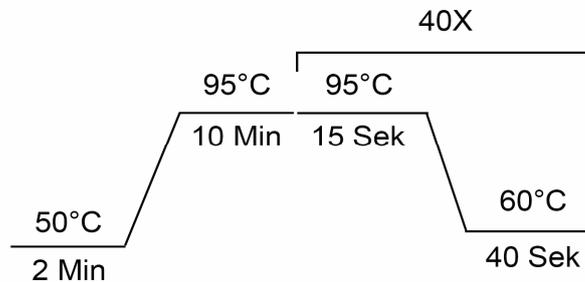


Abbildung 7: Schematische Abbildung des Taqman® PCR-Programms

Die verwendeten Taqman® Assays sind im Materialteil aufgelistet. Die Genexpression wurde relativ zu TBP (*Tata-box binding protein*) gemessen und mit der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode ausgewertet.

Dafür wird der *ct*-Wert (*cycle threshold*) bestimmt, der den Schwellenwert angibt, an dem der Messwert erstmalig signifikant höher als der Hintergrund ist. Dieser Wert steht umgekehrt proportional zu der Menge an *Template*, also der in cDNA umgewandelten Transkripte. Die unterschiedliche Genexpression zwischen zwei Gruppen wird dann errechnet, indem die *ct*-Werte von Referenz und Probe innerhalb einer Gruppe voneinander abgezogen werden (Δct), dann werden die Δct -Werte der Gruppen voneinander abgezogen ($\Delta\Delta\text{ct}$), und in die Gleichung *Quotient der Expression* = $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ eingesetzt. Dieser Quotient gibt dann das Verhältnis der Genexpression zwischen den untersuchten Gruppen an.

4.6. Statistik

Die statistischen Auswertungen in dieser Arbeit wurden mit der Software Graphpad Prism 4.03 der Firma GraphPAD Software durchgeführt.

5. Ergebnisse

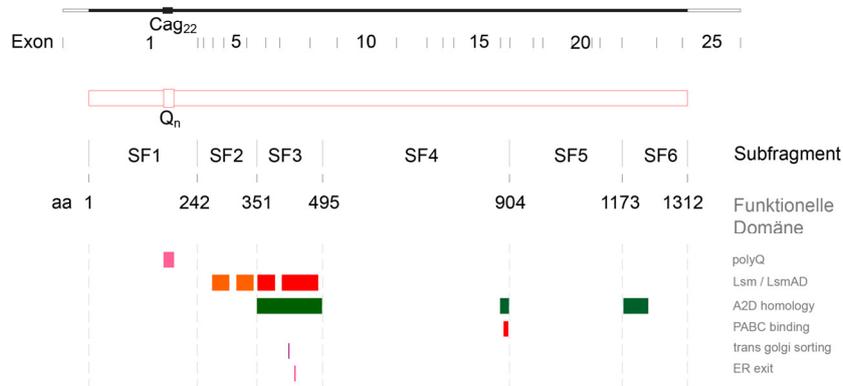
5.1. Initiale Hefe-2-Hybrid Untersuchung zur Identifikation von Ataxin-2-Interaktoren

Das Hefe-2-Hybrid System ist ein *in vivo* System in der Hefe zur Identifikation von Protein-Interaktionen. Eine Interaktion führt zur Rekonstitution des Transkriptionsfaktors *GAL4*, der chromosomal integrierte Reportergene aktiviert. Die Aktivität dieser Reportergene kann durch das Wachstum der Zellen auf Selektionsmedien detektiert werden. Zu diesem Zweck werden die DNA-Binde-Domäne (DBD) und die Aktivator-Domäne (AD) des Transkriptionsfaktors als Fusionsprotein mit den zu untersuchenden Proteinen gekoppelt. Das Köder-Protein wird in dem von uns verwendeten System mit der DBD gekoppelt, die cDNA-Bibliothek, in der die Beute-Proteine gesucht werden, wurde an die AD fusioniert.

Die Methode erlaubt das schnelle Untersuchen einer großen Anzahl von Proteinen auf die mögliche Interaktion mit dem eingesetzten Köder-Protein. Allerdings hat sich das Hefe-2-Hybrid System als anfällig für falsch-positive Interaktionen gezeigt, weshalb die Interaktion in anderen Systemen wie *GST-Pulldown* und Koimmunpräzipitation validiert werden sollte.

Das initiale Experiment dieser Arbeit wurde von der Firma Invitrogen durchgeführt und benutzte Ataxin-2 als voll-Längen Protein mit drei verschiedenen Polyglutaminregionen und sechs Subfragmente als Köder, die Beute-Proteine wurden aus einer cDNA-Bibliothek aus adultem humanem Gehirn eingesetzt. Fünf Proteine, die mit Ataxin-2 interagieren, wurden gefunden und die Klone durch Sequenzanalyse identifiziert (Abb. 8).

A



B

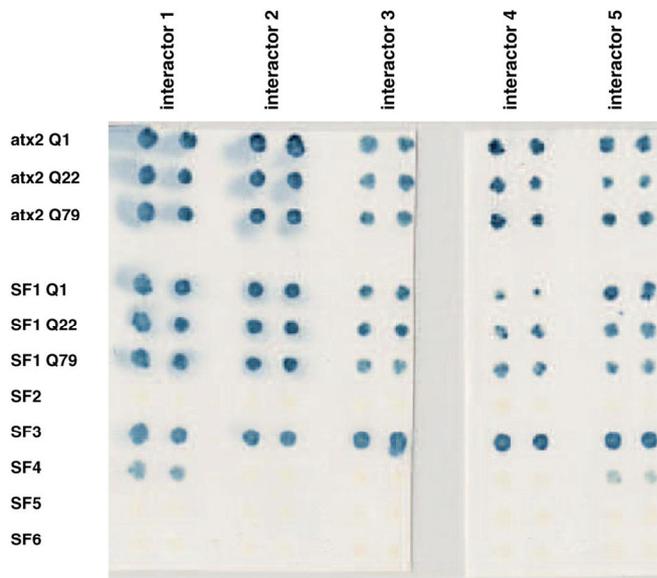


Abbildung 8: Fünf Proteine interagieren mit Ataxin-2 und Ataxin-2-Subfragmenten im Hefe-2-Hybrid Test.

A) Schematische Darstellung von Ataxin-2 und den verwendeten Subfragmenten mit putativer funktionaler Annotation der verschiedenen Regionen.

B) β -Gal Filter Test zum Nachweis der Interaktion zwischen Ataxin-2 und seinen Subfragmenten mit den fünf gefundenen Interaktoren. Ataxin-2 wurde mit unterschiedlichen Polyglutaminregionen als Köder in einem Hefe-2-Hybrid Test eingesetzt. Zusätzlich wurden Subfragmente von Ataxin-2 auf ihre Interaktion mit den gefundenen Interaktoren getestet. Die Interaktoren 2 (TRAP), 3 und 4 (SIM) zeigen ein identisches Muster mit Interaktionen mit allen voll-Längen Konstrukten und den Subfragmenten SF1 und SF3, bei Interaktor 1 und 5 ist zusätzlich eine Interaktion mit SF4 zu sehen.

Zwei dieser Proteine (Tab. 3) wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Interaktion mit Ataxin-2 analysiert, „*Similar to golgin-like*“ (SIM) und *Tudor repeat associator with PCTAIRE2* (TRAP). Beide Proteine zeigen eine Bindung mit Wildtyp Ataxin-2 und mit den Subfragmenten 1 und 3 (Abb. 8).

Klon	Homolog zu:	Referenz
#1	Endophilin A3	(Giachino, Lantelme et al. 1997)
#2	<i>Tudor repeat associator with PCTAIRE2 (TRAP)</i>	(Hirose, Kawabuchi et al. 2000)
#3	CGI-85	(Twells, Metzker et al. 2001)
#4	<i>Similar to golgin-like</i>	
#5	Endophilin A1	(Giachino, Lantelme et al. 1997)

Tabelle 3: Interaktoren von Ataxin-2 im Hefe-2-Hybrid Test der Firma Invitrogen.

„*Similar to golgin-like*“ schien als Interaktor besonders interessant, da für Ataxin-2 eine Golgi-Lokalisation publiziert wurde und auch eine mutationsabhängige Veränderung des Golgi-Apparates beobachtet worden war (Huynh, Yang et al. 2003).

5.2. *Similar to golgin-like* (SIM) als Interaktor von Ataxin-2

5.2.1. Mutationsabhängige Interaktion von SIM mit Ataxin-2

Da der β -Gal Filter Test des von Invitrogen durchgeführten Experiments eine rein qualitative Aussage über die Interaktion macht, wurde ein semiquantitaiver flüssig β -Gal Test eingesetzt, um den Einfluss der krankheitsrelevanten Mutation von Ataxin-2 auf die Bindung mit SIM zu untersuchen. Es wurden Ataxin-2 Konstrukte mit 1, 22 und 79 Glutaminen verwendet, die alle eine Bindung mit SIM zeigten (Abb. 9).

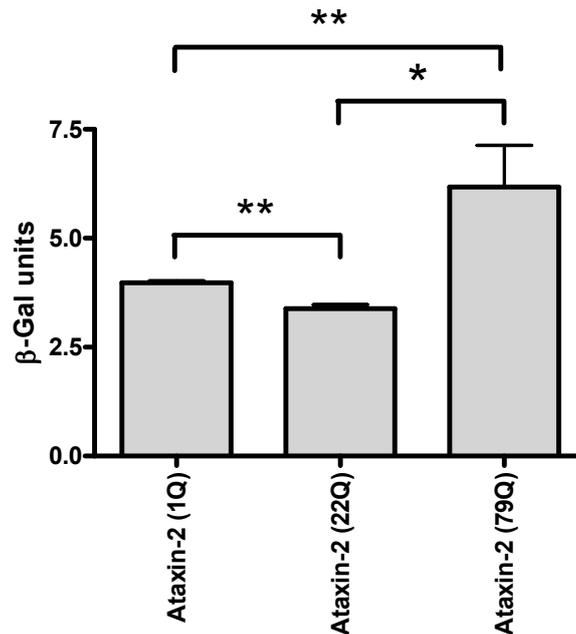


Abbildung 9: Flüssig β -Gal Test von Ataxin-2 und „Similar to golgin-like“ zur Untersuchung der Interaktionsstärke.

Semiquantitative Auswertung der Interaktionsstärke zwischen Ataxin-2 und SIM mittels photometrischer Messung der β -Gal Intensität. Alle drei Konstrukte unterscheiden sich signifikant in ihrer Interaktionsstärke mit SIM. Von besonderem Interesse ist hier die stark erhöhte Interaktion von SIM mit mutiertem Ataxin-2 (79Q). Die Reduktion des Polyglutamintraktes (1Q) zeigt keinen signifikanten Unterschied zu normalem (22Q) Ataxin-2.

Signifikante Unterschiede in der Interaktion konnten zwischen normalem und mutiertem Ataxin-2 beobachtet werden, allerdings ist auch der Unterschied zwischen normalem Ataxin-2 und der Variante mit nur einem Glutamin signifikant.

Die Länge des Glutamintraktes beeinflusst die Bindung mit SIM, es konnte eine signifikant stärkere Bindung zu mutiertem Ataxin-2 beobachtet werden. Dies lässt auf eine krankheitsrelevante Interaktion schließen.

5.2.2. Interaktionsdomänen auf Ataxin-2 und SIM

Zur Identifikation der Subdomäne von SIM, welche die Interaktion mit Ataxin-2 ermöglicht, wurden Deletionsmutanten von SIM im Hefe-2-Hybrid System eingesetzt (Abb. 10a). Die Analyse der interagierenden Subdomänen kann helfen, die Interaktion einem zellulären Prozess zuzuordnen. Zusätzlich kann nach der Identifikation der Interaktionsdomäne nach weiteren möglichen Interaktoren oder Kompetitoren gesucht werden.

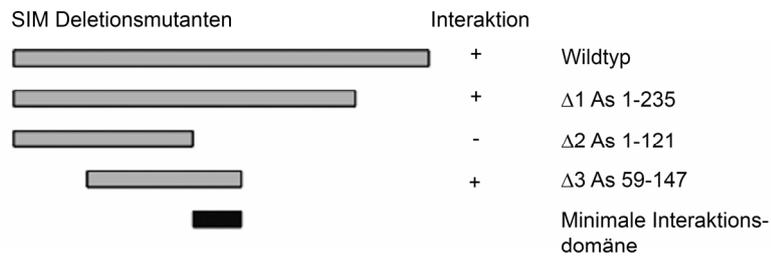
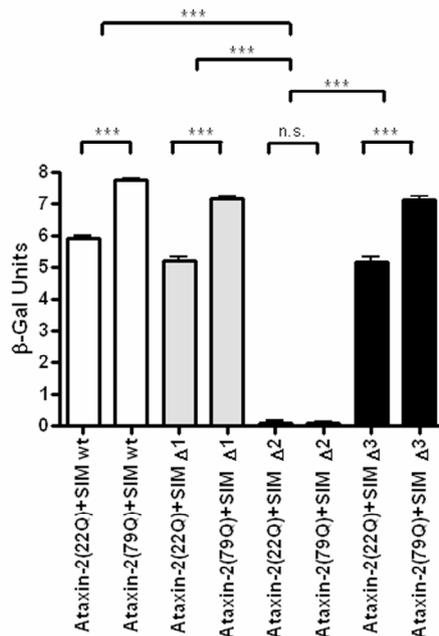
A**B**

Abbildung 10: Flüssig β -Gal Test zur Identifikation der mit Ataxin-2 interagierenden Regionen auf SIM

A) Schematische Darstellung der SIM-Konstrukte

B) Flüssig β -Gal Test von SIM und SIM-Deletionskonstrukten mit Ataxin-2 in normaler (22Q) und mutierter (79Q) Form.

Ein signifikanter Unterschied zeigt sich bei der Interaktion der Deletionsvariante $\Delta 3$ von SIM mit Ataxin-2. Die Deletion der Aminosäuren 122-147 führt zu einem vollständigen Rückgang der Interaktion. Hieraus lässt sich auf eine minimale Interaktionsdomäne von 26 Aminosäuren Länge schließen. Bei den mit Ataxin-2 interagierenden Subfragmenten lässt sich analog zum Wildtyp-SIM eine signifikante Steigerung der Interaktion in Abhängigkeit von der Expansion des Polyglutamintraktes erkennen.

Die SIM-Deletionsvarianten wurden mit Ataxin-2 in normaler und mutierter Form transformiert und auf Wachstum auf $-Leu-Trp-Ura$ Selektionsmedien getestet (Daten nicht gezeigt). Ein flüssiger β -Gal Test wurde eingesetzt, um semiquantitativ Unterschiede in der Interaktionsstärke zu untersuchen (Abb. 10b). Hierbei zeigte sich, dass sowohl der Wildtyp Klon, als auch die Deletionsvariante $\Delta 1$ und $\Delta 3$ mit Ataxin-2 in mutationsabhängiger Stärke

interagieren, $\Delta 2$ diese Interaktion allerdings nicht zeigt. Im Schema (Abb. 10a) ist die minimale Interaktionsdomäne gezeigt, die durch den Vergleich der interagierenden und nicht-interagierenden Konstrukte ermittelt werden konnte. Die Aminosäuresequenz dieser Domäne (EELLEQERLRQQDERLWQQETLRELE) konnte in dieser Form nur auf SIM gefunden werden. Dadurch konnten keine Hinweise auf einen zellulären Prozess oder weitere Interaktoren durch Sequenzhomologien ermittelt werden.

5.2.3. Expression von SIM-Fusionsproteinen

Um die im Hefe-2-Hybrid System beobachtete Interaktion in unabhängigen Systemen untersuchen zu können, wurde der offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*) von SIM in mehrere Expressionsvektoren kloniert. Um *in vitro* Bindungsexperimente durchzuführen, wurde der SIM-ORF in einen bakteriellen Expressionsvektor mit *GST-tag* kloniert. Zur Beobachtung in eukaryontischen Zellen und zur Koimmunpräzipitation wurden Klone mit N- und C-terminalem GFP und mit N-terminalem Myc- oder HA-Epitopen hergestellt. Die Klone wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit geprüft.

Die Expression dieser Klone wurde mit Antikörpern gegen die jeweiligen Fusionsproteine (GST, GFP) und die Epitop-Marker (Myc, HA) getestet (Daten nicht gezeigt).

5.2.4. Kolokalisation von SIM und Ataxin-2

Um weitere Evidenz für die Interaktion von SIM und Ataxin-2 zu erlangen und die Daten der Hefe-2-Hybrid Experimente zu unterstützen, wurden die SIM-Klone zusammen mit Ataxin-2 Klonen in eukaryotischen Zellen exprimiert und die Kolokalisation untersucht. Die Kolokalisation von Proteinen gibt einen Aufschluss darüber, ob die Proteine *in vivo* nahe genug subzellulär aneinander lokalisieren, um interagieren zu können. Gleichzeitig kann beobachtet werden, in welchem Kompartiment der Zelle die Kolokalisation zu erkennen ist. Daraus können gegebenenfalls Rückschlüsse auf mögliche Bedeutungen der Interaktion gezogen werden.

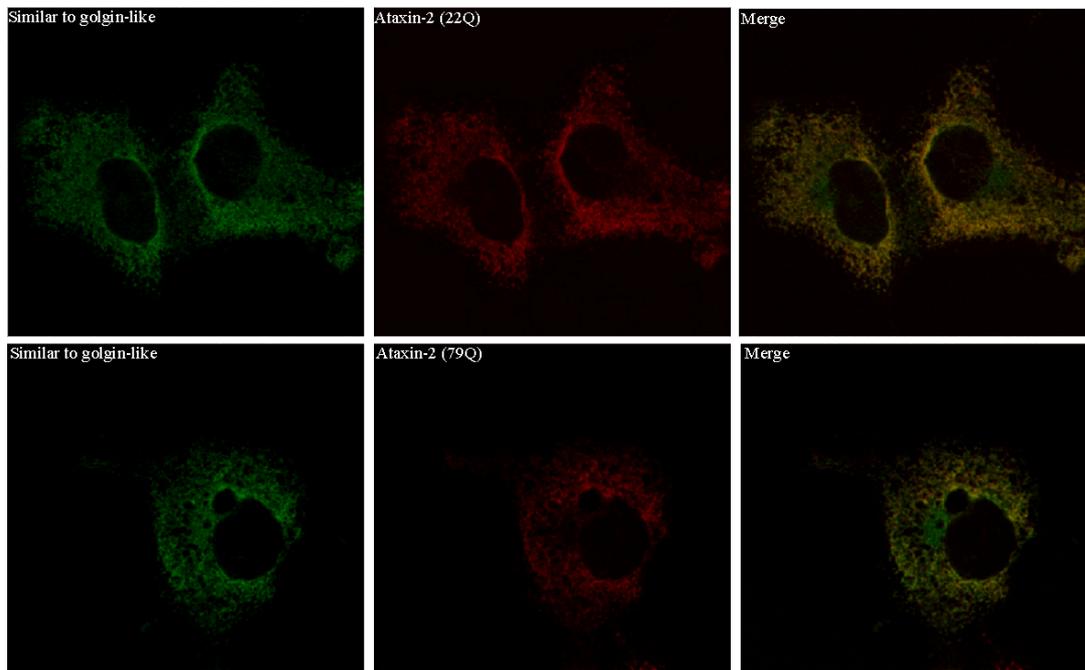


Abbildung 11: Kolokalisation von Ataxin-2 mit SIM.

COS-7 Zellen wurden mit cDNA-Konstrukten für GFP-SIM und Myc-Ataxin-2 (22Q) und (79Q) transfiziert, und nach 24 Stunden fixiert. Das Myc-Epitop wurde mit einem monoklonalen anti-Myc Ig aus der Maus detektiert, die sekundäre Färbung erfolgte mit Alexa-546 konjugiertem anti-Maus Ig. Beide Proteine zeigen eine zyttoplasmatische Verteilung, mit einer deutlichen Kolokalisation im Überlappungsbild (*merge*). Es ist kein Unterschied in der Kolokalisation von SIM mit normalem (22Q) oder mutiertem (79Q) Ataxin-2 zu erkennen, was auf eine normale intrazelluläre Verteilung von mutiertem Ataxin-2 in COS-7 Zellen schließen lässt.

Eine Kolokalisation von SIM und Ataxin-2 konnte in COS-7 Zellen, die mit Myc-Ataxin-2 in normaler und mutierter Form und GFP-SIM transfiziert worden sind, nachgewiesen werden (Abb. 11). Ein mutationsabhängiger Unterschied in der Kolokalisation zwischen SIM und normalem oder mutiertem Ataxin-2 konnte nicht beobachtet werden und beide Proteine zeigten eine definierte zyttoplasmatische Verteilung. Darauf aufbauend wurde für SIM die subzelluläre Lokalisation bestimmt. SIM-GFP wurde in COS-7 Zellen transfiziert, und eine Immunfärbung gegen Organell-spezifische Markerproteine durchgeführt (Abb. 12). Hierbei wurde eine teilweise ER-assoziierte Lokalisation von SIM sichtbar, wohingegen SIM nicht am ER- und Golgi-Intermediärraum (Ergic) und am Golgi-Apparat (p115) zu sehen war. Da SIM mit Ataxin-2 zu großen Teilen kolokalisiert, widerspricht dies der Golgi-Lokalisation von Ataxin-2 zumindest indirekt.

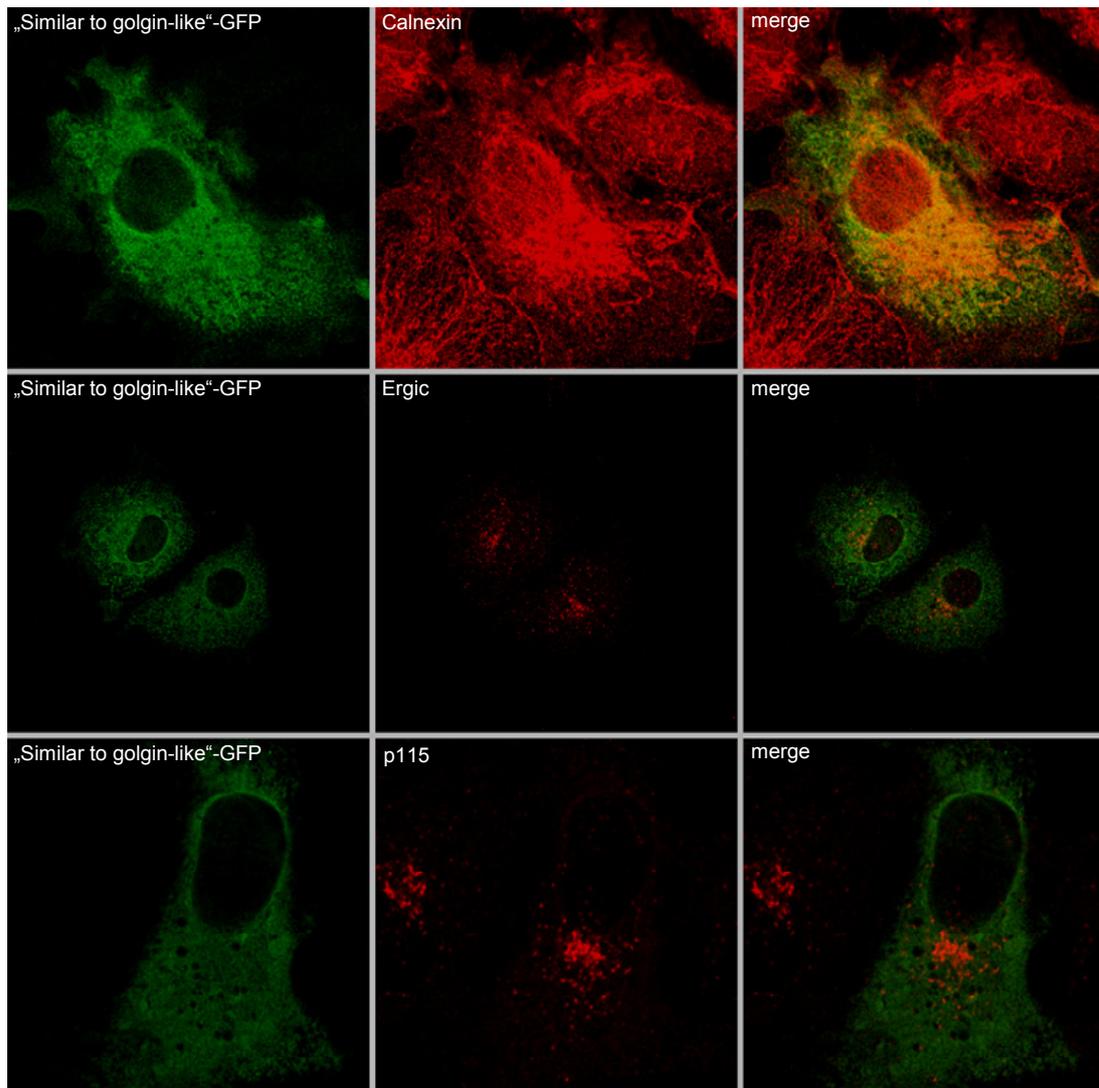


Abbildung 12: Subzelluläre Lokalisation von SIM. COS-7 Zellen wurden mit SIM-GFP cDNA transfiziert, und Immunfärbungen mit den spezifischen Organell-Markern Calnexin, ERGIC und p115 durchgeführt. SIM zeigt eine partielle Kolokalisation mit Calnexin, einem ER-Marker. Die Markerproteine für den Intermediärraum zwischen ER und Golgi-Apparat (ERGIC, *ER-Golgi intermediate compartment*) und p115 (cis-Golgi) zeigen keine Kolokalisation mit SIM. Dies zeigt, dass die Kolokalisation vom SIM und Ataxin-2 am ER stattfindet.

Die Kolokalisation von SIM und Ataxin-2 zeigt, dass die Proteine innerhalb der Zelle nahe genug aneinander lokalisiert sind, um miteinander interagieren zu können; die subzelluläre Lokalisation von SIM deutet darauf hin, dass die Interaktion am ER und/oder im Zytoplasma stattfindet.

5.2.5. GST-Pulldown von Ataxin-2 mit SIM

Der GST-Pulldown ist eine *in vitro* Methode zur Analyse von Proteinbindungen. Ein Bindungspartner wird als GST-Fusionsprotein in großer Menge in *E. coli* Bakterien exprimiert. Danach wird das Fusionsprotein über das GST an GSH-Sepharose gebunden. Dieser Komplex wird dann mit Zellextrakten, die das Zielprotein enthalten, inkubiert und die Bindung mit SDS-PAGE und *Western blot* nachgewiesen.

Um die Bindung von SIM und Ataxin-2 *in vitro* zu untersuchen, wurde SIM an GST gekoppelt und mit rekombinantem Myc-Ataxin-2 (22Q) inkubiert. Hierbei konnte eine Bindung von Myc-Ataxin-2 an GST-SIM gezeigt werden (Abb. 13).

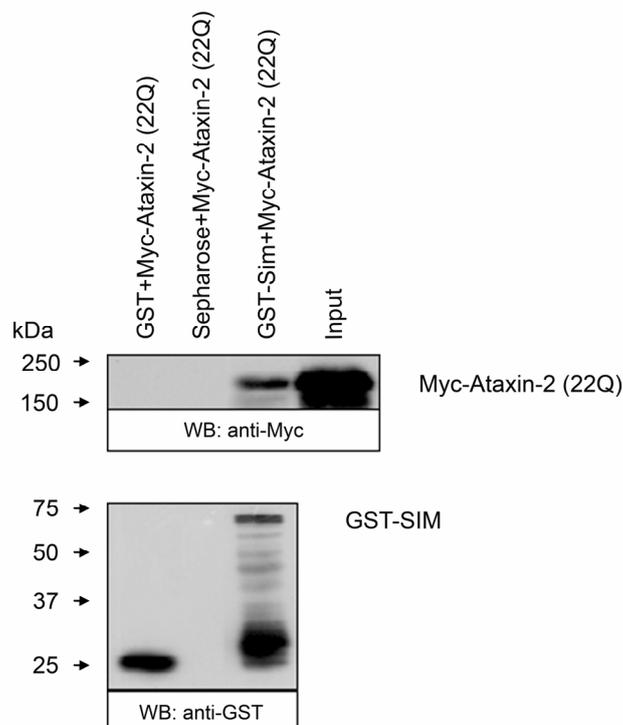


Abbildung 13: GST-SIM bindet Myc-Ataxin-2 (22Q) *in vitro*.

GSH-Sepharose wurde mit GST und GST-SIM beladen, und danach mit Zellextrakten inkubiert, die rekombinantes Myc-Ataxin-2 (22Q) enthielten. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen GST und Myc. GST-SIM bindet Myc-Ataxin-2 (22Q), die Kontrollen mit GST und der GSH-Sepharose zeigen keine Bindung.

Die Kontrollen, GST ohne Fusionsprotein und die GSH-Sepharose binden kein Myc-Ataxin-2 (22Q), in dem *Pulldown* mit GST-SIM kann Myc-Ataxin-2 (22Q) detektiert werden. Die *in vitro* Interaktion beweist, dass die beiden Proteine physikalisch miteinander interagieren können.

5.2.6. Koimmunpräzipitation von GFP-SIM und Myc-Ataxin-2

Mit Koimmunpräzipitationen können Proteinkomplexe aus einer physiologischen Umgebung isoliert werden. Dazu werden spezifische Antikörper mit einem Zell- oder Gewebe-Lysat inkubiert, so dass die Bindung zwischen Antikörper und Epitop gebildet werden kann. Der Antikörper und das daran gebundene Protein werden dann isoliert, indem mit Protein A und/oder Protein G beschichtete Sepharose- oder Agarose-Kügelchen zu der Reaktion gegeben werden. Protein A und G binden stark und sehr spezifisch an die Fc-Region der meisten Immunglobuline. Mittels SDS-PAGE und *Western blot* können dann das präzipitierte Protein und die Komplexpartner detektiert werden.

Da nicht für jedes Protein geeignete Antikörper verfügbar sind, werden häufig Epitopgekoppelte rekombinante Proteine verwendet. Auch kann durch die Verwendung rekombinanter Proteine die Menge moduliert werden. Gerade im Fall von Ataxin-2, das eine niedrige Abundanz zeigt, und von SIM, für das kein Antikörper erhältlich war, bot sich diese Methode an. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit Fusionskonstrukten für GFP-SIM und Myc-Ataxin-2 in normaler und mutierter Form transfiziert. Die Immunpräzipitation wurde mit einem anti-Myc Antikörper durchgeführt und mittels SDS-PAGE und *Western blot* wurde das Ataxin-2-Präzipitat auf die Koimmunpräzipitation von GFP-SIM getestet.

Die Koimmunpräzipitation zeigt, dass SIM und Ataxin-2 als rekombinante Proteine einem Komplex angehören (Abb. 14). Allerdings konnte in diesem Experiment keine mutationsabhängige Veränderung der Interaktion beobachtet werden, wie es beim Hefe-2-Hybrid Experiment (Abb. 9 und 10) der Fall war.

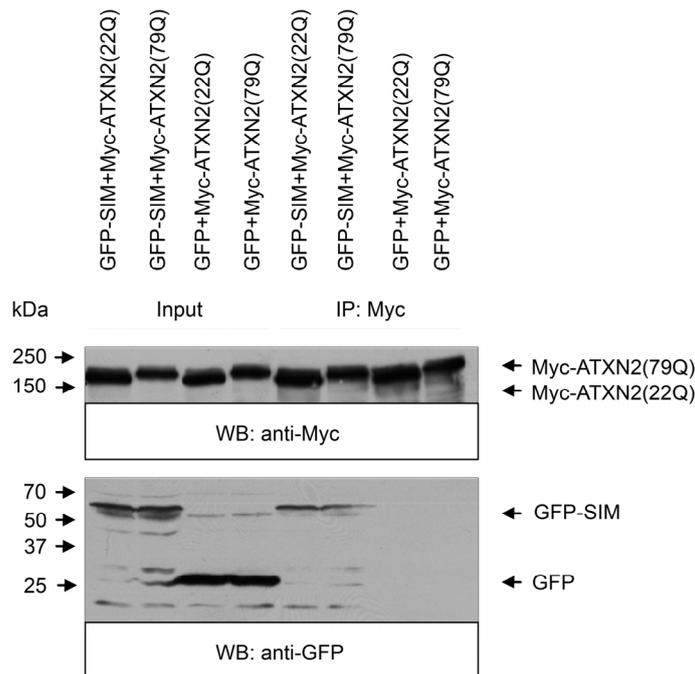


Abbildung 14: GFP-SIM und Myc-Ataxin-2 gehören demselben Komplex an. Myc-Ataxin-2 (Myc-ATXN2) wurde in normaler (22Q) und mutierter (79Q) Form jeweils mit GFP-SIM oder als Kontrolle mit GFP in COS-7 Zellen kotransfiziert. Danach wurde durch anti-Myc-Antikörper Myc-Ataxin-2 präzipitiert, und mit einem anti-GFP-Antikörper GFP respektive GFP-SIM detektiert. GFP-SIM bildet einen Komplex mit Myc-Ataxin-2 und kann sowohl mit normalem als auch mit mutiertem Myc-Ataxin-2 kopräzipitiert werden. Dies zeigt, dass SIM und Ataxin-2 als rekombinante Proteine einen Komplex in COS-7 Zellen bilden.

5.2.7. Antikörper gegen SIM

Konsequenterweise wurde nun, nachdem Hefe-2-Hybrid, Kolokalisation und GST-Pulldown unterstützt durch das Ergebnis der rekombinanten Koimmunpräzipitation eine Interaktion zeigten, die Generation von Antikörpern gegen SIM in Angriff genommen. Spezifische Antikörper zeigen einerseits das bisher unbekannte Expressionsprofil von SIM in verschiedenen Geweben und können andererseits bei Eignung auch für die Koimmunpräzipitation der endogenen Proteine verwendet werden. Die Generation der Antikörper wurde von der Firma Biogenes in Berlin durchgeführt. Hierzu wurden ein N- und ein C-terminales Peptid aus der vorhergesagten Sequenz an einen Träger gekoppelt und jeweils zwei Kaninchen als Antigen gespritzt. Die Antisera wurden von uns mit rekombinantem Protein getestet (Daten nicht gezeigt), danach wurden die Antikörper

affinitätsgereinigt. Die abschließende Testung erfolgte dann mittels SDS-PAGE und *Western blot*.

5.2.7.1. Zwei anti-SIM Antikörper erkannten eine spezifische Bande

Die Antikörper 8160 (N-terminal) und 8162 (C-Terminal) erkannten spezifisch rekombinantes SIM und detektierten eine prominente Bande bei ca. 50 kDa (Abb. 15). Mittels Peptidblockierung wurde die Spezifität gegen das Epitop demonstriert.

Die im humanen Gehirn erkannte Bande lief höher als die Bande des rekombinanten Proteins. Da für SIM mehrere in Frage kommende Transkripte hinterlegt sind, könnte es sich bei der klonierten Form um eine kürzere Spleiß-Variante handeln - oder es findet eine post-translationale Modifikation endogen statt, der das rekombinante Protein nicht unterliegt. Da jedoch eine sehr prominente Bande sowohl von dem gegen das N- als auch gegen das C-terminale Epitop gerichteten Antikörper erkannt wurden, war davon auszugehen, dass diese Bande SIM repräsentierte.

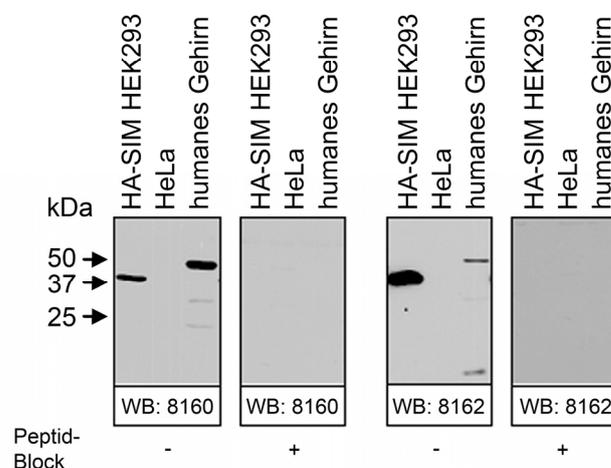


Abbildung 15: Die Antikörper 8160 und 8162 erkannten rekombinantes SIM und zeigten Immunreaktivität in humanem Gehirnextrakt.

Proteinextrakt von mit HA-SIM transfizierten HEK 293 Zellen, Extrakt von HeLa Zellen und Proteinextrakt aus humanem Gehirn wurden mittels SDS-PAGE und *Western blot* auf Immunreaktivität von einem N-terminalen (8160) und C-terminalen (8162) Antikörper gegen SIM getestet. Das rekombinante Protein wird bei ca. 37 kDa erkannt, wohingegen in HeLa Zellen keine Immunreaktivität zu erkennen ist. Im humanen Gehirn ist eine prominente Bande bei ca. 50 kDa zu sehen. Um die Spezifität der Antikörper zu demonstrieren, wurde das entsprechende Peptid in den angezeigten *blots* eingesetzt, um die Antikörper kompetitiv zu blocken. In den *blots* mit Peptid-Block kann keine Immunreaktivität detektiert werden. Dies spricht für die Spezifität der Antikörper.

5.2.7.2. SIM-IR findet sich nur im Gehirn

Nachdem die SIM Antikörper 8160 und 8161 für SIM eine spezifische Bande im humanen Gehirn detektierten, wurden weitere Gewebe auf die Expression dieser SIM-ähnlichen Immunreaktivität (IR) getestet. Hierzu wurden Proteinextrakte aus den entsprechenden Geweben mit SIM 8160 (Abb. 16a) und 8161 (Daten nicht gezeigt) getestet. Die Mengenverhältnisse wurden mittels GAPDH-Detektion überprüft. Eine Immunreaktivität ähnlich SIM kann nur im Gehirn festgestellt werden, peripheres Gewebe und auch diverse Zelllinien (Abb. 16b) zeigen keine Expression.

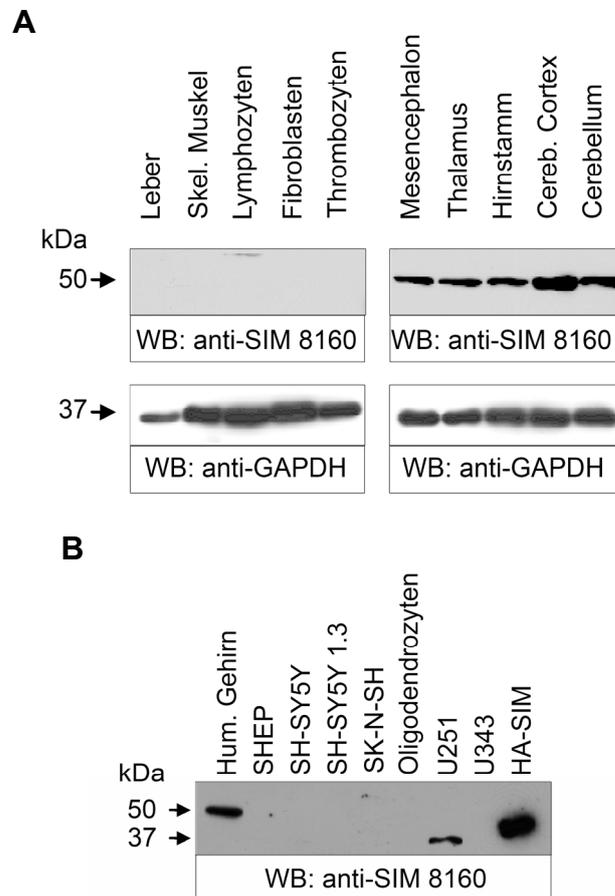


Abbildung 16: SIM-IR kann nur im Gehirn nachgewiesen werden.

A) Lysate von humanem peripherem Gewebe und verschiedenen Hirnregionen wurden mit dem Antikörper gegen SIM auf Expression getestet. Im peripheren Gewebe kann keine Expression detektiert werden, im Hirn kann putatives SIM nachgewiesen werden.

B) Von den eingesetzten Zelllinien zeigte keine Linie eine Expression von SIM-IR.

5.2.8. Koimmunpräzipitation mit endogenen Proteinen

Nachdem in allen vorangegangenen Experimenten alles auf eine Interaktion von SIM und Ataxin-2 hindeutete, wurde abschließend eine Koimmunpräzipitation der endogenen Proteine durchgeführt.

Dazu wurden subzelluläre Fraktionen des Mausgehirns eingesetzt, die durch differentielle Fraktionierung (Abb. 17A) gewonnen wurden. Diese Vorgehensweise wurde durch die geringe Abundanz von Ataxin-2 notwendig.

Ataxin-2 konnte im Zytosol und in der leichten Membran-Fraktion detektiert werden, SIM-IR im Zytosol (Abb. 17B). Zur Überprüfung der Fraktionierung wurde SDS-PAGE und *Western blot* zur Detektion der fraktionsspezifischen Markerproteine EEA1 (Zytosol) und Calnexin (leichte Membran-Fraktion) eingesetzt. Bei der nachfolgenden Immunpräzipitation von Ataxin-2 wird SIM-IR kopräzipitiert und umgekehrt (Abb. 17C).

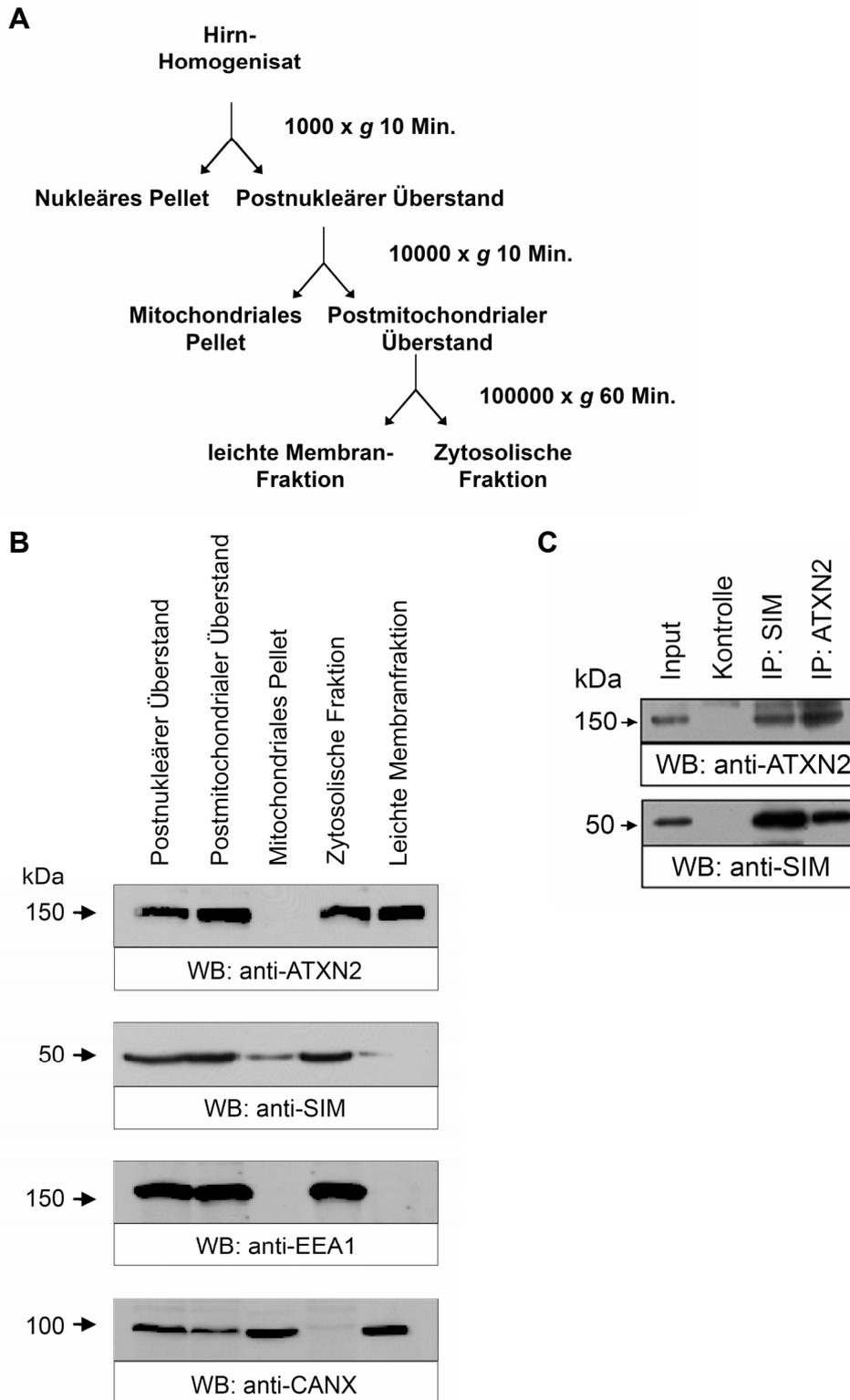


Abbildung 17: Ataxin-2 und SIM-IR bilden einen Komplex im Gehirn der Maus.

A) Schematische Darstellung der differentiellen Fraktionierung

B) Ataxin-2 und SIM-IR werden beide in der zytosolischen Fraktion detektiert.

C) Koimmunpräzipitationen von Ataxin-2 und SIM-IR aus der zytosolischen Fraktion. Im Präzipitat von Ataxin-2 kann SIM-IR detektiert werden und umgekehrt. Dies unterstützt, dass beide Proteine endogen im selben Komplex vorkommen.

Diese Daten unterstützen die Existenz eines endogenen Komplexes von Ataxin-2 und SIM-IR unter physiologischen Bedingungen im krankheitsrelevanten Gewebe.

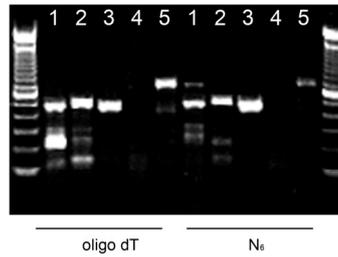
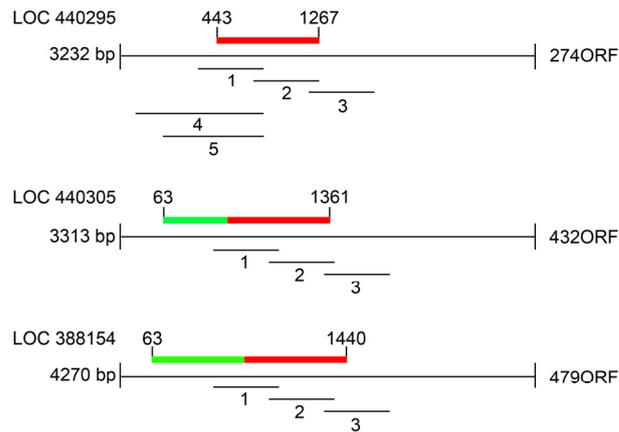
5.2.9. 5'-RACE zur Charakterisierung von SIM

Da im *Western blot* für SIM eine Bande mit abweichender Größe gefunden wurde, wurde ein 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) eingesetzt.

Eine Datenbank-Analyse mit *nucleotide-* und *protein-blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) zeigte, dass drei Formen von SIM existieren können. Diese drei Isoformen gleichen sich im C-terminalen Bereich zu 100 %, Unterschiede sind nur in 5'-Richtung zu finden (Abb. 18B, grün hervorgehoben). Zur Identifikation der unterschiedlichen Transkripte wurden spezifische Primer ausgewählt, und cDNA aus humanem cerebralem Cortex und SH-SY5Y 1.3 Zellen als *Template* verwendet. Durch PCR konnten in der cDNA von SH.SY5Y 1.3 Zellen die Amplifikate erzeugt werden, die dem identischen Bereich in allen drei Formen entsprechen. Einzig das Amplifikat 5 deutet auf die in dieser Arbeit rekombinant verwandte Isoform hin (Abb. 18A und B). Auch die für die cDNA-Synthese verwendeten *Primer*, Oligo-dT oder Hexanukleotid, machten keinen Unterschied, so dass hier eine Konsistenz der Ergebnisse zu sehen war. Da in den SH-SY5Y 1.3 Zellen allerdings kein SIM im *Western blot* zu sehen war, wurde ein 5'-RACE mit cDNA aus humanem adultem cerebralem Cortex durchgeführt (Abb. 18C). Hierbei konnte außer einem Schmier keine Amplifikation festgestellt werden. Ursächlich hierfür können mehrere Faktoren sein. Die Qualität der cDNA-Synthese spielt natürlich eine große Rolle, auch könnten gewebespezifische Faktoren Einfluss haben.

A

1. 366F-858R	492 bp
2. 781F-1277R	496 bp
3. 1231F-1708R	477 bp
4. 31F-858R	827 bp
5. 180F-858R	678 bp

**B****C**

1. AP1+858R
2. AP1
3. 858R
4. AP1+858R 10X
5. AP1 10X
6. 858R 10X

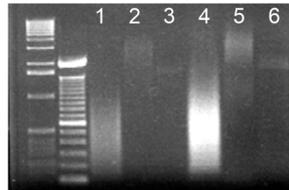


Abbildung 18: SIM lässt sich auch mittels 5'-RACE nicht eindeutig definieren.

A) Aus SH-SY5Y 1.3 Zellen gewonnene cDNA wurde mit spezifischen *Primern* in PCRs verwendet, um über ein spezifisches Bandenmuster die Isoform von SIM zu ermitteln.

B) Schematische Darstellung der möglichen Isoformen von SIM, die Amplifikate sind entsprechend (A) nummeriert.

C) 5'-RACE mit cDNA aus humanem cerebralem Cortex.

Als 5'-*Primer* wurde der Adaptor-*Primer* AP1 eingesetzt, als 3'-*Primer* wurde 858R verwendet, der die am weitesten in 5'-Richtung liegenden Amplifikate geliefert hat (A). Die Spuren 1 und 4 zeigen das RACE-Produkt bei einfachem und zehnfachem Einsatz der *Primer*. 5 und 6 dienen der Kontrolle. In keiner der Spuren 1 bis 4 konnte eine klare Bande erkannt werden.

5.2.10. 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie zur Charakterisierung von SIM-IR

Nachdem die Analyse des Transkriptes mit 5'-RACE kein Ergebnis brachte, wurde ein weiterer Versuch unternommen, um die SIM-IR in voller Länge zu definieren. Mittels Immunpräzipitation wurde das detektierte Protein angereichert, und das Präzipitat auf einem 2D-Gel aufgetrennt. Diese Vorgehensweise wurde notwendig, weil die Bande der SIM-IR (50 kDa) in einem eindimensionalen Gel zu nah an der schweren Kette des zur Immunpräzipitation eingesetzten Immunglobulins (55 kDa) läuft.

Der Punkt, an dem SIM-IR im Gel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht wurde (Abb. 19A), wurde ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse zur Firma Toplab in München geschickt. Ob es sich bei dem *spot* um die SIM-Bande handelt, wurde in einem identischen Gel und einem anschließenden Western *blot* mit dem SIM-Antikörper überprüft (Abb. 19B).

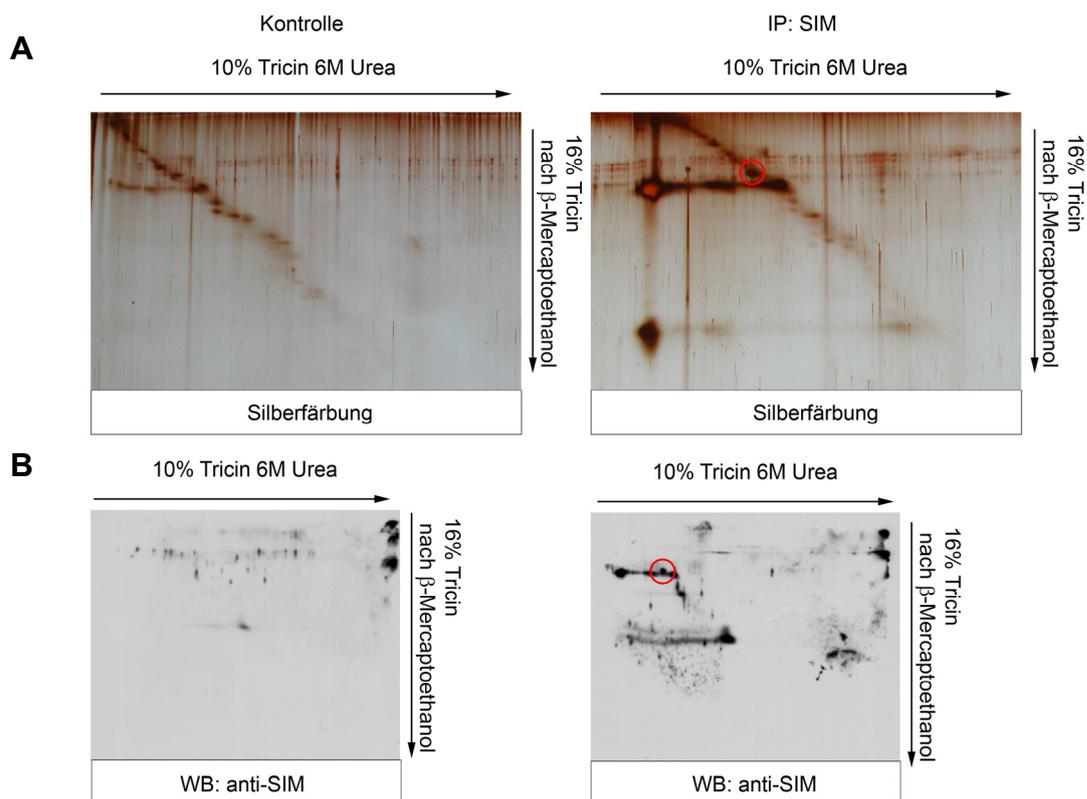


Abbildung 19: Isolation des anti-SIM Präzipitats aus einem 2D-Gel.

A) SIM-IR wurde mit dem Antikörper 8160 aus der leichten Membranfraktion präzipitiert und auf einem 2-dimensionalen Tricin-Gel aufgetrennt. Um SIM-IR von der schweren Kette des Immunglobulins zu trennen, wurde eine pH-Verschiebung (Schagger 2006) durchgeführt. Die Proteine wurden dann mittels Silberfärbung sichtbar gemacht, und der SIM-IR-Spot (rot) ausgeschnitten.

B) Gleichzeitig wurde der *spot* zur Kontrolle in einem identischen Gel durch Westernblot mit dem SIM-Antikörper detektiert.

Die massenspektrometrische Analyse (Abb. 20) des ausgeschnittenen *spots* konnte keinem Protein zugewiesen werden. Die gefundenen *peaks* konnten bis auf einen nur Trypsin-Autolyse-Peptiden und Hintergrundsignalen der Matrix zugeordnet werden. Das einzige weitere Signal bei *M/Z* 2036 ließ sich leider keiner der möglichen SIM-Sequenzen zuordnen. Die Definierung der SIM-Isoform ließ sich mit keiner der angewandten Methoden durchführen.

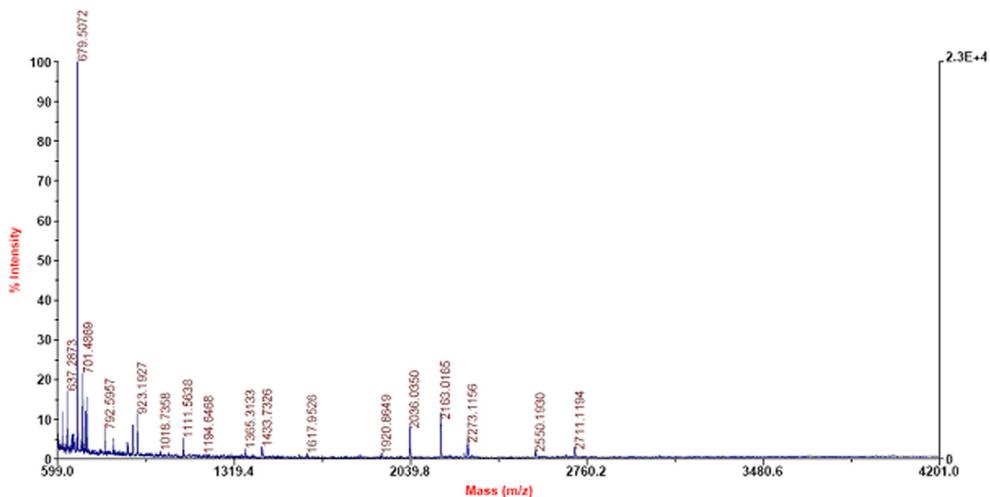


Abbildung 20: Massenspektrometrische Analyse des SIM-IR-*spots* aus dem 2-dimensionalen Gel. Es tauchen lediglich Hintergrundpeaks aus der Matrix und Trypsin-Autolyse Peptide auf. Der einzige *peak*, der davon abweicht, liegt bei *M/Z* 2036 und lässt sich keiner möglichen SIM-Sequenz zuweisen.

5.2.11. Untersuchungen zum VSV-G Transport unter Einfluss von SIM und Ataxin-2 Überexpression

SIM weist eine partielle Homologie zu Golgin-67 auf. Die Golgine sind Proteine des Golgi-Apparates und erfüllen Aufgaben in der Aufrechterhaltung der Struktur und bei der Verarbeitung von Vesikeln. Hauptmerkmale der Golgine sind *coiled-coil* Strukturelemente und Bindestellen für eine Gruppe GTPasen, die RabGTPasen. Über die Interaktion mit diesen GTPasen sind die Golgine maßgeblich an der Integrität des Golgi-Apparates und den Transportmechanismen beteiligt (Barr and Short 2003; Short, Haas et al. 2005).

Aufgrund der Homologie zu Golgin-67 wurde mittels eines VSV-G (Vesicular stomatitis virus glycoprotein) Transport-Assays untersucht, ob rekombinant exprimiertes SIM oder auch Ataxin-2 in HeLa-Zellen den Transport am Golgi-Apparat beeinflusst. Beim VSV-G Transport-Assay wird der Transport einer temperatursensitiven Variante des VSV-G Proteins

vom ER zum Golgi-Apparat und dann in Richtung der Zellmembran sichtbar gemacht. Die temperatursensitive Variante des VSV-G erlaubt es, diesen Transportvorgang zu festgelegten Zeitpunkten zu visualisieren.

Weder SIM (Abb. 21A) noch normales oder mutiertes Ataxin-2 (Abb. 21B und C) bewirkten eine Veränderung im Transport des VSV-G-GFP Konstruktes. Zum Zeitpunkt t_0 befand sich das VSV-G Konstrukt im ER rund um den Zellkern verteilt. Nachdem der Transport durch den Temperaturwechsel initiiert wurde, konnte VSV-G-GFP nach 30 Minuten im Golgi-Apparat beobachtet werden. Zum Zeitpunkt t_{60} zeigte sich eine Verteilung in die Peripherie der Zelle auf dem Weg zur Plasmamembran. Dieser Verlauf war gleichzeitig auch in den untransfizierten Zellen, die als Kontrolle dienen, zu beobachten. Im Falle eines Effekts wären entweder der Transport in der Golgi verlangsamt gewesen oder der Weitertransport in Richtung der Plasmamembran. Somit konnte rekombinantem SIM keine Funktion am VSV-G-Transport zugewiesen werden.

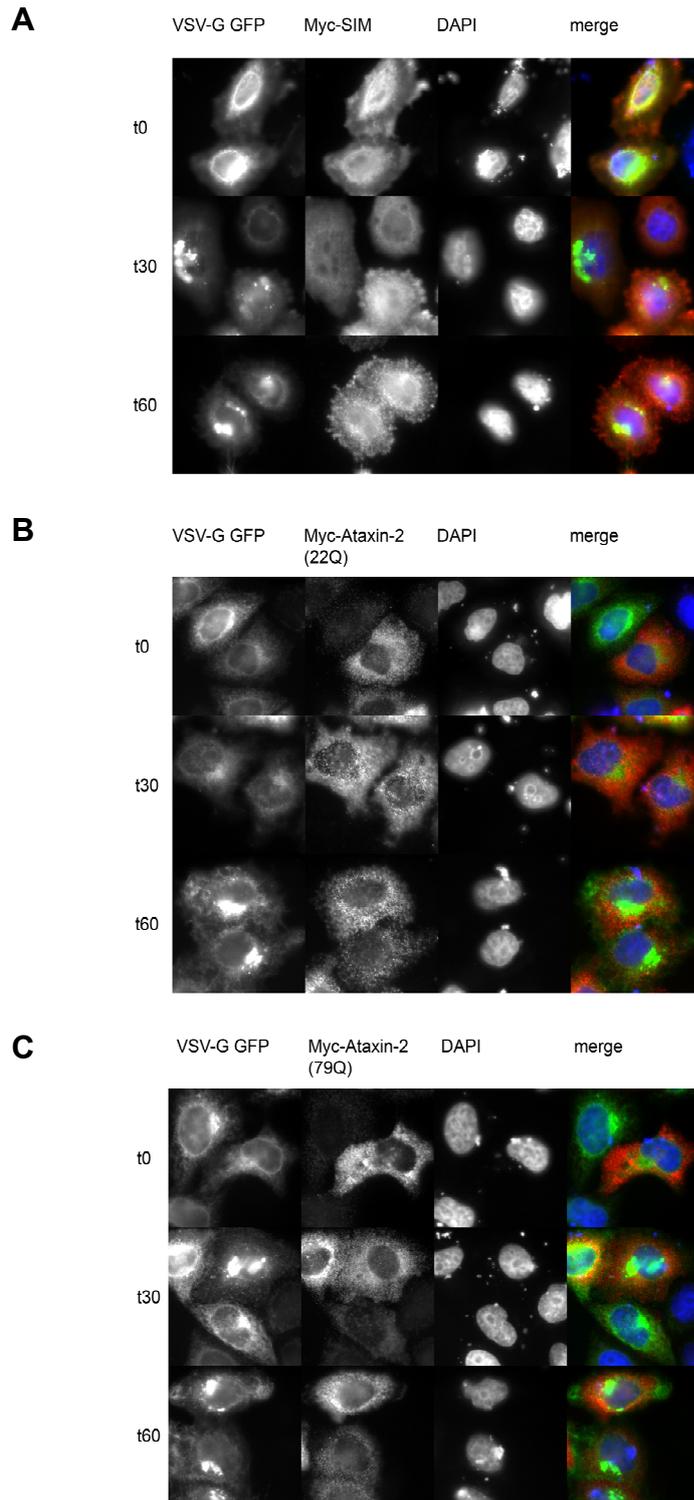


Abbildung 21: Weder SIM noch Ataxin-2 in normaler oder mutierter Form verändern den intrazellulären Transport von VSV-G. HeLa Zellen wurden mit SIM (A), normalem (B) und mutiertem (C) Ataxin-2 als Myc-Fusionsprotein zusammen mit VSV-G-GFP transfiziert. Die Zellen wurden 10 Stunden bei 39,5 °C inkubiert um die Fehlfaltung des VSV-G-GFP und eine daraus resultierende Retention im ER zu erhalten (t₀). Danach wurden die Zellen bei 32 °C inkubiert, um dem Verlauf der Rückfaltung und dem Transport des Fusionsproteins folgen zu können (t₃₀, t₆₀). Der Transport wurde durch die Transfektion mit SIM, normalem oder mutiertem Ataxin-2 nicht beeinflusst.

5.3. TRAP (*Tudor Repeat Associator with PCTAIRE2*) als Interaktor von Ataxin-2

Nachdem bei SIM die Interaktion mit Ataxin-2 charakterisiert worden war, sich aber keine weiterführenden Experimente im Hinblick auf eine mögliche Funktion von SIM oder Ataxin-2 im Zusammenhang mit SIM anboten, wurde nun die Interaktion zwischen TRAP und Ataxin-2 untersucht. Zu TRAP war bekannt, dass es ein Interaktor der Kinase PCTAIRE2 ist, einer Cdc2-verwandten Kinase, die in differenzierten Neuronen vorkommt (Hirose, Kawabuchi et al. 2000) und mit ik3-1/Cables interagiert, einem Bindeglied zu C-abl und Cdk-5, Faktoren im Neuritenwachstum (Yamochi, Nishimoto et al. 2001). Besonderes Merkmal von TRAP sind die fünf Tudor-Domänen, benannt nach dem Tudor-Protein aus *Drosophila melanogaster*, in dem die Domäne zehn Mal vorkommt. Tudor hat einen großen Einfluss auf die Keimbahn in der Fliege (Thomson and Lasko 2004; Thomson and Lasko 2005; Hosokawa, Shoji et al. 2007), wobei die genaue Funktion der Tudor-Domäne nicht bekannt ist. Etliche Proteine mit Tudor-Domänen kolokalisieren mit Ribonukleoprotein- und Einzelstrang DNA-Komplexen, wobei eine direkte Bindung an RNA oder DNA bisher nicht bekannt ist.

In einer weiteren Arbeit wurde die Interaktion von Trap mit TACC1 (*Transforming acidic coiled coil 1*) dokumentiert, einem putativem Oncogen (Conte, Delaval et al. 2003). TACC1 bildet einen Komplex mit der Aurora A Kinase und LSm7, einem RNA-Regulator. Über TRAP könnten somit Verbindungen zum RNA-Metabolismus und zu neuronalen Kinasen bestehen.

5.3.1. Hefe-2-Hybrid Analyse der Interaktion

Analog zur Interaktion mit SIM wurde auch bei TRAP ein Flüssig β -Gal Test eingesetzt, um die Interaktion zu Ataxin-2 in Hinsicht auf die Expansion des Polyglutamintraktes zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass keines der verwendeten Ataxin-2 Konstrukte Unterschiede in der Interaktion mit TRAP zeigt (Abb. 22).

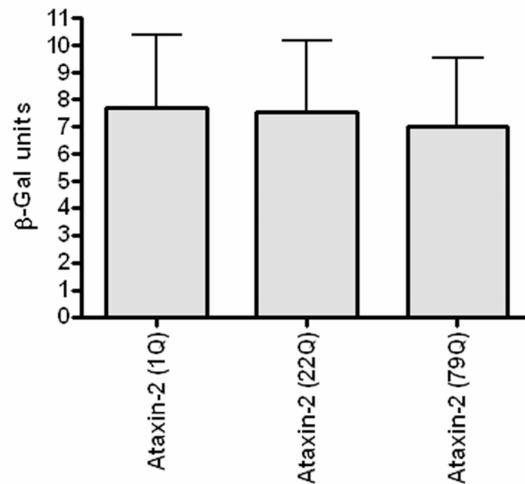


Abbildung 22: Flüssig β -Gal Test von Ataxin-2 und TRAP zur Untersuchung der Interaktionsstärke in Abhängigkeit von der Polyglutaminexpansion. Die Interaktion von TRAP mit Ataxin-2 wird nicht durch die Expansion oder Verkürzung des Polyglutamintraktes von Ataxin-2 beeinflusst, keines der drei Konstrukte zeigt eine signifikant veränderte Interaktionsstärke.

5.3.2. Kolokalisation von TRAP und Ataxin-2

Im Anschluss an den Hefe-2-Hybrid Test wurde auch im Falle von TRAP ein Kolokalisationsexperiment durchgeführt, um die Lokalisation der beiden Proteine und eine mögliche Überlappung zu überprüfen. COS-7 Zellen wurden mit TRAP-GFP und Myc-Ataxin-2 mit normalem und expandiertem Polyglutamintrakt transfiziert. Danach wurde die Kolokalisation mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Hierbei konnte eine Kolokalisation im Zytoplasma der Zellen beobachtet werden. Die Expansion des Polyglutamintraktes führte dabei zu keiner Änderung der Kolokalisation (Abb. 23).

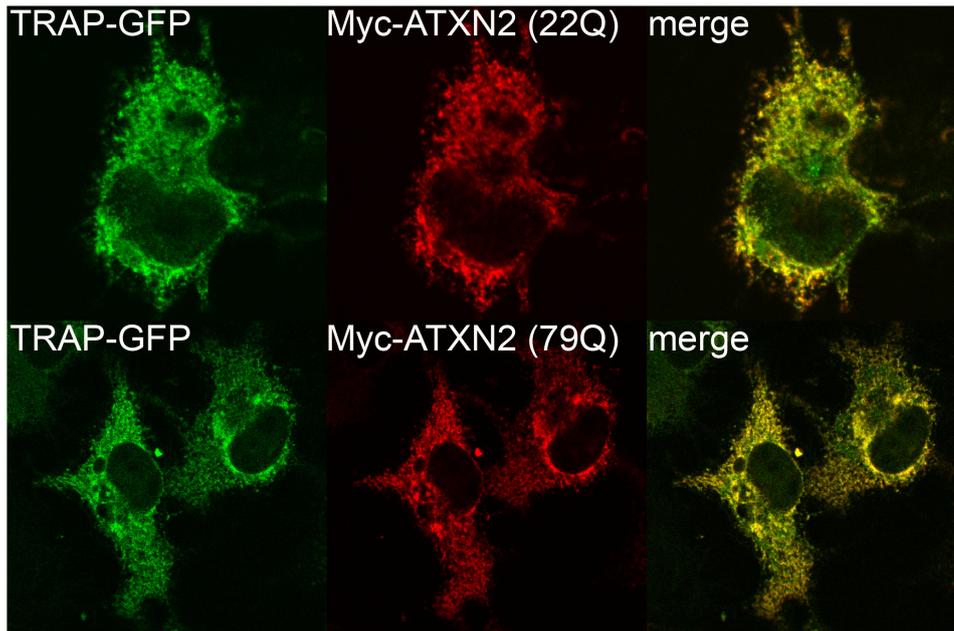


Abbildung 23: Kolokalisation von TRAP-GFP und Myc-Ataxin-2 in normaler (22Q) und mutierter (79Q) Form; TRAP und Ataxin-2 kolokalisieren im Zytosol von COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen wurden mit Fusionskonstrukten von TRAP und Ataxin-2 kotransfiziert, und die Überlappung der Fusionsproteine im konfokalen Mikroskop untersucht. TRAP-GFP überlappt sowohl mit normalem (22Q) und mutiertem (79Q) Ataxin-2, eine Veränderung der Kolokalisation in Abhängigkeit der Polyglutaminexpansion ist nicht zu erkennen.

5.3.3. Antikörper gegen TRAP

Nachdem die Kolokalisation positiv war, wurden Antikörper gegen TRAP erstellt, um eine Interaktion mittels Koimmunpräzipitation endogener Proteine zu untersuchen. Für TRAP wurde ein Antikörper publiziert (Hirose, Kawabuchi et al. 2000), der mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

5.3.3.1. Spezifität des TRAP-Antikörpers 8616

Vier Antikörper gegen TRAP wurden von uns bei der Firma Biogenes in Berlin in Auftrag gegeben. Von den vier Antiseren, die wir erhielten, zeigten drei keine spezifische Reaktion mit TRAP (Daten nicht gezeigt). Das einzige anti-Trap Antiserum mit einer spezifischen Reaktion wurde nach ersten Versuchen affinitätsgereinigt und dann charakterisiert.

Die Spezifität des Antikörpers wurde mit SDS-PAGE und *Western blot* untersucht. Proteinlysate von humanem Gehirn und Extrakte aus mit TRAP-Fusionskonstrukten transfizierten Zellen wurden analysiert. Der Antikörper erkannte Banden bei der erwarteten Größe, die vom Präimmunserum nicht erkannt wurden. Die Peptidblockierung bestätigte

dieses Ergebnis. Diese Daten sprechen dafür, dass der Antikörper 8616 spezifisch TRAP erkennt (Abb. 24).

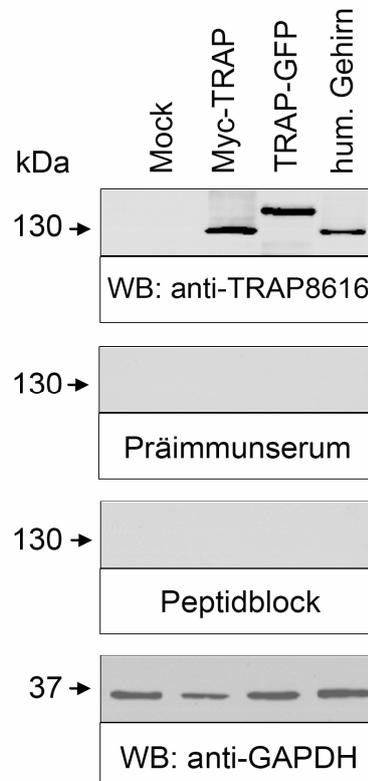


Abbildung 24: Der Antikörper 8616 erkennt spezifisch eine Bande mit der korrekten Grösse von TRAP. Die Spezifität des Antikörpers wurde in Extrakten aus untransfizierten und mit Myc-TRAP oder TRAP-GFP transfizierten HeLa-Zellen und in humanem Gehirn mittels SDS-PAGE und *Western blot* getestet. Myc-TRAP und TRAP-GFP zeigen die *Tag*-abhängige Größenverschiebung und in humanem Gehirn ist eine Bande bei der erwarteten Größe von 130 kDa zu sehen. Dies belegt, dass der Antikörper 8616 TRAP spezifisch erkennt und für weitere Experimente eingesetzt werden kann.

5.3.3.2. Anti-TRAP 8616 im Vergleich mit dem publizierten Antikörper

Der von Hirose et al. publizierte Antikörper erkannte eine Proteinbande bei 160 kDa, 30 kDa höher als nach den elektronischen Daten aus Pubmed zu erwarten war (Abb. 25). Der Antikörper wurde von Hirose zur Detektion von TRAP in Gewebe aus der Ratte und rekombinantem Protein verwendet.

Um den Antikörper 8616 mit dem Antikörper von Hirose zu vergleichen, wurden Extrakte aus dem Gehirn von Mensch, Maus und Ratte zusammen mit rekombinantem Protein und Extrakten aus diversen Zelllinien auf Immunreaktivität für die Antikörper getestet. Der publizierte und der von uns hergestellte Antikörper detektierte unterschiedliche Proteine

(Abb. 25). Beide konnten allerdings das rekombinante Protein erkennen, für das ein cDNA-Klon mit der humanen Sequenz verwendet wurde.

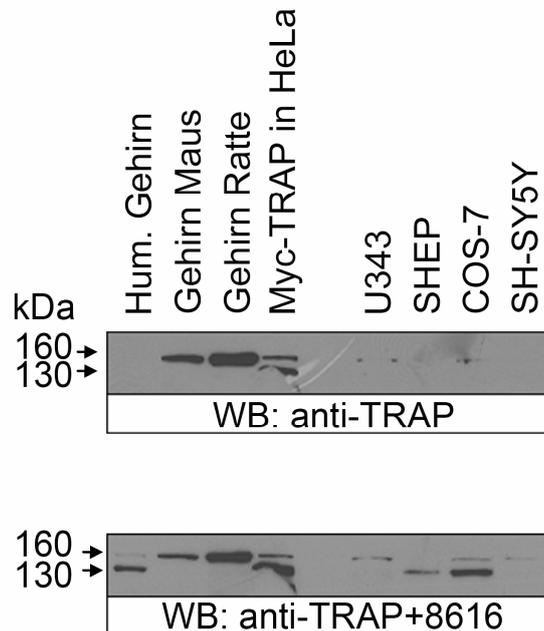


Abbildung 25: Der publizierte TRAP-Antikörper erkennt kein Protein im humanen Gewebe und die erkannten Proteine in Maus und Ratte laufen ca. 30 kDa höher als erwartet. Der von uns hergestellte Antikörper 8616 zeigt eine Bande in der richtigen Größe, allerdings nur in humanem Gewebe und in Zelllinien. Gehirnextrakte aus Mensch, Maus und Ratte wurden zusammen mit rekombinatem TRAP und Extrakten aus U343, SHEP, COS-7 und SH-SY5Y Zellen mit SDS-PAGE und *Western Blot* untersucht. Die erste Inkubation der Membran erfolgte mit dem publizierten TRAP-Antikörper. Hier konnten Banden bei ca. 160 kDa in Maus- und Ratten-Gehirn und auch das rekombinante Protein erkannt werden. Schwache Banden konnten außerdem in U343 und COS-7 Zellen erkannt werden. Eine zweite Inkubation mit dem TRAP-8616-Antikörper zeigte eine Bande im humanen Hirngewebe und Banden in SHEP und COS-7 Zellen. Durch die zweite Inkubation wurde der Unterschied der detektierten Proteine verdeutlicht.

5.3.3.3. Expressionsmuster

Wie auch bei SIM wurde für TRAP ein Expressionsmuster in humanem Gewebe erstellt, um die Charakterisierung des Antikörpers abzuschließen. Hierzu wurden Proteinextrakte aus verschiedenen Hirnregionen und anderen Organen mittels SDS-PAGE und *Western blot* analysiert. Publiziert ist für TRAP die Expression in Hirn und Testis von *rattus norvegicus*. Dieses Ergebnis wurde mit dem hier verwendeten Antikörper in humanem Gewebe reproduziert und konnte durch die Verwendung von Extrakten aus verschiedenen Hirnregionen ergänzt werden. Immunreaktivität konnte in unterschiedlicher Stärke in allen untersuchten Hirnregionen detektiert werden. Die stärkste Expression war im Cerebellum zu sehen. In den anderen untersuchten Geweben wurde eine Expression von TRAP in der

Testis und sehr schwach im Herz gefunden. Diese Ergebnisse bestätigten die publizierten Daten im humanen Gewebe und zeigten eine starke Expression von TRAP im Cerebellum (Abb. 26).

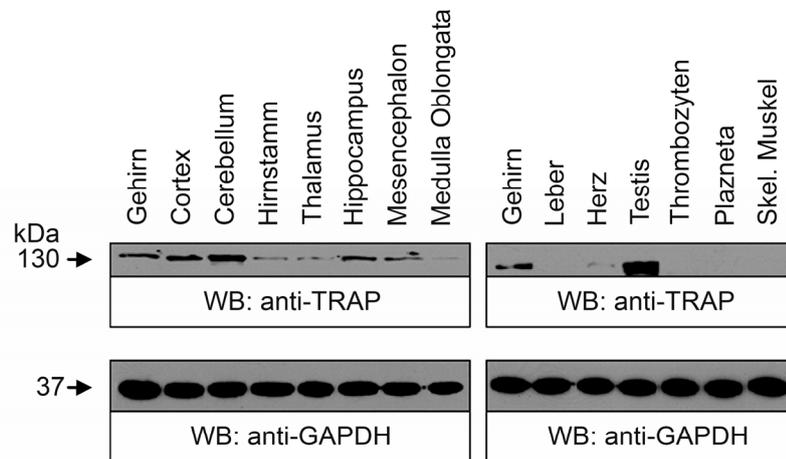


Abbildung 26: Expressionsmuster von TRAP-IR. Das Expressionsprofil von TRAP wurde mit dem Antikörper 8616 in verschiedenen humanen Geweben untersucht. Dazu wurden Proteinextrakt mittels SDS-Page und *Western Blot* auf das Vorhandensein von TRAP getestet. Immunreaktivität kann im Gehirn, hier vor allem im Cerebellum und in Testis beobachtet werden. Eine schwache Expression kann zusätzlich im Herzen erkannt werden. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Dieser Befund deckt sich mit den publizierten Daten, die eine Expression von TRAP im Gehirn und Testis in Ratten gezeigt haben. Somit scheint TRAP im Cerebellum, dem für SCA2 krankheitsrelevanten Areal im Gehirn, am stärksten exprimiert zu sein.

5.4. Alpha-Actinin-1 als Interaktor von Ataxin-2

5.4.1. Ataxin-2 interagiert mit alpha-Actinin-1 im Hefe-2-Hybrid System

Weitere Interaktoren von Ataxin-2 wurden bei einem groß angelegten Hefe-2-Hybrid Experiment gefunden, in dem die Proteine für hereditäre Ataxien und Purkinje-Zell-Degenerationen untersucht wurden (Lim, Hao et al. 2006). Ziel dieser Arbeit war es, ein großes Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk abzubilden und Zusammenhänge aufzudecken.

Unter den für Ataxin-2 gefundenen Interaktor-Kandidaten befanden sich auch die Endophiline A1 und A3 sowie TRAP und SIM (Abb. 27).

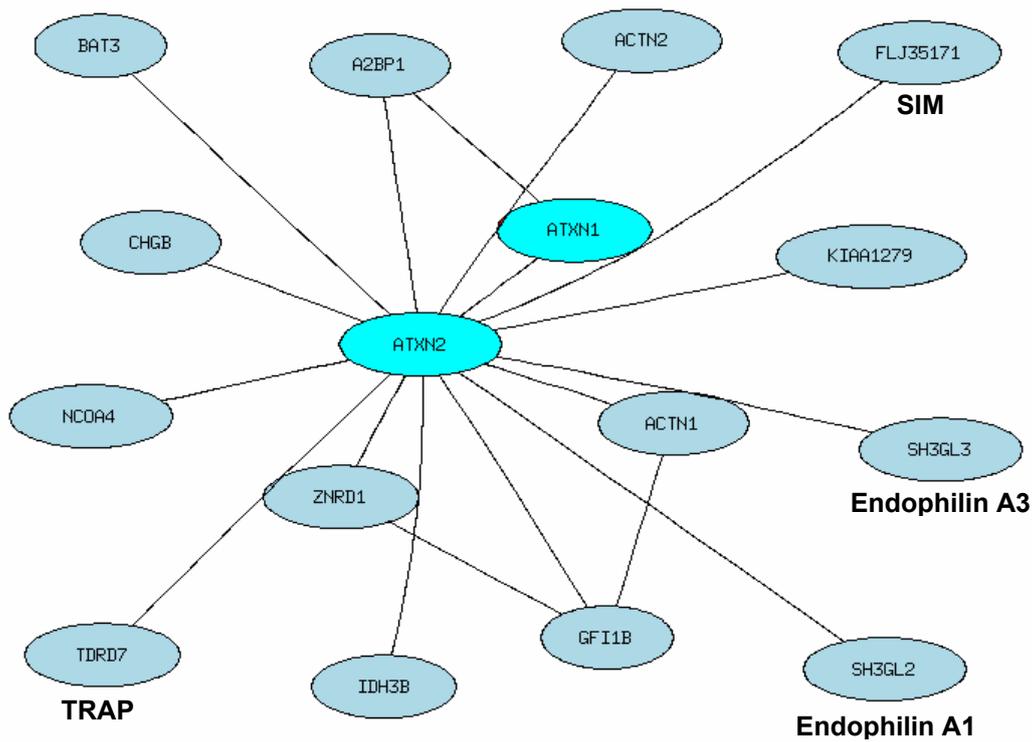


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Ataxin-2 Interaktionsnetzwerks (Lim, Hao et al. 2006).

In einem ersten Ansatz wurden Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen vier Kandidaten auf die Koimmunpräzipitation von Ataxin-2 untersucht. Dafür wurden alpha-Actinin-1 und 2 ausgewählt, da für die anderen neuen Interaktoren entweder kein Antikörper erhältlich war, oder aber die Lokalisation nukleär war. Ergänzend wurden die Proteine RENT1 und SNTB1 getestet, deren Interaktion mit Ataxin-2 von der Arbeitsgruppe von Prof. Erich Wanker in Berlin beobachtet und uns mitgeteilt worden war.

In einem Pionierexperiment wurde die Koimmunpräzipitation des endogenen Komplexes von Ataxin-2 mit dem jeweiligen Kandidaten-Interaktor getestet Falls eine physiologische Lokalisation außerhalb des Zellkerns bekannt und ein spezifischer Antikörper verfügbar war), und für Alpha-Actinin-1 ein positiver Befund erhoben (Abb. 28).

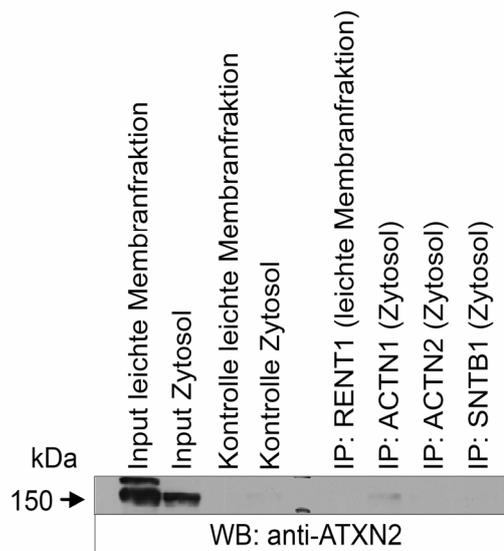


Abbildung 28: Koimmunpräzipitation von ATXN2 mit RENT1, ACTN1, ACTN2 und SNTB1. Mausgehirne wurden differentiell fraktioniert und die entsprechenden Fraktionen für Immunpräzipitationen mit RENT1-, ACTN1-, ACTN2- und SNTB1-Antikörpern eingesetzt. Die Präzipitate wurden dann auf die Koimmunpräzipitation von Ataxin-2 untersucht. Nur im Fall von ACTN1 konnte eine Koimmunpräzipitation von Ataxin-2 festgestellt werden.

5.4.2. Kolokalisation von Ataxin-2 und alpha-Actinin-1

Um weitere Hinweise für eine mögliche Interaktion und einen eventuellen Einfluss einer Mutation von Ataxin-2 zu bekommen, wurden Ataxin-2 und Alpha-Actinin-1 als Fusionskonstrukte in COS-7 Zellen exprimiert und die Kolokalisation untersucht. Alpha-Actinin-1 wurde als HA-Fusionsprotein eingesetzt. Für Ataxin-2 wurden die bereits bei SIM und TRAP verwendeten Myc-Konstrukte mit normalem und expandiertem Polyglutamintrakt eingesetzt. Alpha-Actinin-1 und Ataxin-2 kolokalisieren im Zytosol und an der Plasmamembran von COS-7 Zellen, unabhängig von der Länge des Polyglutamintraktes (Abb. 29). Intrazellulär lokalisieren beide Proteine also nahe genug aneinander, um eine Interaktion zu ermöglichen.

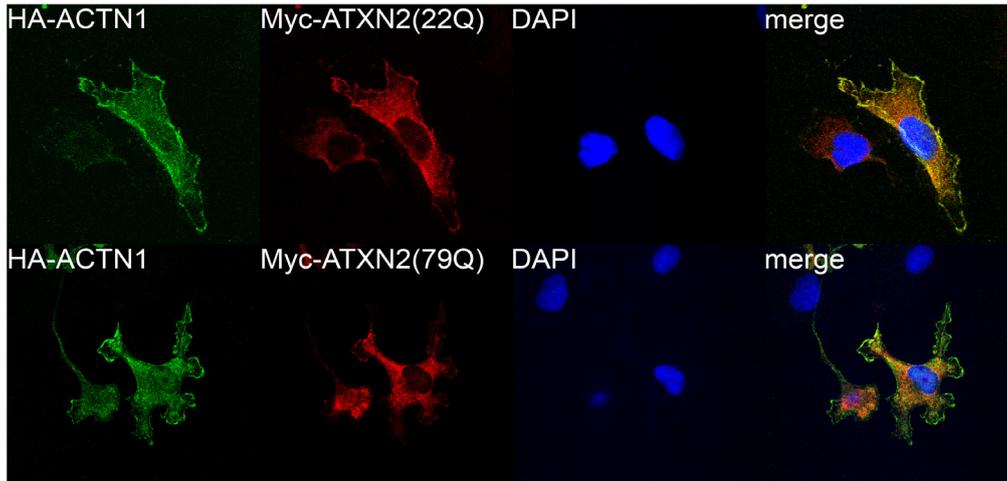


Abbildung 29: Myc-Ataxin-2 und HA-Alpha-Actinin-1 kolokalisieren unabhängig von der Länge des Polyglutamintraktes in COS-7 Zellen.
 COS-7 Zellen wurden mit HA-Alpha-Actinin-1 und Myc-Ataxin-2 Fusionskonstrukten kotransfiziert. Die Kolokalisation von Alpha-Actinin-1 und Ataxin-2 in normaler und mutierter Form wurde am konfokalen Mikroskop untersucht. Die Signale für beide Proteine überlagern sich unabhängig von der Ataxin-2-Mutation im Zytoplasma und an der Zellmembran, so dass hier eine Interaktion der beiden Proteine möglich ist.

5.4.3. Koimmunpräzipitation mit rekombinanten Proteinen

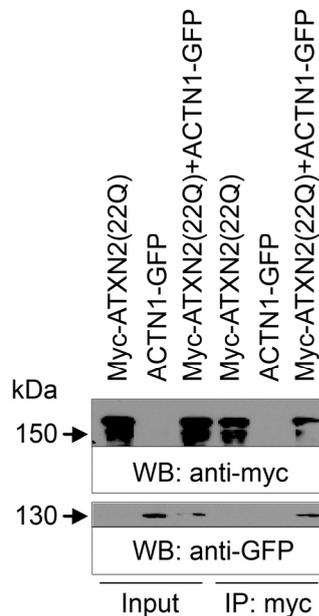


Abbildung 30: Koimmunpräzipitation von Alpha-Actinin-1-GFP und Myc-Ataxin-2 (22Q) aus HEK293 Lysaten.

Alpha-Actinin-1-GFP koimmunpräzipitiert mit Myc-Ataxin-2(22Q). HEK293 Zellen wurden mit Fusionskonstrukten von Alpha-Actinin-1 und Ataxin-2 kotransfiziert und Myc-Ataxin-2 wurde aus Zell-Lysaten präzipitiert. Alpha-Actinin-1-GFP kann im Myc-Ataxin-2 Präzipitat nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass beide Fusionsproteine einen Komplex formen.

Nachfolgend zu den Kolokalisationsexperimenten wurden Koimmunpräzipitationen mit Fusionsproteinen durchgeführt. Dazu wurden Alpha-Actinin-1-GFP und Myc-Ataxin-2 (22Q) in HEK293 Zellen überexprimiert, und mittels Immunpräzipitation mit einem Myc-Antikörper das Ataxin-2 Konstrukt präzipitiert. Das Präzipitat wurde dann mit SDS-Page und *Western blot* auf Koimmunpräzipitation von Alpha-Actinin-1-GFP untersucht (Abb. 30). Alpha-Actinin-1-GFP kann in dem Ataxin-2-Präzipitat nachgewiesen werden. Dies belegt, dass beide Fusionsproteine einen Komplex in HEK293 Zellen formen.

5.4.4. Koimmunpräzipitation mit endogenen Proteinen

Da im ersten Experiment (Abb. 28) nur mit alpha-Actinin-1 präzipitiert wurde, wurde zum abschließenden Nachweis eines endogenen Komplexes in der zytosolischen Fraktion von Mausgehirnen eine Koimmunpräzipitation in beide Richtungen durchgeführt. Hierbei konnte alpha-Actinin-1 mit Ataxin-2 koimmunpräzipitiert werden und umgekehrt (Abb. 31). Damit waren ein endogener Komplex, ein rekombinanter Komplex und eine Kolokalisation nachgewiesen.

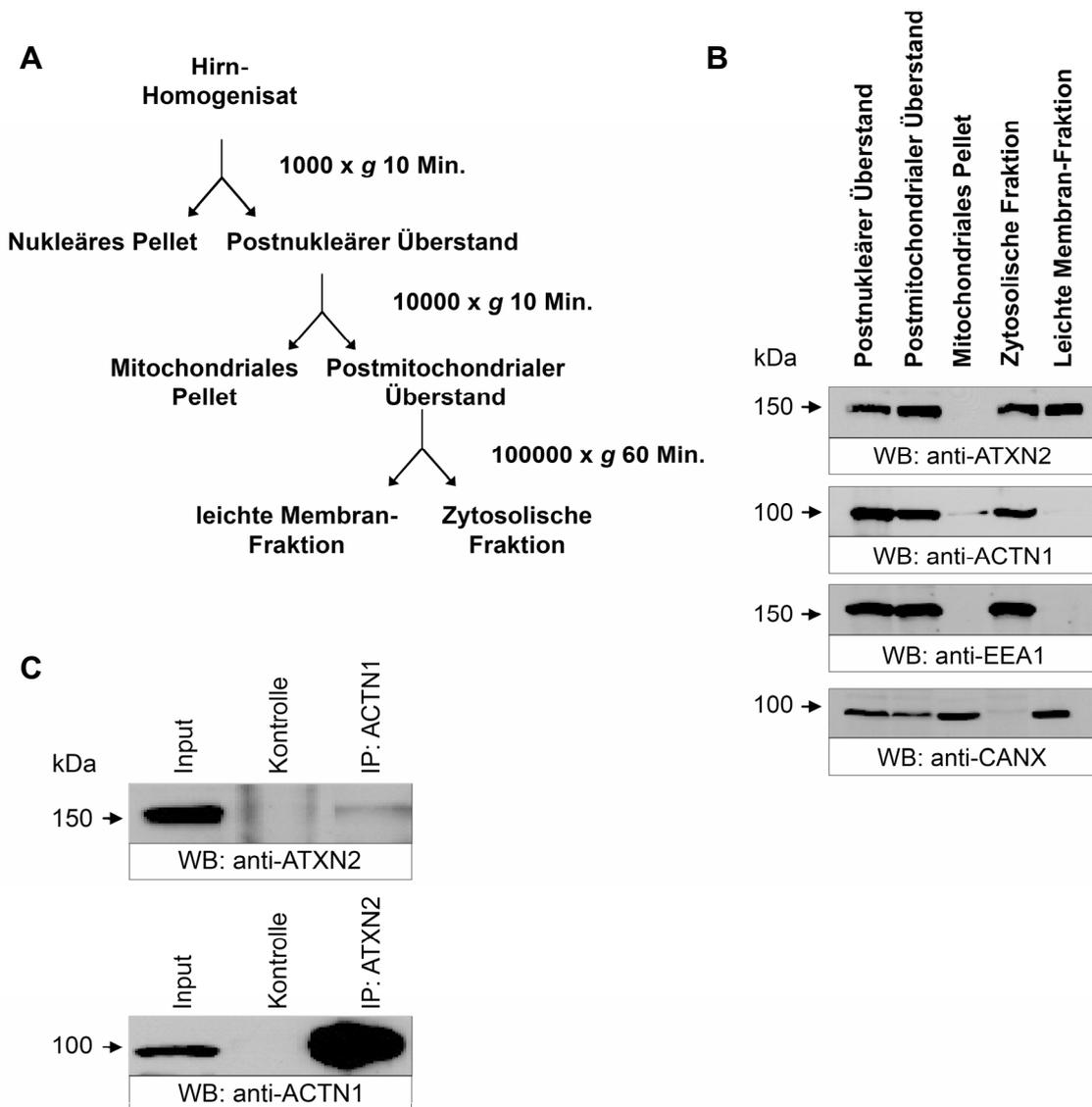


Abbildung 31: Ataxin-2 und alpha-Actinin-1 bilden einen endogenen Komplex in der zytosolischen Fraktion von Mausgehirnen. Mausgehirne wurden nach dem abgebildeten Schema fraktioniert (A) und die Verteilung von Ataxin-2 und alpha-Actinin-1 und die Reinheit der Fraktionen mit den spezifischen Markern EEA1 und CANX überprüft (B). Die zytosolische Fraktion wurde dann für Koimmunpräzitationen von Ataxin-2 und alpha-Actinin-1 verwendet (C). Im Präzipitat von Ataxin-2 kann alpha-Actinin-1 detektiert werden und umgekehrt. Dies zeigt, dass beide Proteine Bestandteil eines endogenen Komplexes im Gehirn der Maus sind.

5.4.5. GST-Pulldown von Ataxin-2 mit Alpha-Actinin-1

Der bereits bei SIM erfolgreich eingesetzte *GST-Pulldown* wurde bei alpha-Actinin-1 zur Identifizierung der interagierenden Domänen eingesetzt.

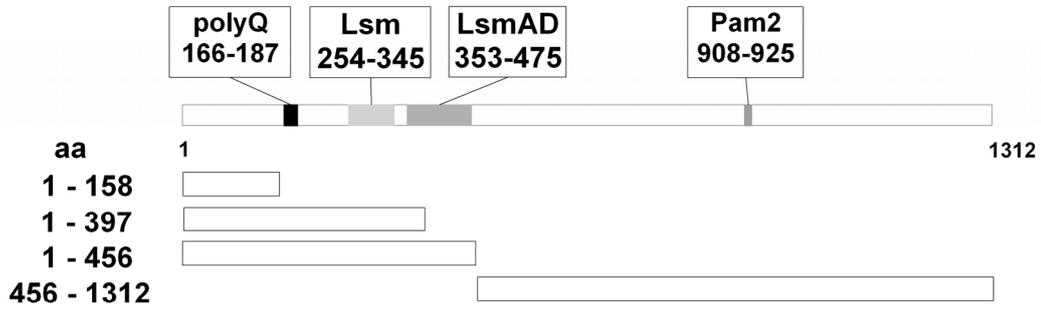
5.4.5.1. Ataxin-2 Subdomänen zur Interaktion mit Alpha-Actinin-1

Da die Interaktion von Proteinen oft durch Domänen-spezifische Faktoren gesteuert wird, wurden die Subdomänen von Ataxin-2 und Alpha-Actinin-1 in diesen Experimenten eingesetzt. Im Fall von Ataxin-2 wurden Konstrukte im Hinblick auf die Polyglutamindomäne, LSM und LSM-AD Domänen und den Rest des Proteins mit der PAM2 Domäne verwendet (Abb. 32A). Hierbei zeigte sich, dass der N-Terminus von Ataxin-2 für die Interaktion ausreicht (Abb. 32B). In diesem Bereich findet sich bisher keine funktionelle Annotation. Lediglich zwei Prolin-reiche Motive sind bekannt, die Bindungen mit SH3-Domänen eingehen können (Nonis et al., unpubliziert).

Von Alpha-Actinin-1 wurden ebenfalls einzelne Domänen eingesetzt (Abb. 33A): die N-Terminale CH1/2 Domäne, die auch die Bindung an Aktin herstellt, die einzelnen Spektrin-Domänen, welche multiple Bindungspartner haben und der C-terminale Bereich des CaM-Motivs, das für die Calcium-Sensitivität verantwortlich ist.

Die Aktin-bindende CH1/2 Domäne wurde als die Interaktionsdomäne identifiziert (Abb. 33B). Nur hier und beim voll-Längen-Protein konnte eine Bindung von Ataxin-2 beobachtet werden.

A



B

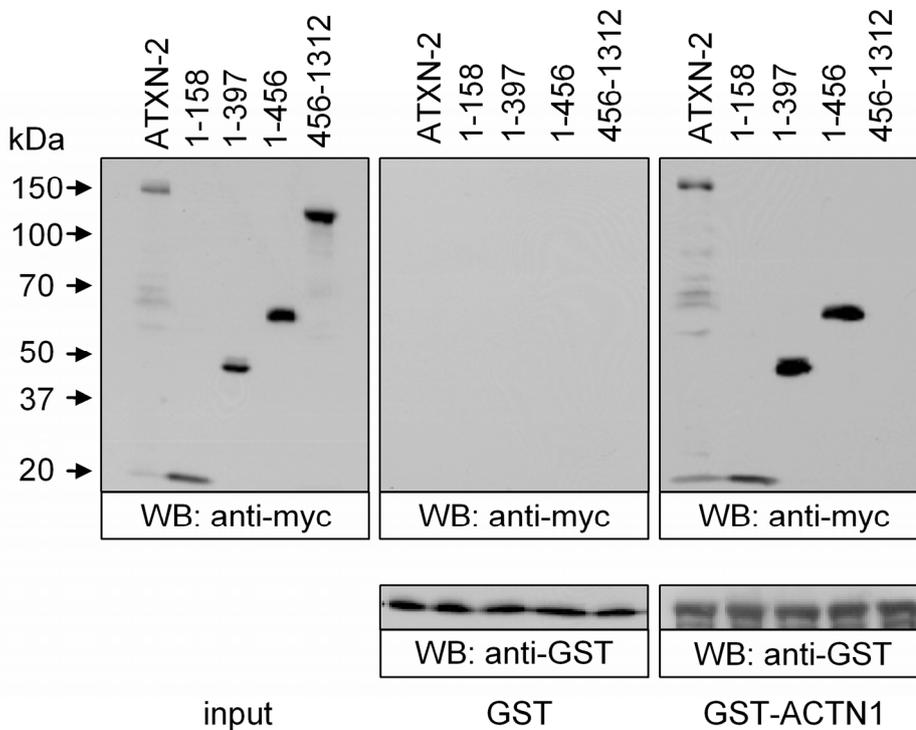


Abbildung 32: Der N-Terminus von Ataxin-2 ist für die Interaktion mit Alpha-Actinin-1 verantwortlich.

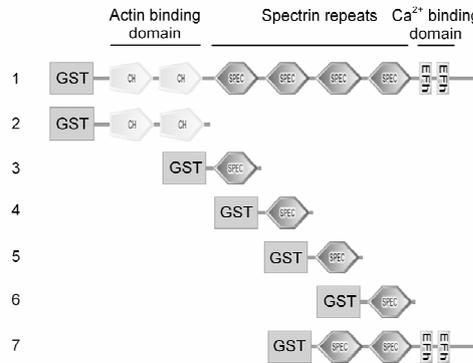
A) Domänenstruktur von Ataxin-2 und eingesetzte Konstrukte

B) GST-Pulldown von Ataxin-2 und Subdomänen mit GST-Alpha-Actinin-1.

GST und GST-Alpha-Actinin-1 wurden auf GSH-Sepharose geladen, und mit Lysaten von HEK293 inkubiert, die mit Ataxin-2 in voller Länge oder einzelnen Subdomänen transfiziert worden waren. Die Bindung wurde mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert. Die Kontrolle mit GST ohne Fusionsprotein zeigt keine Bindungen, GST-ACTN1 bindet mit allen Konstrukten, die den N-Terminus von Ataxin-2 enthalten.

5.4.5.2. Alpha-Actinin-Subdomänen zur Interaktion mit Ataxin-2

A



B

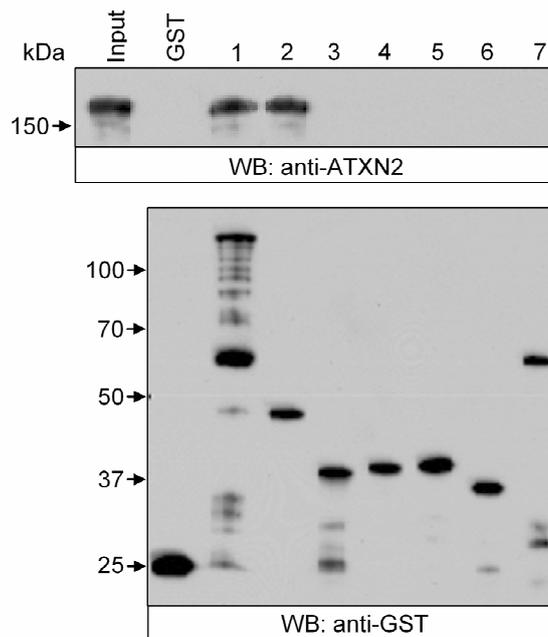


Abbildung 33: Die Aktin-bindende Domäne von Alpha-Actinin-1 interagiert mit Ataxin-2

A) Domänenstruktur von Alpha-Actinin-1 und eingesetzte Konstrukte

B) GST-Pulldown von Ataxin-2 mit GST-Alpha-Actinin-1 und Subdomänen.

Lysate von mit Myc-Ataxin-2 transfizierten HEK293 Zellen wurden mit GSH-Sepharose inkubiert, die mit GST, GST-ACTN1 und den Konstrukten der Subdomänen beladen waren. Danach wurde mittels SDS-Page und *Western Blot* die Bindung von Ataxin-2 an die Konstrukte untersucht. Das voll-Längen Protein bindet an Ataxin-2 und die Aktin-bindende Domäne, die aus den CH1 und CH2 Subdomänen besteht.

5.4.5.3. Einfluss der Polyglutaminexpansion auf die Bindung von Ataxin-2 mit Alpha-Actinin-1

Um den Einfluss der Polyglutaminexpansion auf die Bindung zwischen Ataxin-2 und Alpha-Actinin-1 zu untersuchen, wurden Konstrukte von Ataxin-2 mit expandiertem Polyglutamintrakt (Abb. 34A) in den *Pulldown* mit voll-Längen Alpha-Actinin-1 eingesetzt. Hierbei konnte kein Effekt des expandierten Polyglutamintraktes auf die Bindung mit Alpha-Actinin-1 beobachtet werden (Abb. 34B). Somit scheint die Bindung von Ataxin-2 und Alpha-Actinin-1 mutationsunabhängig zu sein.

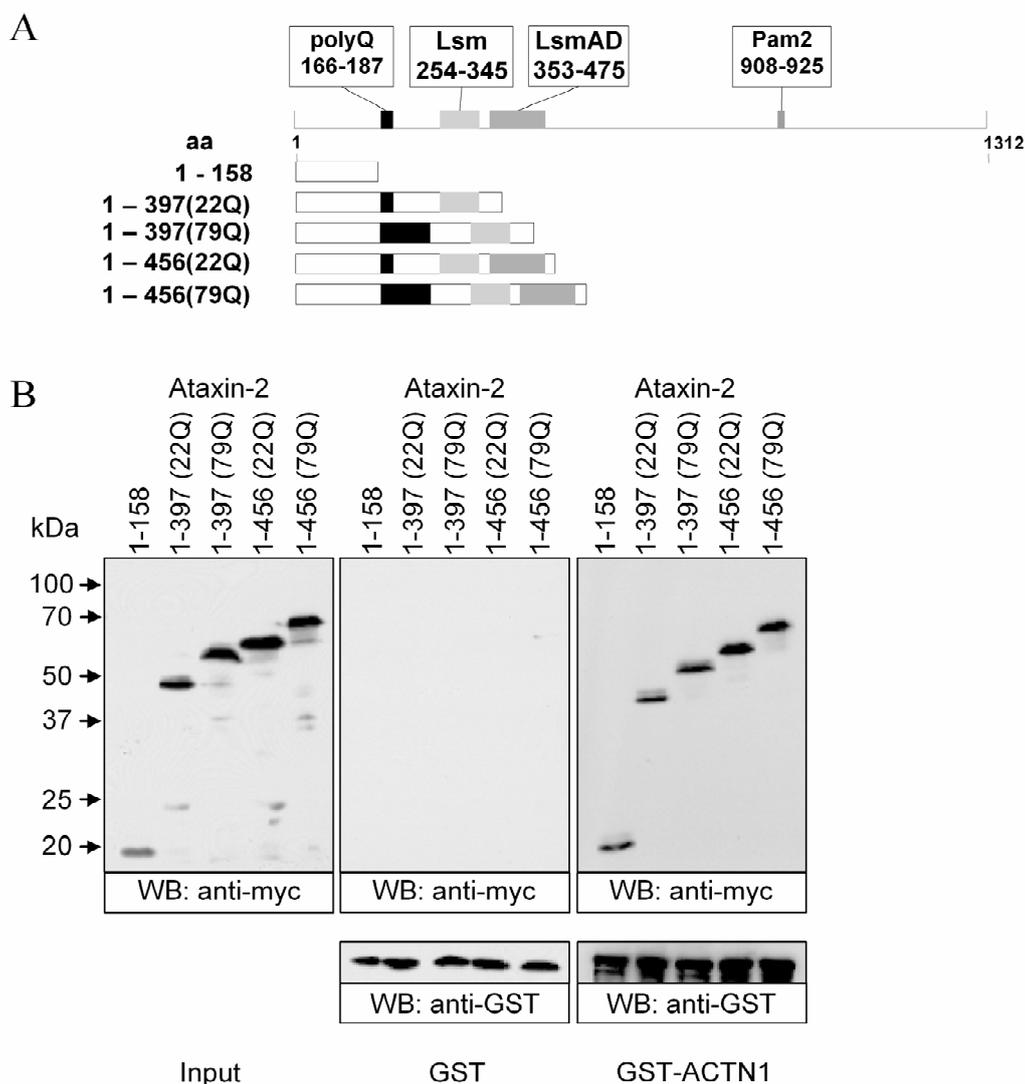


Abbildung 34: Die Expansion des Polyglutamintraktes von Ataxin-2 hat keinen Einfluss auf die Bindung mit Alpha-Actinin-1

A) Domänenstruktur von Ataxin-2 und eingesetzte Konstrukte

B) GST-Pulldown von Ataxin-2-Subfragmenten mit normalem und expandiertem Polyglutamintrakt mit GST-Alpha-Actinin-1. Die Ataxin-2 Subfragmente wurden in HEK293 Zellen exprimiert und dann in einen GST-Pulldown mit GST-Alpha-Actinin-1 eingesetzt. Die Bindung wurde mit SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert. Alle Konstrukte von Ataxin-2 binden unabhängig von der Länge des Polyglutamintraktes.

5.4.6. Analyse der Stressfasern in Fibroblasten von SCA2-Patienten

Da Alpha-Actinin-1 ein essentieller Bestandteil der Stressfasern innerhalb der Zelle ist, wurde untersucht, ob sichtbare Unterschiede zwischen Patienten- und Kontroll-Hautfibroblasten im Bezug auf Stressfasern bestehen. Im Hinblick auf die Auswirkungen der *Ataxin-2 loss-of-function* Mutation auf das Aktin-Zytoskelett in *Drosophila* (Satterfield, Jackson et al. 2002) und der Rückbildung des Aktin-abhängigen Dendritenbaums als frühes Merkmal in der Pathogenese von SCA2 (Huynh, Figueroa et al. 2000) schien dieses Experiment naheliegend.

Dazu wurden die Zellen auf Deckgläsern unter Normalbedingungen ausgesät oder durch Serumentzug zu vermehrter Ausbildung von Stressfasern angeregt. 36 Stunden nach Serumentzug wurden die Zellen dann fixiert und die Stressfasern mit Phalloidin-Alexa 488 gefärbt. Danach wurden die Zellen mikroskopisch analysiert und verglichen.

In der mikroskopischen Analyse zeigten sich keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen und es konnte kein prominenter Effekt in der Induktion von Stressfasern erkannt werden (Abb. 35). Allerdings könnte dies aus der generellen Resistenz von Fibroblasten gegenüber zellulärem Stress resultieren.

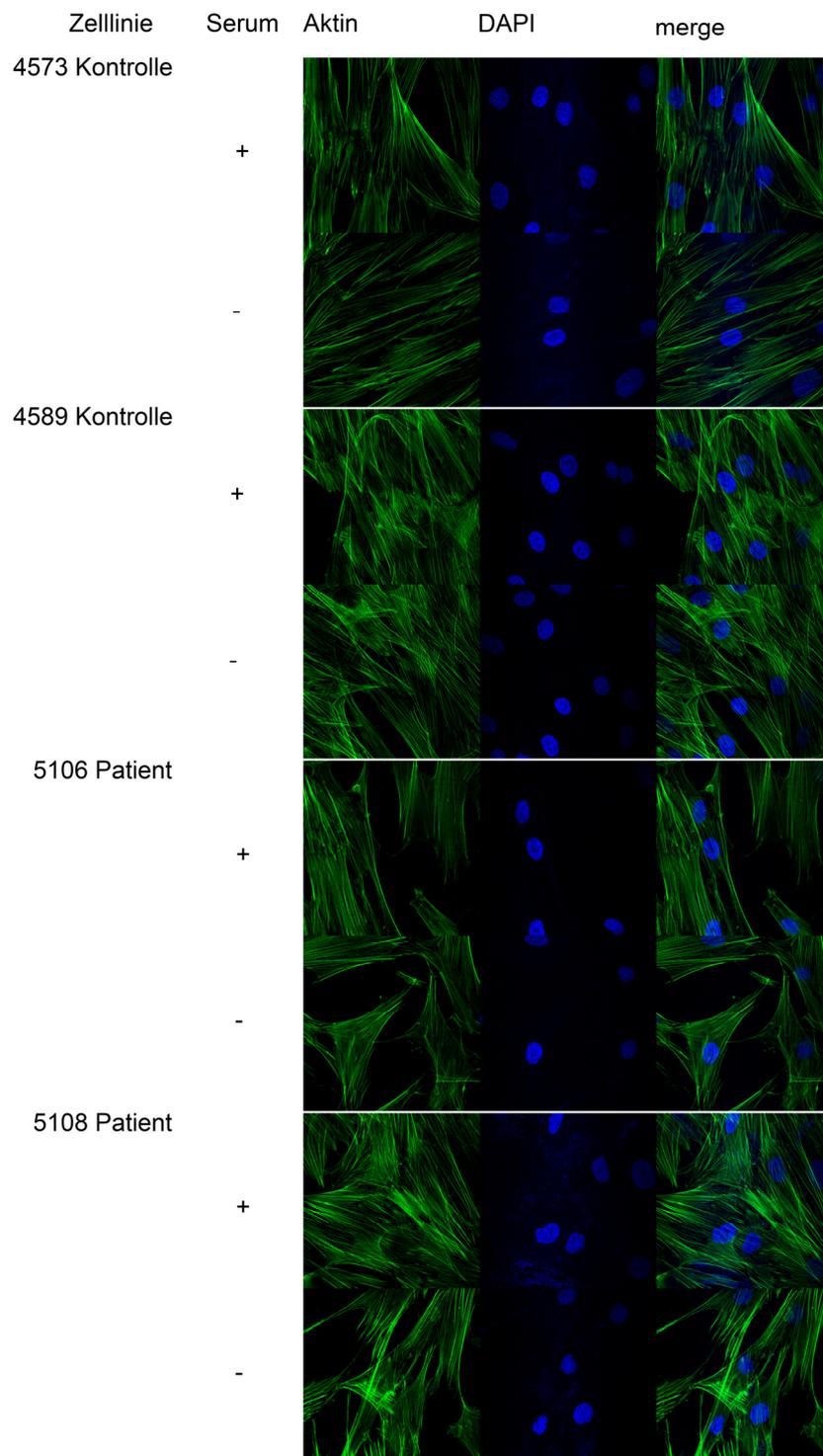


Abbildung 35: Die Stressfasern in SCA2-Patienten-Fibroblasten sind nicht verändert. Die Stressfasern von zwei Patienten- und zwei Kontroll-Fibroblastenlinien wurden mittels Phalloidin-Alexa 488 angefärbt. Es konnten keine Unterschiede in der Organisation der Stressfasern beobachtet werden. Auch nach Serumentzug zeigte sich keine Veränderung der Stressfasern.

5.4.7. FRAP Analyse der Alpha-Actinin-1-Dynamik

Da in der statischen Betrachtung der Stressfasern in Fibroblasten von Patienten und Kontrollen keine Unterschiede zu sehen waren, sollte nun die Dynamik von Alpha-Actinin-1 untersucht werden.

Dazu wurden Patienten- und Kontroll-Fibroblasten mittels Elektroporation mit Alpha-Actinin-1-GFP transfiziert und die Dynamik des fluoreszierenden Konstruktes mittels *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) gemessen. Zwei Variablen konnten auf diese Weise untersucht werden: erstens das Verhältnis zwischen mobiler und stationärer Phase, also in der Zelle lokal fixiertem und frei beweglichen Fusionsprotein und zweitens die Geschwindigkeit, mit der sich die mobile Phase des Proteins bewegte. Dazu wurden sechs Messpunkte (*region of interest*, ROI) in der Zelle markiert (Abb. 36A). Die Messpunkte eins bis vier lieferten Daten, während der fünfte Punkt als Negativ-Wert an einer Stelle ohne Fluoreszenz platziert wurde. Der sechste Punkt wurde auf einen ungebleichten größeren Bereich gelegt, um die Veränderungen der Fluoreszenz durch die Anregung bei der Bildaufnahme zu verfolgen und in die Auswertung einbeziehen zu können.

Das transfizierte Alpha-Actinin-1 zeigte keine Veränderungen im Verhältnis von mobiler zu stationärer Phase (Abb. 36C) und auch keinen Unterschied in der Dynamik des Konstruktes (Abb. 36D). Somit konnten über die Untersuchung der Alpha-Actinin-1-Dynamik in den Zellen keine Aufschlüsse über einen möglichen mutationsabhängigen Effekt von Ataxin-2 gewonnen werden.

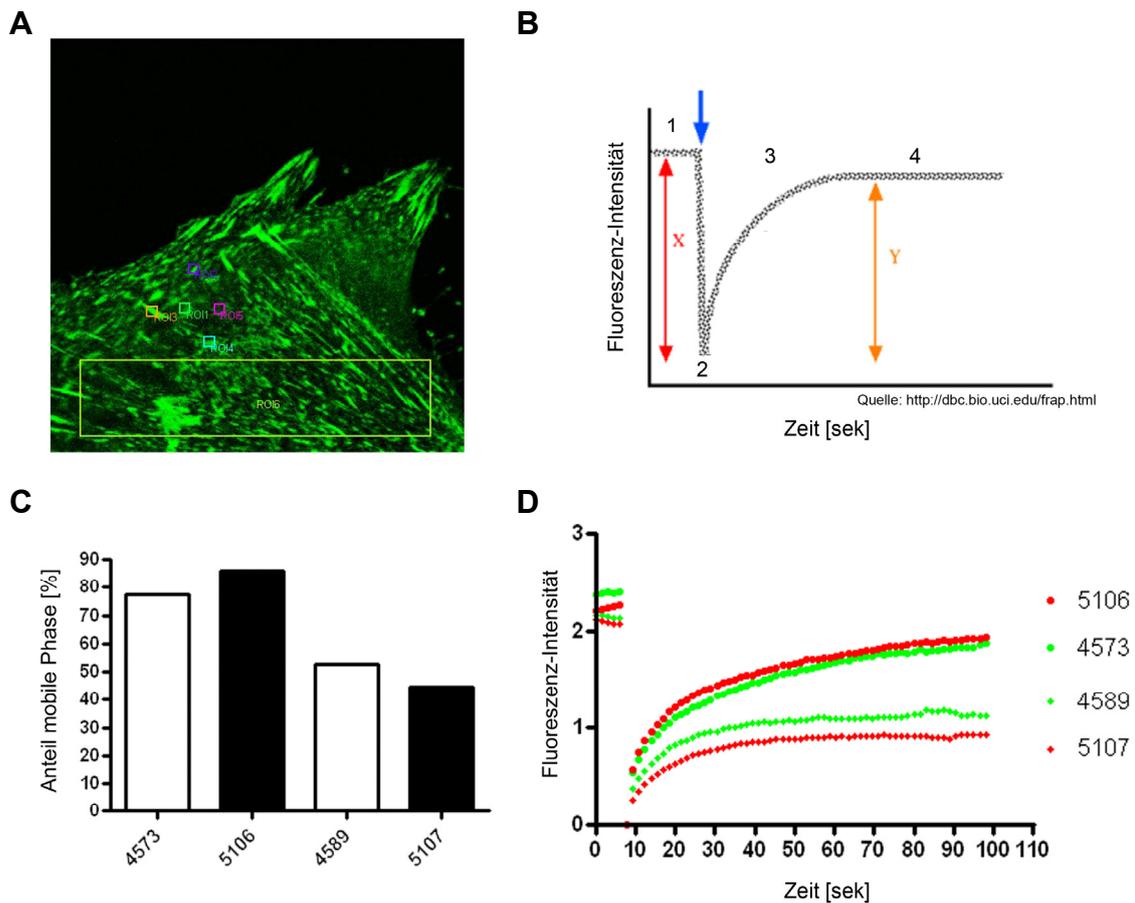


Abbildung 36: FRAP-Untersuchungen zur Alpha-Actinin-1-Dynamik in Fibroblasten von Patienten und Kontrollen zeigen keine signifikanten Unterschiede:

Fibroblasten von Patienten (5106 und 5107) und Kontrollen (4573 und 4589) wurden mittels Elektroporation mit einem Alpha-Actinin-1-GFP Fusionsprotein transfiziert. Dann wurden FRAP-Experimente zur Analyse der Dynamik an einem Leica TCS 4D Mikroskop durchgeführt.

A) Beispielhafte Darstellung der Messpunkte in einer Zelle. In einer Zelle wurden 6 Messpunkte (ROI) markiert, ROI 1-4 lagen auf Strukturen mit hoher Fluoreszenz-Intensität, ROI 5 dient als Kontrolle in einem Bereich ohne Fluoreszenz innerhalb der Zelle und ROI 6 dokumentiert die Auswirkungen der Bildaufnahme.

B) Schematische Darstellung einer typischen FRAP-Kurve. Bei (1) wird die Basallinie der Fluoreszenz vor dem Bleichen gemessen, (2) zeigt die Photo-Bleichung. Der Bereich (3) dient zur Untersuchung der Dynamik und bei (4) ist eine Sättigung erreicht. Die Differenz zwischen (1) und (4) ergibt den Anteil der immobilen Phase.

C) Das Verhältnis von mobiler Phase zu stationärer Phase variierte stark zwischen den Zelllinien. Es war kein Unterschied zwischen Patient und Kontrolle sichtbar.

D) Die Dynamik von Alpha-Actinin-1 war in Patienten-Fibroblasten nicht signifikant verändert. Für jede der abgebildeten Kurven wurden in fünf Zellen die Messpunkte ausgewertet und zusammengefasst. Jede Messung bestand aus fünf Bildern vor dem Bleichen und 65 Bildern danach. Der Abstand zwischen den Aufnahmen wurde auf 1,5 Sekunden festgesetzt.

Die Dynamik von Alpha-Actinin-1 in den verschiedenen Zellen zeigt größere Varianz, so dass keine Unterscheidung zwischen Patient und Kontrolle messbar war.

5.4.8. Experimente zur EGF-Rezeptor Internalisierung

Bisher unveröffentlichte Experimente unserer Arbeitsgruppe haben einen Einfluss von Ataxin-2 auf die Internalisierung des EGF-Rezeptors gezeigt (Nonis et al., eingereicht). Da alpha-Actinine an der Internalisierung von Rezeptoren mitwirken (Wyszynski, Lin et al. 1997; Wyszynski, Kharazia et al. 1998; Nuriya, Oh et al. 2005; Cabello, Remelli et al. 2007; Merrill, Malik et al. 2007; Michailidis, Helton et al. 2007), wurden Experimente zur EGF-Aufnahme und der daraus resultierenden Signalübertragung gemacht. Dies erschien vor allem vor dem Hintergrund sinnvoll, dass bereits für das Polyglutamin Krankheitsprotein Huntingtin eine Verbindung zum EGF-Rezeptor dokumentiert war (Liu, Deth et al. 1997; Song, Perides et al. 2002; Rao, Bradley et al. 2003; Lievens, Rival et al. 2005). Die Internalisierung und das *signalling* von Rezeptortyrosinkinasen, hier insbesondere des EGF-Rezeptors, sind gut untersucht und boten mehrere Ansatzpunkte (Kolch 2005; McKay and Morrison 2007). Die Signaltransduktion und die beteiligten Proteine sind vereinfacht in Abbildung 37 dargestellt.

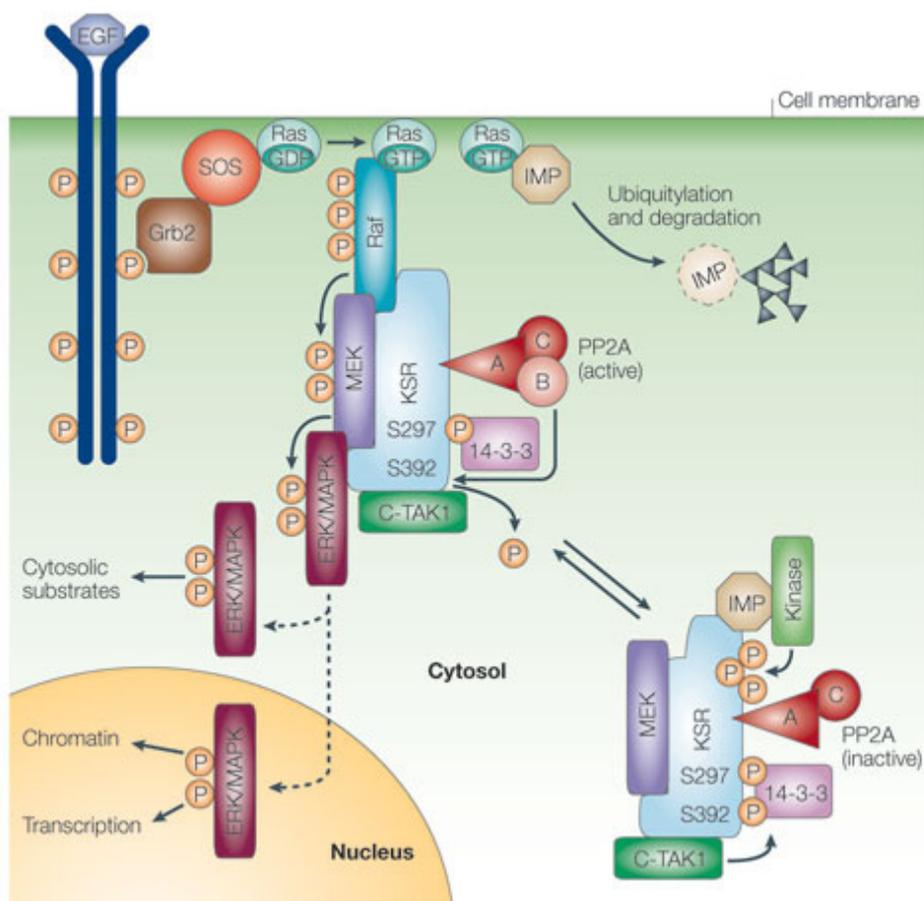


Abbildung 37: Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) zu ERK (Kolch 2005). An der Plasmamembran lösen aktivierte RTKs über die Rekrutierung von GRB2/SOS Komplexen die Aktivierung von Ras aus. Aktiviertes Ras bindet an Raf, das MEK phosphoryliert und dadurch aktiviert. MEK phosphoryliert dann ERK, von wo aus das Signal sowohl im Zytosol als auch im Nucleus weitergegeben wird.

Fallon et al. haben publiziert, dass die Aufnahme des EGF-Rezeptors in Abwesenheit des Ataxin-2 Proteininteraktors Parkin beschleunigt ist und konnten gegenteilige Effekte bei rekombinanter Überexpression von Parkin zeigen (Fallon, Belanger et al. 2006). In Anlehnung an diese Experimente wurde ein Einfluss von rekombinant exprimiertem alpha-Actinin-1 auf die Signaltransduktion des EGF-Rezeptors untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen und MDA-MB-468 Zellen mit HA-alpha-Actinin-1 transfiziert und die Aufnahme von EGF einerseits mit Alexa 488 gekoppeltem EGF dargestellt (Abb. 38A). Die EGF-induzierte Signaltransduktion wurde anhand der Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht (Abb. 38B). Dabei führte die Überexpression von alpha-Actinin-1 allerdings zu keiner Veränderung der EGF-Aufnahme und somit zu keiner Beeinflussung der Phosphorylierung von ERK1/2. Weitere Untersuchungen zur ERK1/2 Phosphorylierung wurden an Fibroblasten von SCA2-Patienten und Kontrollen durchgeführt (Abb. 39), zeigten aber auch keine Unterschiede auf.

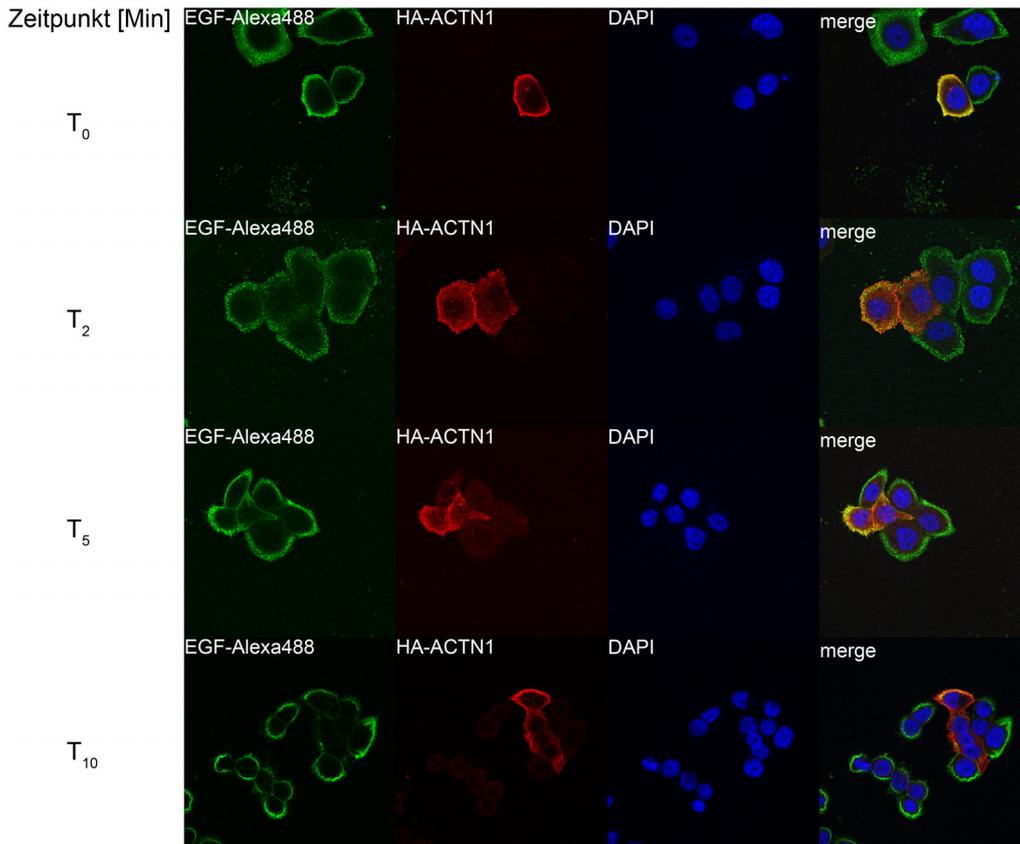
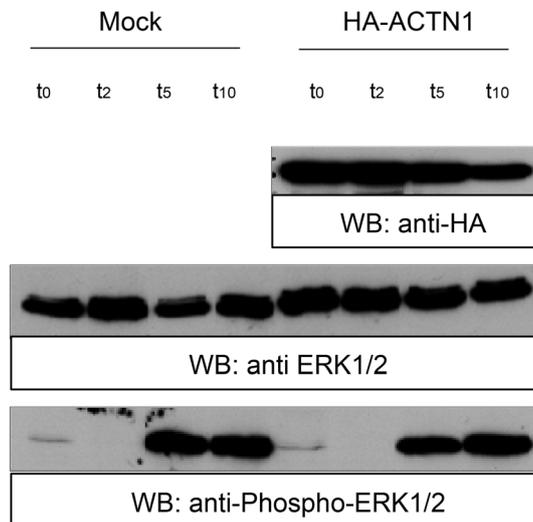
A**B**

Abbildung 38: Die Überexpression von alpha-Actinin-1 hat keinen Einfluss auf die Internalisierung von EGF und die Phosphorylierung von ERK1/2.

A) MDA-MB-468 Zellen wurden mit HA-ACTN1 transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Alexa 488 gekoppeltem EGF inkubiert und nach 0, 2, 5 und 10 Minuten fixiert. HA-ACTN1 wurde immunzytochemisch markiert und der Verlauf der EGF-Aufnahme mikroskopisch dokumentiert. Zwischen den HA-ACTN1 positiven und untransfizierten Zellen konnte kein Unterschied in der EGF-Aufnahme beobachtet werden.

B) HeLa-Zellen wurden mit HA-ACTN1 transfiziert und nach 24 Stunden mit EGF stimuliert. Die aus der Stimulation resultierende Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mittels SDS-PAGE und *Western blot* detektiert. Es konnte kein Unterschied in der Phosphorylierung zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen gefunden werden.

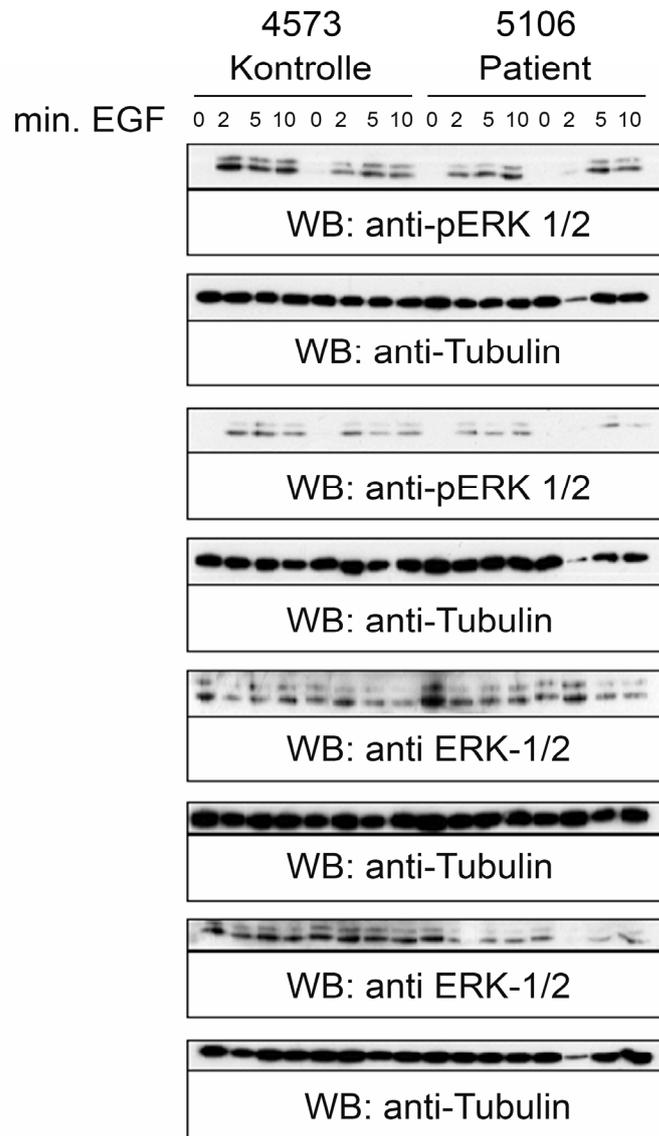


Abbildung 39: Die Phosphorylierung von ERK1/2 ist in den Fibroblasten von SCA2-Patienten nicht verändert.

Fibroblasten von SCA2-Patienten und Kontrollen wurden mit EGF stimuliert und die Phosphorylierung von ERK1/2 mit SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Dazu wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein geladen und Antikörper gegen ERK1/2 und phospho-ERK1/2 zur Detektion verwendet. Die Stimulation durch EGF kann anhand der Phosphorylierung von ERK1/2 gut erkannt werden. Das Verhältnis von Gesamt-ERK1/2 zu phosphoryliertem ERK1/2 zeigt allerdings keinen Unterschied zwischen SCA2-Patienten und Kontrollen.

Da in den Fibroblasten von SCA2-Patienten und Kontrollen kein Unterschied in der Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet werden konnte, wurden für weitere Experimente embryonale Fibroblasten (MEF) der SCA2-Knock-Out-Maus verwendet. Der Gedanke war, dass hier eventuelle Effekte besser zu sehen sein würden als in den Fibroblasten der Patienten.

In den MEFs sollte die Phosphorylierung von MEK1 untersucht werden, diese findet vor der Phosphorylierung von ERK1/2 statt, nach der Aktivierung von Raf durch Ras (Kolch 2005; McKay and Morrison 2007).

Die MEFs von allen verwendeten Linien wurden bis zur neunten und zehnten Passage kultiviert und dann mit EGF stimuliert. Als negativ-Kontrolle wurde die Phosphorylierung von MEK1 mit U0126 inhibiert.

Mittels eines ELISA wurde dann die Phosphorylierung von MEK1 untersucht (Abb. 40). Dazu wurde die Gesamtmenge an MEK1 (Abb. 40A) und die Menge an phosphoryliertem MEK1 (Abb. 40B) gemessen und ein Quotient aus diesen Werten gebildet (Abb. 40C). Es konnte zwar eine Verminderung der Phosphorylierung von MEK1 in den MEFs der Knock-Out-Maus gemessen werden, allerdings ist der Unterschied nicht signifikant.

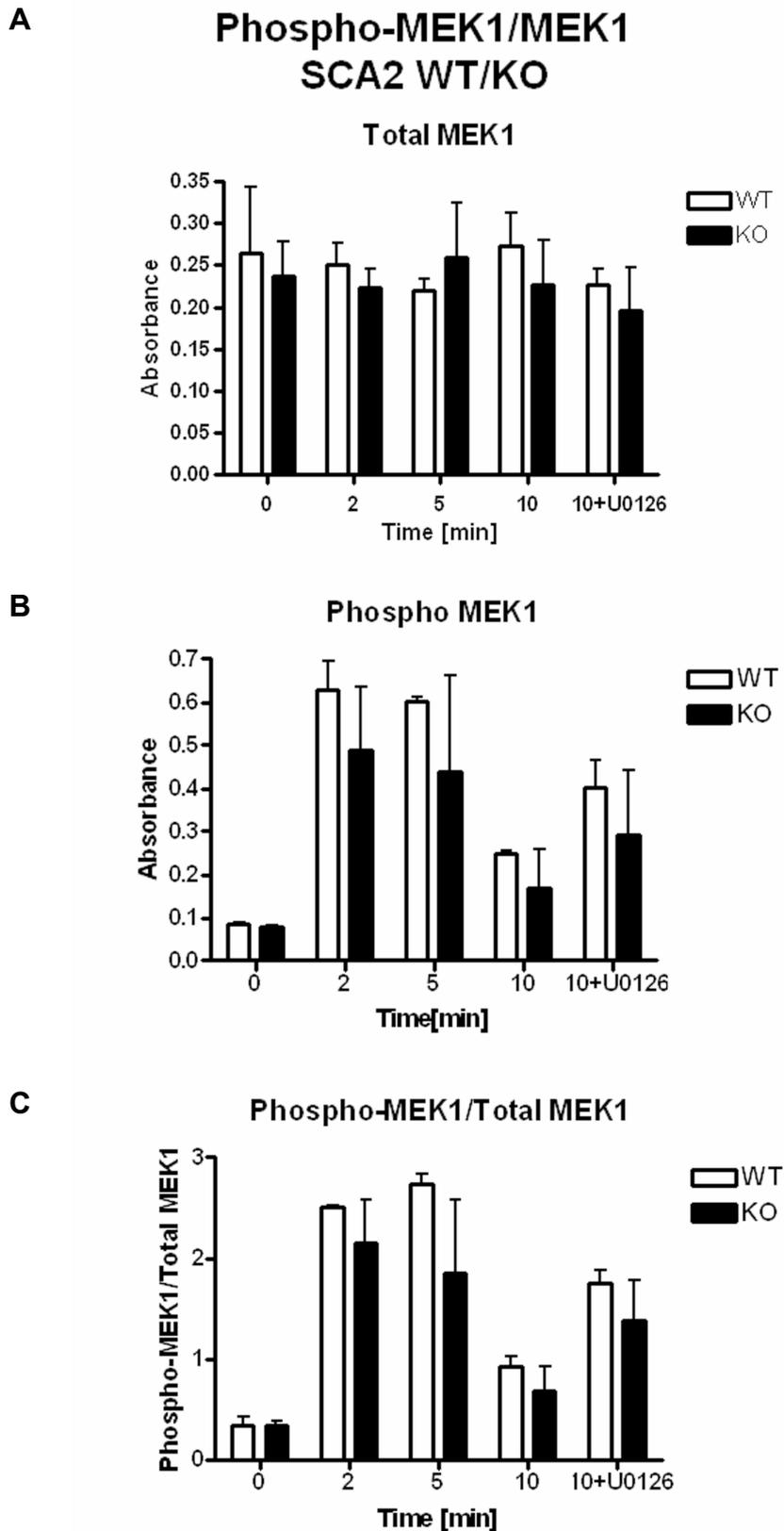


Abbildung 40: Vergleich von aktivierter MEK1 aus SCA2-KO-Mäusen mit Wildtypen. MEFs aus jeweils zwei KO- und zwei Wildtyp-Linien wurden mit EGF für 0, 2, 5 und 10 Minuten stimuliert und dann die Phosphorylierung von MEK1 im ELISA analysiert
 A) Die Menge an MEK1 ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen WT und KO.
 B) Die Phosphorylierung von MEK1 ist im KO vermindert, allerdings nicht signifikant.
 C) Die Phosphorylierung von MEK1 im Bezug zur Gesamtmenge zeigt die in B) beobachtete Verminderung der Aktivierung etwas besser, allerdings ist auch hier das Ergebnis nicht signifikant.

5.4.9. Bindung von alpha-Actinin-1 mit weiteren Proteinen des Endozytoseapparates

Da in unserer Arbeitsgruppe Grb2 und c-Cbl, Proteine des EGF-Rezeptor-Internalisierungs- und Signaltransduktionskomplexes als Interaktoren von Ataxin-2 identifiziert werden konnten (Nonis et al., zur Publikation eingereicht), wurden weitere Proteine aus diesem Komplex auf eine Interaktion mit alpha-Actinin-1 untersucht.

5.4.9.1. Alpha-Actinin-1 bindet an c-Cbl und CIN-85

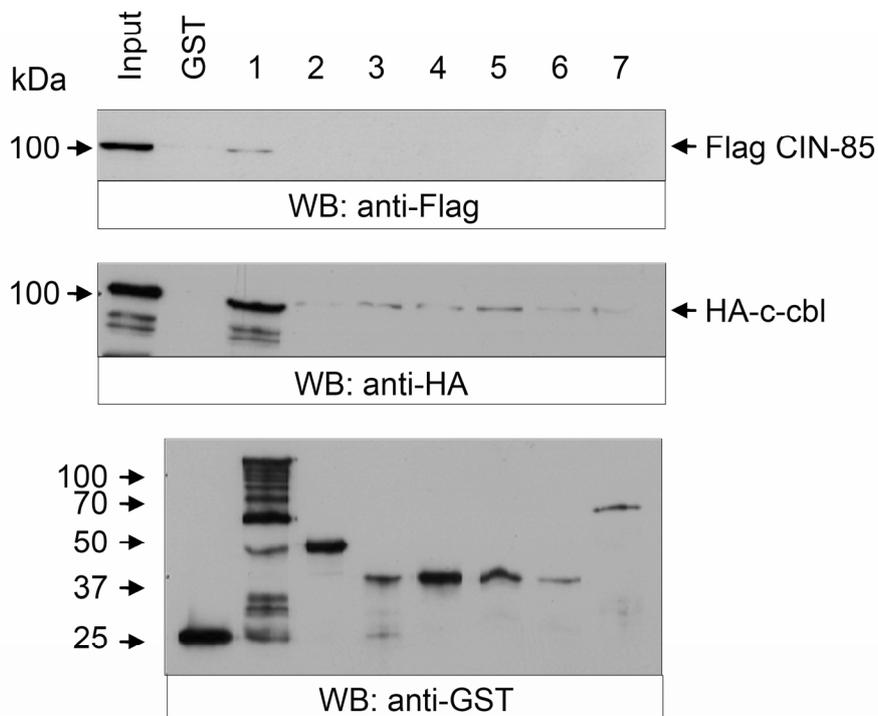


Abbildung 41: Alpha-Actinin-1 bindet c-Cbl und CIN-85, zwei Proteine des Endozytosekomplexes. Alpha-Actinin-1 und seine Subdomänen wurden in GST-Pull-down Experimenten mit HA-c-Cbl und Flag-CIN-85 eingesetzt. Eine Bindung kann nur mit dem Alpha-Actinin-1 voll-Längen-Konstrukt beobachtet werden.

Untersucht wurde die Bindung von c-Cbl und CIN-85. Beide Proteine sind Teil des Internalisierungskomplexes und haben regulative Eigenschaften in diesem (Petrelli, Gilestro et al. 2002; Soubeyran, Kowanetz et al. 2002; Szymkiewicz, Kowanetz et al. 2002). Beide Proteine wurden rekombinant in HEK293 Zellen exprimiert und dann mit den bereits beschriebenen (5.4.2.5.) GST-Fusionsproteinen von alpha-Actinin-1 und dessen Subdomänen in GST-Pull-down Experimenten eingesetzt. Bindungen konnten mit voll-

Längen-alpha-Actinin-1 gefunden werden, aber keine der Subdomänen zeigte eine Bindung (Abb. 41). Dies könnte auf eine indirekte Bindung hinweisen, die durch ein Adapter-Protein vermittelt wird.

5.5. Subzelluläre Lokalisation von Ataxin-2

Im Rahmen weiterer Experimente unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Ataxin-2 nicht wie beschrieben am Golgi-Apparat (Huynh, Yang et al. 2003), sondern eher am ER lokalisiert (van de Loo et al., zur Publikation eingereicht). Dies wird durch Untersuchungen gestützt, die Ataxin-2 mit Polyribosomen in Verbindung bringen (Satterfield and Pallanck 2006; Lastres-Becker, Brodesser et al. 2008). Da in den Kolokalisationsexperimenten im Rahmen dieser Arbeit keine Lokalisation am Golgi-Apparat beobachtet werden konnte, wurden endogenes Ataxin-2 und Markerproteine für ER und Golgi-Apparat in Hela-Zellen immunzytochemisch gefärbt und die Kolokalisation untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Ataxin-2 mit keinem der Golgi-Marker Tgn46 und Giantin kolokalisiert, aber Kolokalisationen mit beiden ER-Markern, Calnexin und Calreticulin, aufweist (Abb. 42).

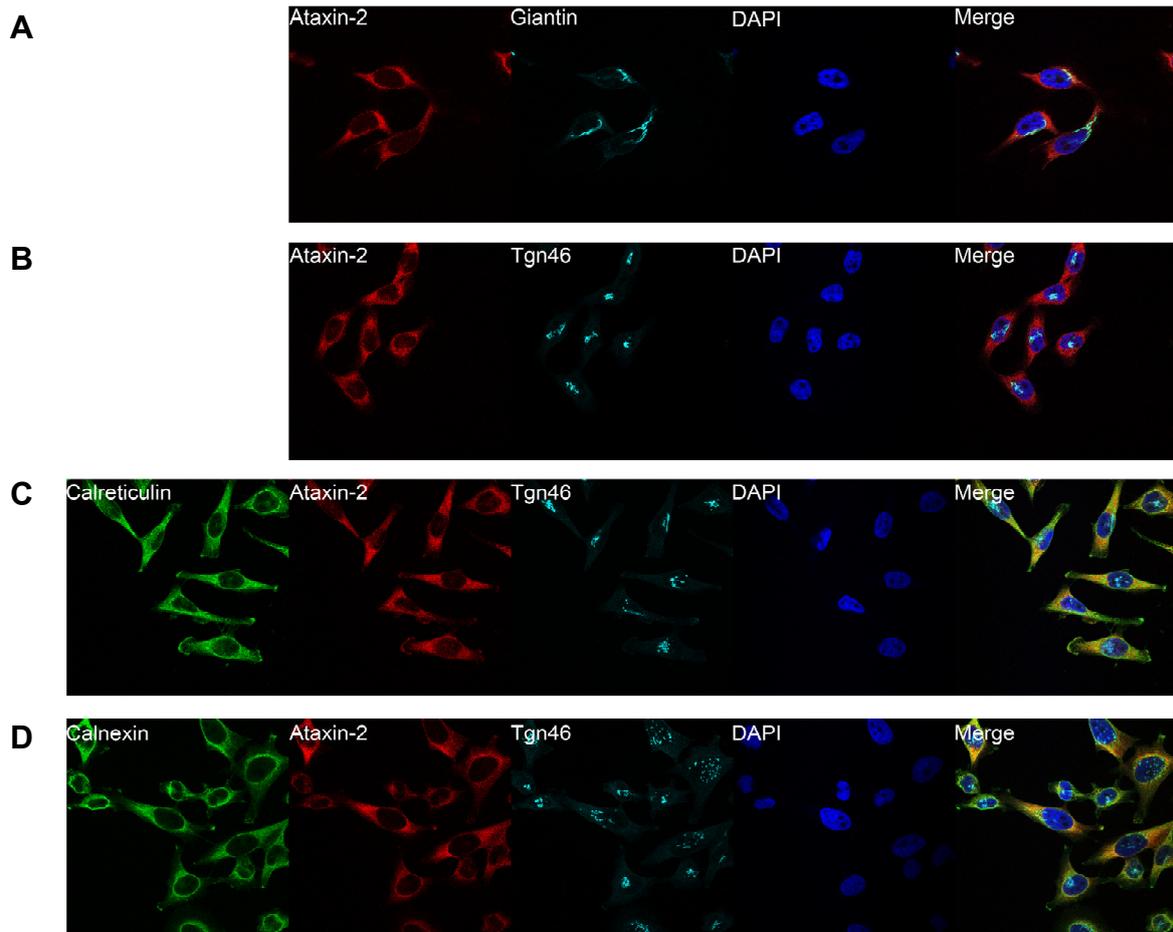


Abbildung 42: Immunzytochemische Untersuchung zur Lokalisation von Ataxin-2 in HeLa-Zellen. HeLa Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert, anschließend Ataxin-2, Giantin, Tgn46, Calreticulin und Calnexin detektiert.

- A) Kolokalisation von Giantin und Ataxin-2. Für Giantin (türkis) kann eine klare Lokalisation am Golgi-Apparat beobachtet werden, allerdings keine Kolokalisation mit Ataxin-2 (rot).
- B) Kolokalisation von Tgn46 und Ataxin-2. Auch der zweite Golgi-Marker, Tgn46, kolokalisiert nicht mit Ataxin-2.
- C) Dreifachfärbung von Calreticulin (grün), Tgn46 (türkis) und Ataxin-2 (rot). In der Dreifachfärbung wird die Lokalisation von Ataxin-2 am ER deutlich. Mit Tgn46 besteht im Gegensatz zu Calreticulin keine Kolokalisation.
- D) Dreifachfärbung von Calnexin (grün), Tgn46 (türkis) und Ataxin-2 (rot). Wie auch in C) zu sehen, kolokalisiert Ataxin-2 mit dem ER-Marker und nicht mit dem Golgi-Marker.

5.6. Untersuchungen zum Transkriptom der SCA2 KO-Maus mittels qrt-RT-PCR

Eine konstitutive SCA2-Knock-Out-Maus wurde von unserer Arbeitsgruppe generiert und hinsichtlich eines Adipositas-Phänotyps publiziert (Lastres-Becker, Brodesser et al. 2008). In weiterführenden, bisher unveröffentlichten Oligonukleotid-*Microarray*-Transkriptom-Studien mit Gewebe von Cerebellum, Hirnstamm/Mittelhirn und Leber von drei und sechs Monate alten Mäusen wurden Unterschiede in der Expression von diversen Genen gefunden (Tab. 4), die im Hinblick auf die bereits bekannten Interaktoren von Interesse waren. Zur

Validierung der *Microarray*-Ergebnisse wurde die Expression der Gene mittels quantitativer *real-time* RT-PCR untersucht. Hierzu wurde das Taqman®System angewendet.

Die folgenden Gene waren im *Microarray* signifikant verändert und wurden in dieser Arbeit untersucht:

Gen	Symbol	Zusammenhang
Phosphatidylinositol-5-Phosphat-4-Kinase, Typ II beta	PIP5K2B	Zytoskelett, PIP ₂ Signalübertragung, Rezeptor-Internalisierung
Pallidin	PLDN1	starke Expression im Cerebellum, Intrazelluläre Membranfusion
Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1	Epb4.111	Membran-Plastizität, Spectrin-Aktin-Zytoskelett
Thymosin beta 10	TMSB10	Organisation des Zytoskeletts
Kaptin	KPTN1	Zytoskelett, Aktin-Dynamik
Kinesin family member 5 b	KIF5B	Motorprotein, bindet an Mikrotubuli, Vesikel- und Organell-Transport
Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 6	PCSK6	Intrazelluläres Chaperon im ER
Trans-Golgi-Network-Protein	TGOLN1	Regulation des Transports vom und zum Golgi-Apparat
SEC22 vesicle trafficking protein homolog B	SEC22B	Snare Komplex, Vesikel-Transport, ER-Golgi-Intermediär Kompartiment

Tabelle 4: Veränderte Expression von Zytoskelett-/Endozytose-Genen in der SCA2-Knock-Out-Maus

Die mit *Microarray-Chips* beobachteten Veränderungen ließen sich nicht mittels qrt-RT-PCR validieren. Zwar zeigten einzelne Gene signifikante Veränderungen, diese aber nur in einzelnen Geweben und nicht wie im *Microarray* konsistent in Cerebellum, Hirnstamm/Mittelhirn und Leber (Abb. 43).

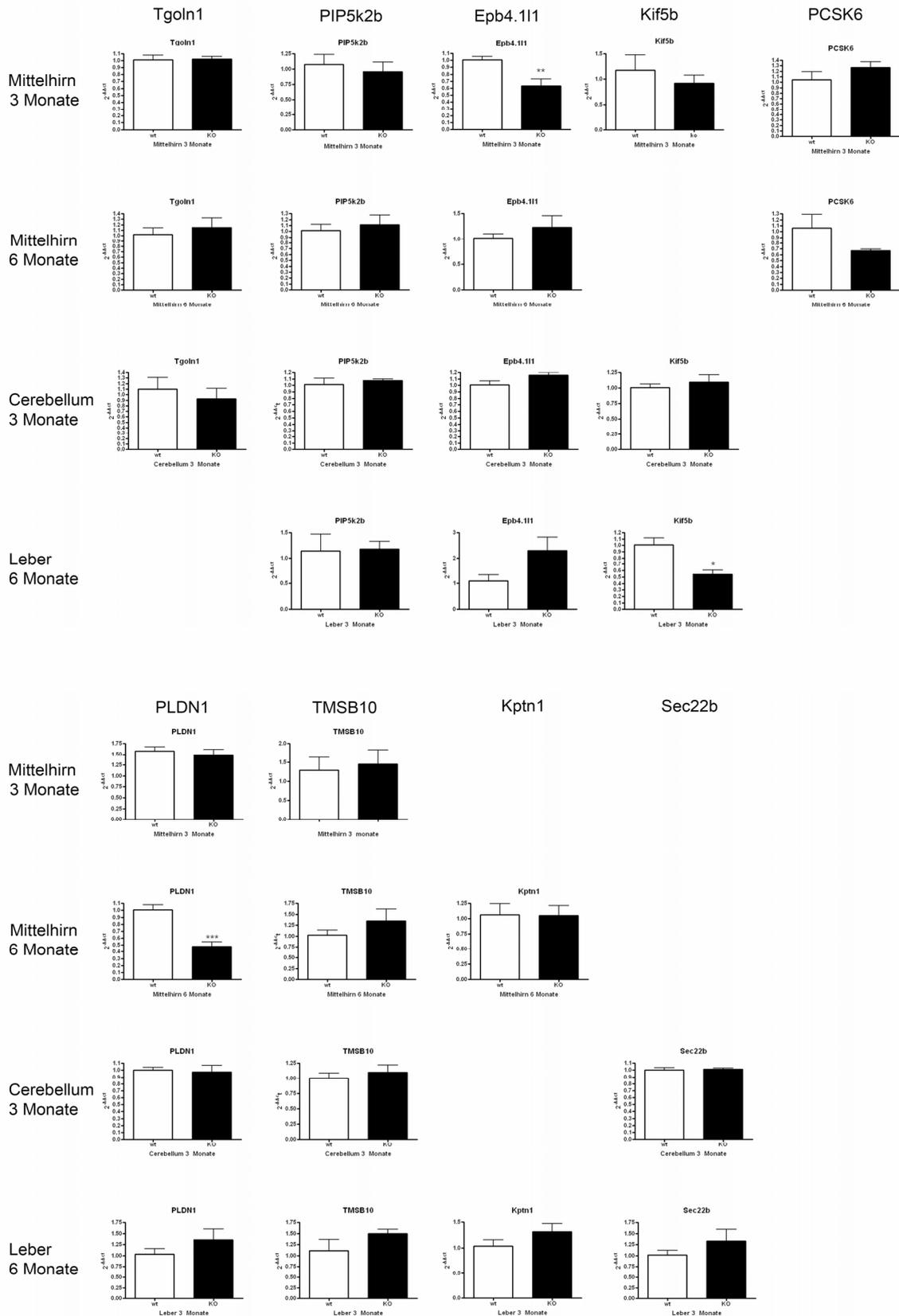


Abbildung 43: Validierung der Microarray-Daten der SCA2-Knock-out-Maus mittels qrt-RT-PCR. Dargestellt ist der Vergleich zwischen Wildtyp und SCA2-KO-Mäusen in Cerebellum, Mittelhirn und Leber. Zwar zeigten einige Transkripte signifikante Unterschiede in einzelnen Geweben, aber es konnte kein konsistenter Effekt wie im *Microarray* nachgewiesen werden.

6. Diskussion

Für Ataxin-2 ist bisher die physiologische Funktion nicht gesichert. Durch Untersuchungen der Hefe-, *C. elegans*- und *Drosophila melanogaster*- Orthologen von Ataxin-2 konnten zwar Hinweise auf Prozesse gefunden werden, an denen Ataxin-2 beteiligt ist, aber ein molekulares Verständnis der Interaktionen von Ataxin-2 im zellulären Netzwerk oder quantitative Messverfahren zur Funktion von Ataxin-2 fehlen bisher. Im Rahmen dieser Dissertations-Arbeit wurden putative Protein-Interaktoren von Ataxin-2 im Hinblick auf ihre subzelluläre Lokalisation, die Interaktionsdomänen, die physiologische Existenz des Interaktions-Komplexes in verschiedenen Geweben und die Rolle dieser Interaktionen für physiologische Prozesse charakterisiert. Dadurch hofften wir Rückschlüsse auf die Funktion von Ataxin-2 zu ziehen. Zudem wurde nach Veränderungen dieser Interaktionen gesucht, die durch die pathogene Polyglutamin-Expansion von Ataxin-2 ausgelöst werden, um ein molekulares Verständnis für die Mechanismen der neurodegenerativen Krankheit SCA2 zu entwickeln.

Das initiale Experiment, ein Hefe-2-Hybrid *Screen*, lieferte fünf mögliche Interaktoren von Ataxin-2, von denen zwei im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Angesichts der häufigen falsch-positiven Befunde von Hefe-2-Hybrid Experimenten wurden bei diesem *Screening* besonders stringente Maßstäbe angesetzt. Hervorzuheben ist hier der Einsatz von drei Reportergenen (HIS3, URA3 und LacZ) mit unabhängigen Promotoren und die Verwendung des URA3-Gens, das sowohl positive als auch negative Selektion ermöglicht. Interaktoren wurden nur dann in Betracht gezogen, wenn alle drei Reportergene konsistent eine Interaktion zeigten. Interessant ist auch, dass die Subfragmente 1 und 3 bei allen fünf Interaktoren eine Bindung zeigten, was ein Hinweis auf die dominierenden Protein-Protein-Interaktionsmotive in Ataxin-2 ist.

Allerdings ist ein Hefe-2-Hybrid Ergebnis alleine nicht aussagekräftig genug, so dass weitere unabhängige Experimente in anderen Systemen zur Validierung einer Interaktion notwendig sind.

Der erste untersuchte Interaktor, „*Similar to golgin-like*“ (SIM), ist ein bisher unbekanntes Gen. Im Hefe-2-Hybrid *Screen* zeigte sich eine mutationsabhängige Veränderung der Interaktion mit Ataxin-2. Dieser Befund, und die SIM-Homologie zur Golgin-Genfamilie machen dieses Protein angesichts der publizierten Golgi-Lokalisation von Ataxin-2 und der Störung der Golgi-Morphologie bei SCA2 (Huynh, Yang et al. 2003) besonders interessant. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Interaktion mit drei Konstrukten unterschiedlicher Expansionslänge, wobei die Variante mit 79 Glutaminen, repräsentativ für das Krankheitsprotein, eine stärkere Bindung als die beiden anderen Konstrukte mit 1 bzw.

22 Glutaminen zeigte. Dass die Bindung von Ataxin-2 mit nur einem Glutamin auch signifikant stärker ist als die des Konstruktes mit 22 Glutaminen, deutet auf eine Modulation der SIM - Ataxin-2 - Interaktion in Abhängigkeit von der Polyglutamindomäne hin.

Die Analyse der für die Interaktion verantwortlichen Subdomänen mittels weiterer Hefe-2-Hybrid Versuche zeigte, dass zwei Fragmente von Ataxin-2 mit SIM interagieren, der N-Terminus mit der Polyglutamindomäne und das Fragment mit der LSM-AD-Domäne. Die dazwischen liegende LSM-Domäne zeigte keine Aktivierung der Reportergene. Denkbar wäre, dass die LSM-AD-Domäne, da sie als allein stehendes Fragment interagiert, eine Polyglutamin-unabhängige Interaktion vermittelt und die Regulation der Interaktion durch den N-terminalen Bereich inklusive des Polyglutamintraktes erfolgt.

Ein Konstrukt, in dem jeweils eine der beiden Domänen aus dem Voll-Längen-Protein deletiert ist, um eventuell die Notwendigkeit beider Domänen für die Interaktion zu zeigen, wurde in dieser Arbeit nicht verwendet, da der entscheidende Punkt, nämlich die durch die Polyglutaminexpansion beeinflusste Interaktion, bereits gezeigt war.

Die Interaktionsdomäne auf SIM wurde auch mittels Hefe-2-Hybrid Experimenten untersucht. Hierfür wurden Deletionskonstrukte von SIM erstellt, bei denen ausgehend vom C-Terminus trunziert wurde. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine minimal notwendige Interaktionsschnittstelle von 26 Aminosäuren ableiten. Die Sequenz dieser Schnittstelle taucht nur auf SIM auf und lässt sich dadurch weder einem zellulären Prozess, noch einer Funktion oder Proteinfamilie zuordnen.

Da bei Bindungsnachweis mittels Hefe-2-Hybrid nicht notwendigerweise vom physiologischen Vorkommen einer solchen Interaktion in Säugergewebe ausgegangen werden kann, wurde als nächstes eine Kolo-kalisation von rekombinanten SIM- und Ataxin-2-Fusionskonstrukten in COS-7 Zellen untersucht. Hierbei wird ersichtlich, ob die Proteine innerhalb einer Zelle in denselben Kompartimenten und dort nahe genug aneinander für eine Interaktion lokalisieren.

SIM und Ataxin-2 kolokalisierten in COS-7 Zellen, allerdings zeigten beide Proteine keine prominente Lokalisation am Golgi-Apparat, sondern eine perinukleäre Verteilung, die weit in das Zytoplasma reichte. Die immunzytochemische Analyse mit subzellulären Markern zeigte eine Lokalisation von SIM am ER, und nicht am Golgi-Apparat. Dies galt aufgrund der starken Kolo-kalisation und der sichtbaren Verteilung auch für Ataxin-2. Weitere Untersuchungen zur Lokalisation von endogenem Ataxin-2 in HeLa-Zellen bestätigten diese Ergebnisse. Somit widersprechen diese Ergebnisse den publizierten Daten (Huynh, Yang et

al. 2003), die mit minimaler Transfektionsdosis von rekombinantem Ataxin-2-Fusionsprotein in konfokaler Mikroskopie und mit differentieller Fraktionierung von Hirn-Homogenaten erhoben worden waren.

Die intrazelluläre Nähe der beiden Proteine macht eine Interaktion möglich, aber eine mutationsbedingte Lokalisationsveränderung konnte nicht gezeigt werden. Allerdings kann die Kolo-kalisation nur qualitative Ergebnisse liefern und keinen Aufschluss über eine mögliche quantitative Modulation der Bindungsstärke und daraus resultierende Effekte.

Nachdem Hinweise für eine Interaktion durch das Hefe-2-Hybrid System und die immunzytochemischen Daten vorlagen, wurden biochemische Methoden eingesetzt, um die physiologische Existenz der Interaktion in Säugergewebe zu bestätigen. Zunächst wurde die physikalische Bindung der beiden Proteine in einem *GST-Pulldown* Experiment mit rekombinantem Protein gezeigt.

Als zweiter biochemischer Nachweis wurde eine Koimmunpräzipitation mit rekombinanten Fusionsproteinen in COS-7 Zellen durchgeführt, als Nachweis für die Assoziation der beiden Proteine in Säugergewebe *in vivo*. Ein Einfluss der Expansion von Ataxin-2 konnte mit dieser qualitativen Technik nicht detektiert werden.

Da die Interaktion von Ataxin-2 und SIM mit Hilfe von rekombinantem Protein mit mehreren Methoden gezeigt werden konnte, wurden in Kaninchen polyklonale Peptid-Antikörper gegen endogenes SIM hergestellt, um die Interaktion der nativen Proteine in Gehirnen von Mäusen zu untersuchen. Diese Antikörper wurden dann verwendet, um einerseits eine Koimmunpräzipitation von SIM und Ataxin-2 aus Mausgehirnen durchzuführen und andererseits die Expression des bisher weitgehend unbekanntes Proteins SIM zu charakterisieren.

Die Koimmunpräzipitation aus Mausgehirnen lieferte Evidenz, dass SIM-IR und Ataxin-2 im krankheitsrelevanten Gewebe als Proteinkomplex existieren. Ob die Mutation von Ataxin-2 einen Einfluss auf diese Interaktion hat, lässt sich bisher noch nicht abschließend klären, da Gehirn-Gewebe einer *SCA2 Knock-In*-Maus noch nicht verfügbar ist. Unter Umständen spiegelt die mutationsbedingt veränderte Bindungsstärke, die im Hefe-2-Hybrid-System beobachtet wurde, eine Veränderung der Interaktion wieder, die im komplexen Säugergewebe erst durch quantitative Funktions-Tests nachgewiesen werden kann.

Um allerdings diese Daten zu SIM-IR als glaubwürdig zu werten, muss der Größenunterschied zwischen der vorhergesagten Länge des rekombinanten SIM-Proteins (37 kDa) und der im Hirngewebe erkannten endogenen Bande (50 kDa) erklärt werden. Da

der generierte Peptid-Antikörper das rekombinante SIM ohne wesentliche Kreuzreaktionen erkennt und dieses Signal durch Präinkubation mit dem Peptid blockiert werden kann, sollte ein endogenes SIM spezifisch erkannt werden, sofern dieses aus *expressed sequence tags* vorhergesagte Protein physiologisch wirklich existiert. Natürlich bestehen die Möglichkeiten, dass verschiedene Isoformen von SIM vorkommen oder dass nicht alle Exone von der genomischen Sequenz korrekt vorhergesagt wurden bzw. der klonierte offene Leserahmen von SIM nicht für das komplette Protein kodiert, sondern nur für eine trunkierte Form. Eine Analyse mittels 5'-RACE zur Analyse des Transkriptes lieferte allerdings keine zusätzlichen 5'-Exone und keinen Aufschluss über den Größenunterschied. Und auch der deshalb anschließend verwendete Ansatz, SIM-IR mittels 2D-Gelen aus dem Mausgehirn zu isolieren und massenspektrometrisch zu analysieren, brachte keine Gewissheit. Obwohl die Isolierung von SIM-IR erfolgreich ausgeführt und dokumentiert wurde, konnte der Proteinspot aus dem 2D-Gel keiner Sequenz zugeordnet werden. Eine mögliche Erklärung für die Größe von etwa 50 kDa bietet die neueste Annotation des SIM-Locus (LOC440295) und des daraus berechneten Proteins (NP_937824). Hier wird für SIM eine Größe von 432 Aminosäuren und ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 49 kDa angegeben.

Zur weiteren, funktionellen Charakterisierung von SIM und seiner zellulären Rolle wurde in Betracht gezogen, dass SIM eine Homologie zu Golgin-67 aufweist und zwei Drittel des Proteins nach Berechnungen als *coiled-coil* Struktur vorliegen, ein Merkmal der Golgine (Barr and Short 2003; Short, Haas et al. 2005). Ein gut untersuchtes System zur Analyse von Golginen und ihren Funktionen ist die Analyse des VSV-G-Transports. Die Lokalisation am ER und nicht am Golgi-Apparat widerspricht diesem Ansatz nicht, da auch das ER in diesen Transport involviert ist. Für SIM konnte allerdings keine Beeinflussung des VSV-G-Transportes dokumentiert werden.

Zusammenfassend ist SIM ein interessanter potentieller Ataxin-2 Interaktor. Dass die Protein-Interaktion in Säugergewebe stattfinden kann und ein SIM-IR – Ataxin-2 Komplex im Gehirn physiologisch existiert, wurde von uns mit unterschiedlichen Methoden untersucht und dokumentiert.

Ob diese Interaktion allerdings moduliert wird von der pathogenen Expansion, nicht nur im Hefe-2-Hybrid System, sondern auch im krankheitsrelevanten humanen Gewebe, und ob sie eine relevante Rolle im Pathomechanismus der SCA2 Krankheit spielt, muss mit quantitativen funktionellen Tests in einem künftigen *knock-in* Mausmodell der SCA2 noch untersucht werden.

Der zweite, in dieser Dissertation bearbeitete Ataxin-2 Protein-Interaktor-Kandidat ist TRAP. Die für TRAP vorbekannten Interaktionen (Abb. 44) legen eine TRAP-Funktion als Adaptorprotein in einem größtenteils neuronalen Zusammenhang nahe.

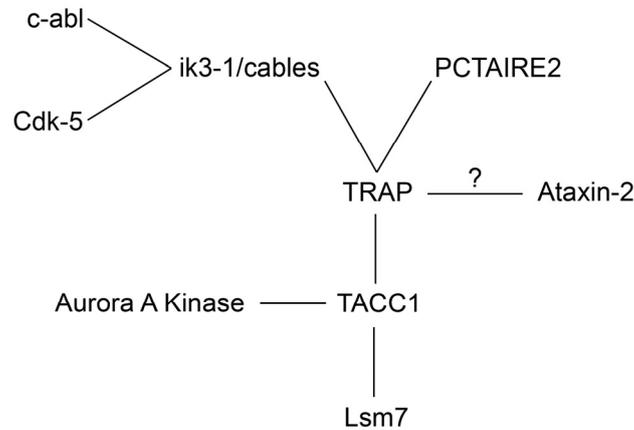


Abbildung 44: Schematische Darstellung des TRAP Interaktionsnetzwerks.

Von besonderem Interesse ist die Interaktion von TRAP mit PCTAIRE2. Die Kinase PCTAIRE2 ist in differenzierten Neuronen exprimiert (Hirose, Tamaru et al. 1997) und gehört zu einer Familie von bisher drei bekannten Proteinen. PCTAIRE-Kinasen beeinflussen den ATP-abhängigen sekretorischen Vesikeltransport vom ER weg, was durch eine Regulation des COPII Komplexes geschieht (Palmer, Konkell et al. 2005).

Indirekt ist TRAP auch mit Cdk5, einer Serin/Threonin-Kinase mit vielfältigen Funktionen, verbunden. Von besonderer Bedeutung ist Cdk-5 in der neuronalen Entwicklung, bei Neurodegenerationen und auch für die neuronale Plastizität (Angelo, Plattner et al. 2006; Cheung and Ip 2007; Hawasli, Benavides et al. 2007; Hawasli and Bibb 2007).

Weitere Publikationen zeigen TRAP im Zusammenhang mit der Keimbahn in männlichen Mäusen, eine Verbindung, die über die Tudor-Domänen vermittelt wird. TRAP ist Bestandteil des Nuage-Komplexes, auch *chromatoid body* genannt. In diesem Komplex, der mit einer Vielzahl von Vesikeln assoziiert ist, sich um den Golgi-Apparat herum bewegt und immer wieder mit diesem in Kontakt tritt, wird die RNA-Prozessierung kontrolliert und reguliert (Parvinen 2005; Kotaja and Sassone-Corsi 2007).

Eine weitere Verbindung zu RNA-assoziierten Proteinen kann durch den Komplex von TRAP mit TACC1 und Lsm7 angenommen werden (Conte, Delaval et al. 2003). TACC1 wird als Karzinogen mit Einfluss auf die RNA-Prozessierung diskutiert (Conte, Charafe-Jauffret et al. 2002) Lsm7 gehört zum *Decapping*-Komplex und scheint in diesem regulativ in den RNA-Abbau einzugreifen (Tharun, He et al. 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Bindung zwischen TRAP und Ataxin-2 im Hefe-2-Hybrid *Screen* gezeigt, die in ihrer Stärke nicht von der Länge des Polyglutamintraktes in Ataxin-2 beeinflusst wurde. Daraus kann gefolgert werden, dass die Subfragmente 1 und 3 aus dem initialen Hefe-2-Hybrid *Screen* zwar mehrere Interaktionen vermitteln, diese Bindungen aber unterschiedliche Charakteristika aufweisen können.

Da für TRAP bisher keine direkte Funktion gezeigt wurde, sondern eher eine Funktion als Adaptermolekül in Betracht gezogen wurde, könnte dies auch gegenüber Ataxin-2 gelten.

Als ersten Schritt zur Validierung der Hefe-2-Hybrid Ergebnisse wurde die Kolo-kalisation von TRAP und Ataxin-2 in COS-7 Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass TRAP und Ataxin-2 stark kolo-kalisieren. Erneut wurde hierbei keine prominente Golgi-Lokalisation sichtbar, sondern dieselbe ER-ähnliche zytoplasmatische Verteilung, die auch bei der Kolo-kalisation mit SIM beobachtet wurde. Für TRAP widerspricht dieser Befund den publizierten Daten, hier war eine mitochondriale Lokalisation in COS-7 Zellen für endogenes TRAP berichtet worden (Hirose, Kawabuchi et al. 2000). Eine Analyse der TRAP-Aminosäuresequenz mit iPSort (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>) konnte keine mitochondriale Lokalisationssequenz erkennen.

Um die Interaktion von endogenem TRAP mit Ataxin-2 weiter biochemisch zu analysieren, wurden polyklonale Peptid-Antikörper gegen TRAP generiert. Ein Antikörper konnte TRAP-IR spezifisch detektieren, erkannte diese allerdings nur in humanem Gewebe, nicht in murinem. TRAP-IR konnte in humanem Gehirn und Hoden nachgewiesen werden und zeigte ein Expressionsmuster, das dem bereits dokumentierten aus *rattus norvegicus* gleicht (Hirose, Kawabuchi et al. 2000).

Der Vergleich des publizierten Antikörpers mit dem von uns generierten zeigte, dass der von Hirose et al. publizierte Antikörper zwar das rekombinante humane Protein erkennt, aber nicht das humane endogene Protein. In Maus und Ratte wird ein Protein erkannt, das bei 160 kDa detektiert wird, etwa 30 kDa höher als vorhergesagt. Auf diesen Umstand wird von Hirose et al. zwar hingewiesen, aber keine Erklärung diskutiert. Der von uns generierte Antikörper erkennt eine Bande bei 130 kDa, der zu erwartenden Größe von TRAP.

Da der von uns generierte Antikörper nur in humanem Gewebe ein Signal erkannte und sich als ungeeignet für Immunpräzipitationen erwies, konnte ein endogener Ataxin-2 – TRAP - Komplex nicht nachgewiesen und ein möglicher Funktionszusammenhang nicht geklärt werden.

Der dritte, in dieser Dissertation bearbeitete Ataxin-2 Protein-Interaktor-Kandidat ist alpha-Actinin-1 (ACTN1). ACTN1 wurde im Rahmen eines Hefe-2-Hybrid *Screens* zur Analyse von

Protein-Netzwerken von hereditären Ataxie- und Purkinje-Zell-Degenerations-Proteinen als Interaktor von Ataxin-2 identifiziert (Lim, Hao et al. 2006).

Alpha-Actinin-1 gehört zu einer Familie von vier Genprodukten, die als Aktin-bündelnde Proteine entdeckt wurden. Alle vier Genprodukte sind etwa 100 kDa groß und aus vier strukturellen Domänen zusammengesetzt. Im N-terminalen Bereich liegt die Aktin-bindende Domäne (CH1/2, *Calponin homology 1/2*) gefolgt von vier Spektrin-*repeats* und einer C-terminalen Calmodulin-ähnlichen Domäne (CaM), die aus zwei EF-Hand Motiven gebildet wird und als Kalziumsensor funktionieren kann. Alpha-Actinin bildet ein antiparalleles Dimer das als Quervernetzer zur Stabilität und Elastizität des Aktinzytoskeletts beiträgt (Broderick and Winder 2002; Broderick and Winder 2005).

Alpha-Actinin hat außer Aktin zahlreiche weitere Bindungspartner die an mehreren wichtigen Funktionen in der Zelle beteiligt sind (siehe Tabelle 5). Hierzu zählen Zell-Zell- und Zell-Matrix- Verbindungen, die Organisation des Zytoskeletts, die Verankerung von Transmembranproteinen am Zytoskelett, die Regulation von Rezeptoren und die Verbindung des Zytoskeletts mit Signalwegen (Otey and Carpen 2004).

Binding partner	Category	Key reference
CLP36	Stress fiber	Bauer et al. [2000], Vallenius et al. [2000]
Palladin	Stress fiber	Parast and Otey [2000], Mykkänen et al. [2001]
	Focal adhesion	
Zyxin	Stress fiber	Crawford et al. [1992]
	Focal adhesion	
CRP	Focal adhesion	Pomies et al. [1997]
Vinculin	Focal adhesion	Belkin and Koteliansky [1987], Wachsstock et al. [1987]
β_1, β_3 integrins	Focal adhesion	Otey et al. [1990]
β_2 integrins	Lymphocyte targeting	Pavalko and LaRoche [1993]
ICAM-1	Lymphocyte targeting	Carpen et al. [1992]
ICAM-2	Lymphocyte targeting	Heiska et al. [1996]
L-selectin	Lymphocyte targeting	Pavalko et al. [1995]
Gplb-IX	Platelet adhesion	Feng et al. [2002]
ADIP	Adherens junction	Asada et al. [2003]
α -catenin	Adherens junction	Knudsen et al. [1995]
BP180	Hemidesmosome	Gonzalez et al. [2001]
MAGI-1	Tight junction	Patrie et al. [2002]
Syndecan 4	Cell-matrix adhesion	Greene et al. [2003]
ADAM12	Cell-cell adhesion	Cao et al. [2001]
NMDA receptor	Synapse	Wyszynski et al. [1997]
Densin	Synapse	Walikonis et al. [2001]
A2A receptor	Synapse	Burgueño et al. [2003]
Rabphilin 3A	Synapse	Kato et al. [1996]
E3KARP	Regulatory	Kim et al. [2002]
MEKK1	Regulatory	Christerson et al. [1999]
PIP3	Regulatory	Greenwood et al. [2000]
PIP2	Regulatory	Resendiz et al. [2004]
iNOS	Regulatory	Daniliuc et al. [2003]
PI 3-kinase	Regulatory	Shibasaki et al. [1994]
PKN	Regulatory	Mukai et al. [1997]
CaMKII	Regulatory	Walikonis et al. [2001]

Tabelle 5: Interaktionspartner von nicht-muskulärem alpha-Actinin (Otey and Carpen 2004).

Alpha-Actinin-1 erschien als vielversprechender Interaktor im Bezug auf den bereits dokumentierten indirekten Aktin-Phänotyp in der Fliege (Satterfield, Jackson et al. 2002) und die Interaktion von Ataxin-2 und Huntingtin mit Plastin (Ralser, Nonhoff et al. 2005), einem Aktin-bündelnden Protein.

Die Ataxin-2–ACTN1-Interaktion wurde von Lim et al. im Hefe-2-Hybrid System ohne weitere Validierung gezeigt. Wir konnten die physiologische Existenz dieses Proteinkomplexes in Mäusehirnen mittels Koimmunpräzipitation der endogenen Proteine nachweisen, unterstützt durch Koimmunpräzipitationen mit rekombinanten Proteinen, Kolo-kalisation und GST-*Pull-downs*. Alle Befunde aus diesen Experimenten liefern Evidenz für eine Interaktion zwischen alpha-Actinin-1 und Ataxin-2.

Bei der Charakterisierung der Interaktion wurde auch die Subdomäne, welche die Interaktion vermittelt, identifiziert. Diese Domäne auf alpha-Actinin-1 ist die Aktin-bindende Domäne, die CH1/2 (*calponin homology*) Domäne. Diese Domäne vermittelt die Kalzium-abhängige Bindung von alpha-Actininen an Aktin in nicht-Muskelzellen (Otto 1994) und die funktionell daran geknüpfte Bildung von Aktinbündeln und Stressfasern (Edlund, Lotano et al. 2001). Zusätzlich zur Aktin-Bindung dienen CH-Domänen auch als Adaptoren für weitere Protein-Protein Verbindungen (Stradal, Kranewitter et al. 1998). Auch T- und L-Plastin (Abb. 45), die mit Ataxin-2 nach Hefe-Befunden interagieren, besitzen eine Aktin-bindende CH-Domäne. Allerdings ist diese Interaktion nicht auf der Ebene von Subdomänen charakterisiert worden (Ralser, Nonhoff et al. 2005).

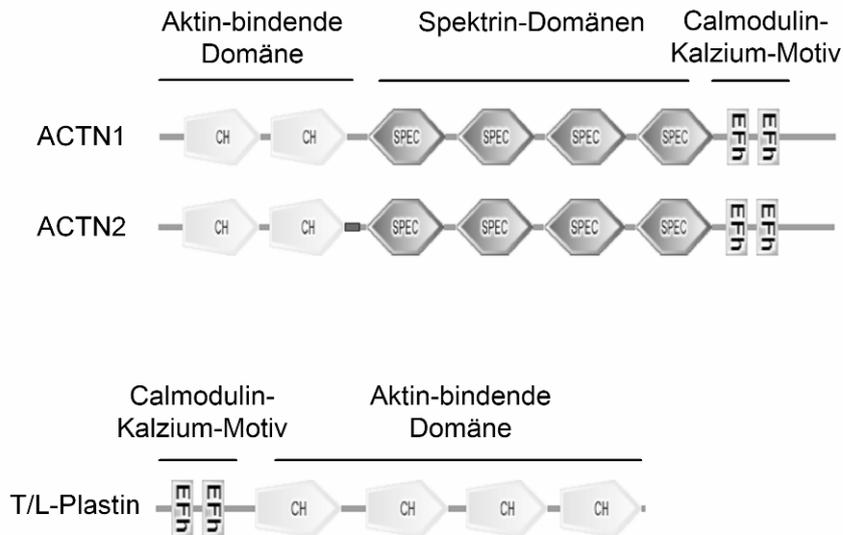


Abbildung 45: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von alpha-Actininen und Plastinen.

In Anlehnung an die Arbeit von Edlund et al. wurde dann die Bildung von Stressfasern in SCA2-Patienten- und Kontroll-Fibroblasten untersucht. Hierbei konnte kein Effekt beobachtet werden. Sowohl Kontroll- als auch Patienten-Zellen zeigten ein klares Stressfasermuster unter normalen und durch Serumentzug bedingten Stressbedingungen.

Da die Bildung der Stressfasern unverändert erschien, wurde die Dynamik von alpha-Actinin-1 in den Fibroblasten untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit alpha-Actinin-1-GFP transfiziert und die Dynamik mittels FRAP analysiert. Hierbei zeigte sich eine hohe Varianz zwischen den unterschiedlichen Zelllinien. Weder beim Verhältnis von stationärer zu mobiler Phase noch bei der Dynamik von alpha-Actinin-1 konnte ein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen gezeigt werden. Zusammengefasst konnte in den Fibroblasten der Patienten und Kontrollen mit den verwendeten Methoden kein Hinweis gefunden werden, der auf eine Veränderung der Stressfasern oder der Dynamik von alpha-Actinin-1 am Zytoskelett hindeutet.

Zusätzlich zu ihrer Funktion als Aktin-bündelndes Protein und als Stressfaser-Regulator erfüllen alpha-Actinine innerhalb der Zelle noch weitere Aufgaben. Sie spielen eine Rolle bei der Internalisierung verschiedener Rezeptoren und bei der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion (Otey and Carpen 2004). Auch Ataxin-2 scheint Einfluss auf Rezeptor-Internalisierung zu haben – laut unveröffentlichten Befunden unserer Arbeitsgruppe wird die Internalisierung des EGF-Rezeptors durch Ataxin-2 beeinflusst; zudem besteht eine Verbindung zum Endozytosekomplex durch die Verbindung von Ataxin-2 mit Endophilin A1/A3 (Nonis et al. eingereicht; Ralser, Nonhoff et al. 2005). Im Nervensystem sind direkte Interaktionen von alpha-Actininen mit dem NMDA-, dem AMPA und dem Adenosin A2A-

Rezeptor bereits dokumentiert (Wyszynski, Lin et al. 1997; Wyszynski, Kharazia et al. 1998; Fraley, Pereira et al. 2005; Nuriya, Oh et al. 2005; Cabello, Remelli et al. 2007; Merrill, Malik et al. 2007; Michailidis, Helton et al. 2007). Eine direkte Verbindung von alpha-Actinin zum EGF-Rezeptor konnte in *Drosophila* gezeigt werden (Wahlstrom, Norokorpi et al. 2006).

Da in den Untersuchungen zur alpha-Actinin-1-Dynamik keine Veränderungen sichtbar waren und das Aktin-Zytoskelett in den Patienten-Zellen unverändert erschien, wurden Experimente zur Untersuchung der Signaltransduktion und Rezeptor-Internalisierung nach EGF-Stimulation in Anlehnung an die Arbeit von Fallon et al. durchgeführt. Es wurde untersucht, ob die Überexpression von rekombinantem alpha-Actinin-1 die Phosphorylierung von ERK1/2 beeinflusst und ob ein sichtbarer Effekt bei der Internalisierung von markiertem EGF auftritt. Beide Experimente zeigten keine Effekte. Die Internalisierung von EGF lief identisch zu untransfizierten Zellen ab und die Phosphorylierung von ERK1/2 zeigte keine Unterschiede.

Weil mit Überexpression von rekombinantem alpha-Actinin-1 kein Einfluss auf Rezeptor-Internalisierung und –Signalwege gezeigt werden konnte, wurde alternativ die Aktivierung von ERK1/2 in Fibroblasten von SCA2-Patienten und Kontrollen betrachtet, um einen Einfluss von expandiertem Ataxin-2 auf die Endozytose-abhängige Signaltransduktion zu untersuchen, nachdem die Internalisierung des Rezeptors durch Ataxin-2 beeinflusst wird. ERK1/2 wurde zur Untersuchung ausgewählt, weil an diesem Punkt der EGF-Signaltransduktion eine Weiterleitung des Signals sowohl auf zytosolische Substrate als auch auf die Transkription im Nukleus möglich ist. Trotz der vorbekannten, signifikanten Verlangsamung der Rezeptor-Internalisierung bei Überexpression von Ataxin-2 und einer schnelleren Internalisierung in SCA2-Knock-Out-Zellen bleibt die Aktivierung von ERK1/2 bei Ataxin-2 Expansion in Patientenzellen anscheinend unverändert. Dies kann mehrere Gründe haben: einerseits kann der Effekt in den Patientenzellen zu gering sein, andererseits wäre auch denkbar, dass ein Effekt bereits in vorgeschalteten Schritten kompensiert worden ist.

Um in diese Richtung weitere Untersuchungen durchzuführen, wurden MEFs der SCA2-*knock-out*-Mäuse verwendet, da hier im Vergleich zu den Patienten ein größerer Effekt zu erwarten war. Diese Zellen wurden mit EGF stimuliert und dann das Signal vor der Aktivierung von ERK1/2, die Phosphorylierung und Aktivierung von MEK1, untersucht.

Hierbei konnte eine verminderte, aber nicht signifikante Veränderung der MEK1-Aktivierung nach 2, 5 und 10 Minuten beobachtet werden. Ein Problem bei diesem Experiment ist die bisher niedrige statistische *Power*. Nur 2 eindeutig charakterisierte MEF-Linien stehen derzeit zur Verfügung, wegen der Infertilität der SCA2-KO Mäuse. Der mögliche Einfluss des

Ataxin-2-knock-out auf MEK1 verdient sicher eine sorgfältige weitergehende Analyse in einer größeren Anzahl von MEFs und in primären Neuronenkulturen.

Zeitgleich mit den Experimenten zur Rezeptor-Internalisierung wurde die Bindung von alpha-Actinin-1 an weitere Partner des Endozytosekomplexes untersucht. Da alpha-Actinin-1 auf Grund seiner Struktur mit CH- und Spektrin-Domänen als Adaptorprotein in Frage kommt (Stradal, Kranewitter et al. 1998; Djinovic-Carugo, Gautel et al. 2002; Gimona, Djinovic-Carugo et al. 2002; Otey and Carpen 2004; Galkin, Orlova et al. 2006), sollte untersucht werden, ob CIN-85 und c-Cbl - die beide an Ataxin-2 binden (Nonis et al, eingereicht) - auch einen Komplex mit alpha-Actinin-1 bilden. Für CIN-85 und auch c-cbl konnte eine Bindung an das Voll-Längen-Konstrukt von alpha-Actinin-1 gezeigt werden, allerdings konnte keine der Subdomänen CIN-85 und c-Cbl binden. Dies stellt das Ergebnis an sich in Frage, möglicherweise ist aber auch eine Kombination der Domänen nötig, die nicht durch die Fusionskonstrukte abgedeckt wird.

Abschließend wurden ausgesuchte Veränderungen im Transkriptom der *SCA2-knock-out*-Maus validiert. Dabei waren Mittelhirn, Kleinhirn und Leber von 3 und 6 Monate alten *SCA2-knock-out* und Wildtyp-Mäusen verglichen worden. Um die hierbei erhaltenen Daten zu validieren, wurde versucht Veränderungen mittels qrt-RT-PCR zu bestätigen. Die veränderten Genexpressionen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, hatten alle Relevanz für das Zytoskelett oder die Rezeptor-Endozytose und somit einen Bezug zu in dieser Arbeit untersuchten Interaktoren und hätten im Idealfall auf eine funktionelle Bedeutung hingewiesen. Leider ließ sich keiner der Kandidaten konsistent validieren.

Ein weiterer offener Punkt, die Lokalisation von Ataxin-2 am ER statt am Golgi-Apparat, wurde durch weitergehende immunzytochemische Analysen von Ataxin-2 mit zwei ER und Golgi-Markern bestätigt. Parallele Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe bestätigten eine Assoziation von Ataxin-2 mit Polyribosomen (van de Loo et al, in Begutachtung), wie bereits in *Drosophila* beobachtet worden war (Satterfield and Pallanck 2006; Lastres-Becker, Brodesser et al. 2008). Die eindeutige Kolokalisation mit beiden ER-Markern statt den Golgi-Markern unterstützen diese Ergebnisse und führen dazu, dass die publizierte Golgi-Lokalisation von Ataxin-2 (Huynh, Yang et al. 2003) in Frage gestellt werden können.

Zusammengenommen konnte morphologische und biochemische Evidenz in Säugergewebe für drei Interaktionen von Ataxin-2 gewonnen werden, die mit Hefe-2-Hybrid-Screens gefunden wurden. Für SIM konnte eine Interaktion mit rekombinanter und endogener Koimmunpräzipitation, GST-Pulldown und Kolokalisation gezeigt werden. Für TRAP konnte

eine Kolokalisation gezeigt werden. Die Interaktion mit alpha-Actinin-1 konnte durch Kolokalisation, *GST-Pulldown*, rekombinante und endogene Koimmunpräzipitation belegt werden. Die physiologische Rolle der Proteinkomplexe konnte nicht ermittelt werden, da ein geeigneter dynamischer Funktionstest derzeit nicht existiert.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden potentielle Mitglieder des Proteinnetzwerks um Ataxin-2 untersucht, um Rückschlüsse auf die bisher unbekannt Funktion von Ataxin-2 machen zu können. Ataxin-2 ist das Krankheitsprotein der Spinozerebellären Ataxie Typ 2, einer Polyglutaminerkrankung, bei der die Expansion eines Polyglutamintraktes zur Degeneration von Purkinje-Neuronen führt. Da die Funktion von Ataxin-2 bisher nicht ermittelt werden konnte, sollte die Charakterisierung seiner Protein-Interaktoren es ermöglichen, Einblicke in seine Funktion zu gewinnen.

Dazu wurden die drei Kandidaten „*Similar to golgin-like*“, TRAP und alpha-Actinin-1 untersucht, die alle drei mit Hilfe von Hefe-2-Hybrid *Screens* identifiziert worden waren. Im Fall von „*Similar to golgin-like*“, einem aus Genom und cDNA-Fragmenten hervorgesagten Protein unbewiesener Existenz, konnte eine mutationsabhängige Modulation der Bindungsstärke an Ataxin-2 im Hefe-2-Hybrid-System gezeigt werden, die sich allerdings mit rekombinanten Proteinen in Koimmunpräzipitationen in Säuger-Zellen nicht reproduzieren ließ. Beide Proteine kolokalisierten am ER, unabhängig von der Länge des pathogenen Polyglutamintraktes-2 in Ataxin. Gegen ein SIM-Peptid hergestellte Antikörper zeigten eine exklusive Expression im menschlichen Gehirn und wurden erfolgreich zum Nachweis eines endogenen Komplexes aus Ataxin-2 und SIM-IR im krankheitsrelevanten Gewebe eingesetzt. Allerdings war es nicht möglich, mittels 5'-RACE und 2D-Gel Massenspektrometrie die potentiellen Isoformen von SIM näher zu charakterisieren. Zur funktionellen Analyse von SIM wurden intrazelluläre Transportvorgänge am Golgi-Apparat untersucht, aber ein Einfluss von SIM / Ataxin-2 ließ sich nicht belegen.

Im Fall des Interaktions-Kandidaten TRAP wurden Antikörper hergestellt und mit einem bereits publizierten polyklonalen Antikörper, der TRAP in *rattus norvegicus* erkennt, verglichen. Die Expressionsmuster zeigten eine identische Expression im Hirn und der Testis. Eine Kolokalisations-Studie wies sowohl TRAP als auch Ataxin-2 am ER nach. Allerdings erwiesen sich alle verwendeten Antikörper als ungeeignet für Immunpräzipitationen, so dass die physiologische Existenz des endogenen TRAP-Ataxin-2 Komplexes nicht bewiesen werden kann.

Im Fall des Interaktor-Kandidaten alpha-Actinin-1 ließ sich die Interaktion mit Ataxin-2 sowohl für die endogenen Proteine in der zytosolischen Fraktion von Mausgehirnen als auch für die rekombinanten Proteine in Säuger-Zellen belegen. Beide Proteine konnten im Zytosol und zu kleineren Anteilen an der Plasmamembran kolokalisiert werden. Als verantwortliche Subdomänen im Fall von Ataxin-2 wurde der N-terminale Bereich des Proteins in der Nähe der pathogenen Expansion, im Fall von alpha-Actinin-1 die Aktin-bindende Domäne durch GST-*pulldown* Analysen identifiziert. Darauf aufbauend wurde in Patienten-Fibroblasten das Aktinzytoskelett und die Dynamik von alpha-Actinin-1 in Anwesenheit der Ataxin-2-Polyglutamin-Expansion untersucht, wobei allerdings kein Unterschied zu erkennen war.

Anschließend an die Analyse des Zytoskeletts wurde ein möglicher Einfluss von Ataxin-2 und seiner Polyglutamin-Expansion auf die EGF-Rezeptorinternalisierung studiert, da eine Rolle von Ataxin-2 auf die Endozytose in parallelen Analysen der Arbeitsgruppe wahrscheinlich wurde. Hierzu wurden Säuger-Zellen mit alpha-Actinin-1 transfiziert und die Internalisierung mikroskopisch und mittels Analyse der ERK1/2 Aktivierung verfolgt. Ergänzt wurden die Experimente durch Analysen zur ERK1/2 Aktivierung in Patienten- und Kontroll-Fibroblasten. Entgegen den Erwartungen hatte die Überexpression von alpha-Actinin-1 keinen Einfluss auf die Internalisierung, und bei keinem der Ansätze zeigte sich eine signifikante Veränderung der ERK1/2 Aktivierung. Auch Transkriptombefunde aus SCA2-KO Gewebe, nach denen einzelne Gene des Zytoskeletts oder der Rezeptor-Endozytose ihre Expression ändern, ließen sich nicht mit Konsistenz validieren.

Abschließend wurden Experimente zur subzellulären Lokalisation von Ataxin-2 durchgeführt, die eine Lokalisation am ER und nicht wie bisher berichtet am Golgi-Apparat sicherten und Ergebnisse zur Assoziation mit Polyribosomen bekräftigten.

Obwohl somit bei allen drei Proteininteraktor-Kandidaten glaubwürdige Befunde für eine Ataxin-2 Bindung sprechen, ist derzeit eine funktionelle Analyse der Assoziationen nicht möglich und eine klare Definition der physiologischen Rolle von Ataxin-2 lässt sich aus diesen Daten nicht ableiten, wenn auch die prominente Lokalisation von Ataxin-2 am rauen endoplasmatischen Retikulum mit einem Einfluss von Ataxin-2 auf die ribosomale Translation und die Sekretion in Cisternen kompatibel ist.

8. Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnten zwar Ataxin-2 Protein-Interaktoren charakterisiert und die Interaktionen validiert werden, allerdings konnte kein eindeutiger Rückschluss auf eine Funktion von Ataxin-2 gemacht werden. Nachdem die Analysen des VSV-G-Transports unter SIM / Ataxin-2 Modulation keine Veränderung am Golgi-Apparat zeigten und auch die Analysen von alpha-Actinin-1 und Ataxin-2 die physiologische Rolle in Bezug auf Stressfasern und das Zytoskelett nicht näher definieren konnten, muss über alternative

Methoden zur Funktionsanalyse nachgedacht werden. Zwar kann die Identifikation von Protein-Interaktoren mittels Hefe-2-Hybrid-Technik den intrazellulären Zusammenhang löslicher Proteine darstellen; dass aber diese Technik Membran-assoziierte Proteine nicht analysiert, und auch für RNA-Protein-Interaktionen nicht hilfreich ist, muss angesichts der Assoziation von Ataxin-2 mit Ribosomen und der ER-Membran als schwerwiegende Limitierung unserer bisherigen Strategie erscheinen. Die Ergebnisse aus präliminären Transkriptomanalysen der *SCA2-knock-out*-Maus deuten ebenfalls auf eine Funktion im Zusammenhang mit der Translations-Modulation hin, und erscheinen im Vergleich als sehr erfolgversprechender Ansatz. Die bei diesen Analysen gefundenen Veränderungen mit Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Interaktoren ließen sich zwar nicht bestätigen, dennoch zeigten sich andere Transkriptom-Daten zu RNA-Metabolismus-assoziierten Veränderungen als robuster und konnten validiert werden. Da diese Daten auch durch Ergebnisse dieser Arbeit - die Lokalisation am ER - gestützt werden, erscheinen weitere Bemühungen in diese Richtung sinnvoll.

Die Frage, ob Ataxin-2 direkt mit RNA interagiert und welche RNA in diesem Falle gebunden sein sollte, kann durch Hefe-3-Hybrid-Experimente und die CLIP-Methode (*cross linking and immunoprecipitation*, CLIP) beantwortet werden. Ein putativer Einfluss von Ataxin-2 auf die Translation und Degradation von RNA sollte prioritär untersucht werden und wenn möglich in den verfügbaren Zelllinien und Gewebe von *SCA2 knock-out* sowie *knock-in* Mäusen validiert werden.

Dennoch sollten die gefundenen Interaktoren bei den weiteren Analysen nicht völlig außer Acht gelassen werden, insbesondere im Hinblick auf in naher Zukunft verfügbares Hirngewebe der *SCA2-knock-in*-Maus.

Ein ergänzendes Experiment zu dieser Arbeit könnte die Analyse der Integrität des Zytoskeletts mit immunzytochemischen Methoden nach EGF-Stimulation in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) sein. Hierzu müssten die unterschiedlichen Elemente des Zytoskeletts, also Aktinfilamente, Tubulin und Intermediärfilamente auf ihre Struktur untersucht werden. Ein weiterer Punkt ist die Signaltransduktion über PIP₂. Da alpha-Actinin-2 bei der PIP₂-abhängigen Regulation des NMDA-Rezeptors involviert ist, wären auch Untersuchungen in diese Richtung denkbar.

9. Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	
A2BP1	<i>Ataxin-2 binding protein 1</i>
ACTN1	Alpha-Actinin-1
ACTN2	Alpha-Actinin-2
AD	Aktivator-Domäne
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazol-propionsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATXN2	Ataxin-2
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Catx2	<i>Caenorhabditis elegans</i> Ataxin-2 Ortholog
Cbl	<i>casitas B-lineage lymphoma</i>
CCD	<i>Coupled charge device</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIN-85	<i>Cbl-interacting protein of 85 kDa</i>
DBD	DNA-Binde-Domäne
DDX6	<i>DEAD/H-box RNA helicase 6</i>
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DRPLA	Dentatorubrale Pallidoluysische Atrophie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER/Golgi intermediate compartment</i>
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-

GFP	Dehydrogenase
GSH	<i>Green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion
HD	Glutathion-S-Transferase
HRP	<i>Huntington's disease</i>
IPTG	<i>horse radish peroxidase</i>
KO	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LacZ	<i>knock out</i>
LSm	Gen der beta-Galaktosidase
LSm-AD	<i>like Sm</i>
MEF	<i>like Sm associated domain</i>
MJD	<i>Mouse embryonal fibroblast</i>
mRNA	<i>Machado Joseph Disease</i>
NMDA	<i>messenger RNA</i>
OD	N-Methyl-D-Aspartat
ONPG	optische Dichte
ORF	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PABP	<i>open reading frame</i>
PAGE	<i>Poly A binding protein</i>
Pbp1	<i>Polyacrylamid gelectrophoresis</i>
PBS	<i>Saccharomyces cerevisiae Ataxin-2 Ortholog</i>
PCR	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Polyethylenglykol
PIP ₂	Paraformaldehyd
PVDF	Phosphatidylinositolbisphosphat
qrt-RT-PCR	Polyvinylidifluorid
RNA	<i>quantitative real-time RT-PCR</i>
RT-PCR	Ribonukleinsäure
SBMA	Reverse Transkriptase PCR
SCA	Spinale und Bulbäre Muskuläre Atrophie
SDS	Spinocerebelläre Ataxie
SIM	Sodiumdodecylsulfat
SIM-IR	<i>Similar to golgin-like</i>
siRNA	SIM-Immunreaktivität
SNTB1	<i>small interfering RNA</i>
	Syntrophin beta 1

Src	<i>sarcoma viral oncogene homologue</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	<i>Tata-box binding protein</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRAP	<i>Tudor repeat associator of PCTAIRE2</i>
VSV-G	<i>Vesicular stomatitic virus glycoprotein</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YAPD	<i>Yeast Extract - Peptone – Dextrose plus Adenine</i>
β -Gal	beta-Galaktosidase

10. Literaturverzeichnis

- Adams, A. E., D. Botstein, et al. (1991). "Requirement of yeast fimbrin for actin organization and morphogenesis in vivo." Nature **354**(6352): 404-8.
- Albrecht, M. and T. Lengauer (2004). "Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases." FEBS Lett **569**(1-3): 18-26.
- Angelo, M., F. Plattner, et al. (2006). "Cyclin-dependent kinase 5 in synaptic plasticity, learning and memory." J Neurochem **99**(2): 353-70.
- Araki, K., H. Meguro, et al. (1993). "Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells." Biochem Biophys Res Commun **197**(3): 1267-76.
- Asai, A., Y. Miyagi, et al. (1994). "Negative effects of wild-type p53 and s-Myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy." J Neurooncol **19**(3): 259-68.
- Barr, F. A. and B. Short (2003). "Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus." Curr Opin Cell Biol **15**(4): 405-13.
- Beggs, J. D. (2005). "Lsm proteins and RNA processing." Biochem Soc Trans **33**(Pt 3): 433-8.
- Bemelmans, A. P., P. Horellou, et al. (1999). "Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer." Hum Gene Ther **10**(18): 2987-97.
- Biedler, J. L., L. Helson, et al. (1973). "Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture." Cancer Res **33**(11): 2643-52.
- Biedler, J. L., S. Roffler-Tarlov, et al. (1978). "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones." Cancer Res **38**(11 Pt 1): 3751-7.
- Block-Galarza, J., K. O. Chase, et al. (1997). "Fast transport and retrograde movement of huntingtin and HAP 1 in axons." Neuroreport **8**(9-10): 2247-51.
- Broderick, M. J. and S. J. Winder (2002). "Towards a complete atomic structure of spectrin family proteins." J Struct Biol **137**(1-2): 184-93.
- Broderick, M. J. and S. J. Winder (2005). "Spectrin, alpha-actinin, and dystrophin." Adv Protein Chem **70**: 203-46.
- Butler, R. and G. P. Bates (2006). "Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders." Nat Rev Neurosci **7**(10): 784-96.
- Cabello, N., R. Remelli, et al. (2007). "Actin-binding protein alpha-actinin-1 interacts with the metabotropic glutamate receptor type 5b and modulates the cell surface expression and function of the receptor." J Biol Chem **282**(16): 12143-53.
- Cattaneo, E., D. Rigamonti, et al. (2002). "The enigma of Huntington's disease." Sci Am **287**(6): 92-7.
- Cestra, G., L. Castagnoli, et al. (1999). "The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity." J Biol Chem **274**(45): 32001-7.
- Chen, S., G. H. Peng, et al. (2004). "Interference of Crx-dependent transcription by ataxin-7 involves interaction between the glutamine regions and requires the ataxin-7 carboxy-terminal region for nuclear localization." Hum Mol Genet **13**(1): 53-67.
- Cheung, Z. H. and N. Y. Ip (2007). "The roles of cyclin-dependent kinase 5 in dendrite and synapse development." Biotechnol J **2**(8): 949-57.
- Choudhry, S., M. Mukerji, et al. (2001). "CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms." Hum Mol Genet **10**(21): 2437-46.
- Ciosk, R., M. DePalma, et al. (2004). "ATX-2, the C. elegans ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline." Development **131**(19): 4831-41.
- Coller, J. M., M. Tucker, et al. (2001). "The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes." Rna **7**(12): 1717-27.

- Conte, N., E. Charafe-Jauffret, et al. (2002). "Carcinogenesis and translational controls: TACC1 is down-regulated in human cancers and associates with mRNA regulators." Oncogene **21**(36): 5619-30.
- Conte, N., B. Delaval, et al. (2003). "TACC1-chTOG-Aurora A protein complex in breast cancer." Oncogene **22**(50): 8102-16.
- Cummings, C. J. and H. Y. Zoghbi (2000). "Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology." Annu Rev Genomics Hum Genet **1**: 281-328.
- De Rooij, K. E., J. C. Dorsman, et al. (1996). "Subcellular localization of the Huntington's disease gene product in cell lines by immunofluorescence and biochemical subcellular fractionation." Hum Mol Genet **5**(8): 1093-9.
- DiFiglia, M., E. Sapp, et al. (1995). "Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons." Neuron **14**(5): 1075-81.
- Djinovic-Carugo, K., M. Gautel, et al. (2002). "The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies." FEBS Lett **513**(1): 119-23.
- Edlund, M., M. A. Lotano, et al. (2001). "Dynamics of alpha-actinin in focal adhesions and stress fibers visualized with alpha-actinin-green fluorescent protein." Cell Motil Cytoskeleton **48**(3): 190-200.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, et al. (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 9-22.
- Fallon, L., C. M. Belanger, et al. (2006). "A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling." Nat Cell Biol **8**(8): 834-42.
- Fischer, N. and K. Weis (2002). "The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1." Embo J **21**(11): 2788-97.
- Fraley, T. S., C. B. Pereira, et al. (2005). "Phosphoinositide binding regulates alpha-actinin dynamics: mechanism for modulating cytoskeletal remodeling." J Biol Chem **280**(15): 15479-82.
- Galkin, V. E., A. Orlova, et al. (2006). "The CH-domain of calponin does not determine the modes of calponin binding to F-actin." J Mol Biol **359**(2): 478-85.
- Gallop, J. L., C. C. Jao, et al. (2006). "Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature." Embo J **25**(12): 2898-910.
- Giachino, C., E. Lantelme, et al. (1997). "A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system." Genomics **41**(3): 427-34.
- Gimona, M., K. Djinovic-Carugo, et al. (2002). "Functional plasticity of CH domains." FEBS Lett **513**(1): 98-106.
- Giunti, P., G. Sabbadini, et al. (1998). "The role of the SCA2 trinucleotide repeat expansion in 89 autosomal dominant cerebellar ataxia families. Frequency, clinical and genetic correlates." Brain **121** (Pt 3): 459-67.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell **23**(1): 175-82.
- Gunawardena, S. and L. S. Goldstein (2005). "Polyglutamine diseases and transport problems: deadly traffic jams on neuronal highways." Arch Neurol **62**(1): 46-51.
- Gunawardena, S., L. S. Her, et al. (2003). "Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in Drosophila." Neuron **40**(1): 25-40.
- Gwinn-Hardy, K., J. Y. Chen, et al. (2000). "Spinocerebellar ataxia type 2 with parkinsonism in ethnic Chinese." Neurology **55**(6): 800-5.
- Hawasli, A. H., D. R. Benavides, et al. (2007). "Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation." Nat Neurosci **10**(7): 880-6.
- Hawasli, A. H. and J. A. Bibb (2007). "Alternative roles for Cdk5 in learning and synaptic plasticity." Biotechnol J **2**(8): 941-8.
- He, W. and R. Parker (2000). "Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing." Curr Opin Cell Biol **12**(3): 346-50.
- Hebbes, T. R., A. W. Thorne, et al. (1988). "A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin." Embo J **7**(5): 1395-402.

- Helmlinger, D., S. Hardy, et al. (2004). "Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes." Hum Mol Genet **13**(12): 1257-65.
- Hirano, T. (2006). "Cerebellar regulation mechanisms learned from studies on GluRdelta2." Mol Neurobiol **33**(1): 1-16.
- Hirose, T., M. Kawabuchi, et al. (2000). "Identification of tudor repeat associator with PCTAIRE 2 (Trap). A novel protein that interacts with the N-terminal domain of PCTAIRE 2 in rat brain." Eur J Biochem **267**(7): 2113-21.
- Hirose, T., T. Tamaru, et al. (1997). "PCTAIRE 2, a Cdc2-related serine/threonine kinase, is predominantly expressed in terminally differentiated neurons." Eur J Biochem **249**(2): 481-8.
- Hosokawa, M., M. Shoji, et al. (2007). "Tudor-related proteins TDRD1/MTR-1, TDRD6 and TDRD7/TRAP: domain composition, intracellular localization, and function in male germ cells in mice." Dev Biol **301**(1): 38-52.
- Huynh, D. P., M. R. Del Bigio, et al. (1999). "Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2." Ann Neurol **45**(2): 232-41.
- Huynh, D. P., K. Figueroa, et al. (2000). "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, D. P., D. T. Nguyen, et al. (2007). "Parkin is an E3 ubiquitin-ligase for normal and mutant ataxin-2 and prevents ataxin-2-induced cell death." Exp Neurol **203**(2): 531-41.
- Huynh, D. P., H. T. Yang, et al. (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): 1485-96.
- Imbert, G., F. Saudou, et al. (1996). "Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats." Nat Genet **14**(3): 285-91.
- Irwin, S., M. Vandelft, et al. (2005). "RNA association and nucleocytoplasmic shuttling by ataxin-1." J Cell Sci **118**(Pt 1): 233-42.
- Karpova, T. S., K. Tatchell, et al. (1995). "Actin filaments in yeast are unstable in the absence of capping protein or fimbrin." J Cell Biol **131**(6 Pt 1): 1483-93.
- Kashiwabuchi, N., K. Ikeda, et al. (1995). "Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice." Cell **81**(2): 245-52.
- Koeppen, A. H. (1991). "The Purkinje cell and its afferents in human hereditary ataxia." J Neuropathol Exp Neurol **50**(4): 505-14.
- Koeppen, A. H. (2005). "The pathogenesis of spinocerebellar ataxia." Cerebellum **4**(1): 62-73.
- Kolch, W. (2005). "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 827-37.
- Kotaja, N. and P. Sassone-Corsi (2007). "The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 85-90.
- Koyano, S., K. Iwabuchi, et al. (2002). "Paradoxical absence of nuclear inclusion in cerebellar Purkinje cells of hereditary ataxias linked to CAG expansion." J Neurol Neurosurg Psychiatry **73**(4): 450-2.
- Kozlov, G., G. De Crescenzo, et al. (2004). "Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase." Embo J **23**(2): 272-81.
- Kozlov, G., J. F. Trempe, et al. (2001). "Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4409-13.
- Lastres-Becker, I., S. Brodesser, et al. (2008). "Insulin Receptor and Lipid Metabolism Pathology in Ataxin-2 Knock-out Mice." Hum Mol Genet.
- Lee, D. Y., J. J. Hayes, et al. (1993). "A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA." Cell **72**(1): 73-84.

- Lievens, J. C., T. Rival, et al. (2005). "Expanded polyglutamine peptides disrupt EGF receptor signaling and glutamate transporter expression in *Drosophila*." *Hum Mol Genet* **14**(5): 713-24.
- Lim, J., T. Hao, et al. (2006). "A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration." *Cell* **125**(4): 801-14.
- Liu, Y. F., R. C. Deth, et al. (1997). "SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signaling complexes." *J Biol Chem* **272**(13): 8121-4.
- Maine, E. M., D. Hansen, et al. (2004). "*Caenorhabditis elegans* atx-2 promotes germline proliferation and the oocyte fate." *Genetics* **168**(2): 817-30.
- Mangus, D. A., N. Amrani, et al. (1998). "Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation." *Mol Cell Biol* **18**(12): 7383-96.
- Margolis, R. L. (2002). "The spinocerebellar ataxias: order emerges from chaos." *Curr Neurol Neurosci Rep* **2**(5): 447-56.
- McKay, M. M. and D. K. Morrison (2007). "Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK." *Oncogene* **26**(22): 3113-21.
- McMahon, H. T. and I. G. Mills (2004). "COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches." *Curr Opin Cell Biol* **16**(4): 379-91.
- Merrill, M. A., Z. Malik, et al. (2007). "Displacement of alpha-actinin from the NMDA receptor NR1 C0 domain By Ca²⁺/calmodulin promotes CaMKII binding." *Biochemistry* **46**(29): 8485-97.
- Michailidis, I. E., T. D. Helton, et al. (2007). "Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulates NMDA receptor activity through alpha-actinin." *J Neurosci* **27**(20): 5523-32.
- Michalik, A. and C. Van Broeckhoven (2003). "Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited." *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**: R173-86.
- Modregger, J., A. A. Schmidt, et al. (2003). "Characterization of Endophilin B1b, a brain-specific membrane-associated lysophosphatidic acid acyl transferase with properties distinct from endophilin A1." *J Biol Chem* **278**(6): 4160-7.
- Moseley, M. L., K. A. Benzow, et al. (1998). "Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families." *Neurology* **51**(6): 1666-71.
- Nonhoff, U., M. Ralser, et al. (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): 1385-96.
- Norton, V. G., K. W. Marvin, et al. (1990). "Nucleosome linking number change controlled by acetylation of histones H3 and H4." *J Biol Chem* **265**(32): 19848-52.
- Nuriya, M., S. Oh, et al. (2005). "Phosphorylation-dependent interactions of alpha-Actinin-1/IQGAP1 with the AMPA receptor subunit GluR4." *J Neurochem* **95**(2): 544-52.
- Otey, C. A. and O. Carpen (2004). "Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player." *Cell Motil Cytoskeleton* **58**(2): 104-11.
- Otto, J. J. (1994). "Actin-bundling proteins." *Curr Opin Cell Biol* **6**(1): 105-9.
- Pal, A., F. Severin, et al. (2006). "Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease." *J Cell Biol* **172**(4): 605-18.
- Palmer, K. J., J. E. Konkel, et al. (2005). "PCTAIRE protein kinases interact directly with the COPII complex and modulate secretory cargo transport." *J Cell Sci* **118**(Pt 17): 3839-47.
- Pang, J. T., P. Giunti, et al. (2002). "Neuronal intranuclear inclusions in SCA2: a genetic, morphological and immunohistochemical study of two cases." *Brain* **125**(Pt 3): 656-63.
- Parvinen, M. (2005). "The chromatoid body in spermatogenesis." *Int J Androl* **28**(4): 189-201.
- Payami, H., J. Nutt, et al. (2003). "SCA2 may present as levodopa-responsive parkinsonism." *Mov Disord* **18**(4): 425-9.
- Perez-Navarro, E., A. M. Canudas, et al. (2000). "Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease." *J Neurochem* **75**(5): 2190-9.

- Petrelli, A., G. F. Gilestro, et al. (2002). "The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met." *Nature* **416**(6877): 187-90.
- Pulst, S. M., A. Nechiporuk, et al. (1996). "Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2." *Nat Genet* **14**(3): 269-76.
- Ralsler, M., M. Albrecht, et al. (2005). "An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2." *J Mol Biol* **346**(1): 203-14.
- Ralsler, M., U. Nonhoff, et al. (2005). "Ataxin-2 and huntingtin interact with endophilin-A complexes to function in plastin-associated pathways." *Hum Mol Genet* **14**(19): 2893-909.
- Rao, D. S., S. V. Bradley, et al. (2003). "Altered receptor trafficking in Huntingtin Interacting Protein 1-transformed cells." *Cancer Cell* **3**(5): 471-82.
- Reddy, P. S. and D. E. Housman (1997). "The complex pathology of trinucleotide repeats." *Curr Opin Cell Biol* **9**(3): 364-72.
- Ringstad, N., Y. Nemoto, et al. (1997). "The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16): 8569-74.
- Rohrbough, J. and K. Broadie (2005). "Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle." *Nat Rev Neurosci* **6**(2): 139-50.
- Sahba, S., A. Nechiporuk, et al. (1998). "Genomic structure of the human gene for spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) on chromosome 12q24.1." *Genomics* **47**(3): 359-64.
- Sanpei, K. (1999). "[The function of spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) gene product, ataxin-2 and the mechanism of pathogenesis for SCA2]." *Nippon Rinsho* **57**(4): 822-4.
- Sanpei, K., H. Takano, et al. (1996). "Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT." *Nat Genet* **14**(3): 277-84.
- Satterfield, T. F., S. M. Jackson, et al. (2002). "A Drosophila homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation." *Genetics* **162**(4): 1687-702.
- Satterfield, T. F. and L. J. Pallanck (2006). "Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes." *Hum Mol Genet* **15**(16): 2523-32.
- Schagger, H. (2006). "Tricine-SDS-PAGE." *Nat Protoc* **1**(1): 16-22.
- Scherer, W. F., J. T. Syverton, et al. (1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix." *J Exp Med* **97**(5): 695-710.
- Schols, L., P. Bauer, et al. (2004). "Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis." *Lancet Neurol* **3**(5): 291-304.
- Shan, D. E., R. S. Liu, et al. (2004). "Presence of spinocerebellar ataxia type 2 gene mutation in a patient with apparently sporadic Parkinson's disease: clinical implications." *Mov Disord* **19**(11): 1357-60.
- Shan, D. E., B. W. Soong, et al. (2001). "Spinocerebellar ataxia type 2 presenting as familial levodopa-responsive parkinsonism." *Ann Neurol* **50**(6): 812-5.
- Shein, H. M. and J. F. Enders (1962). "Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics." *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**: 1164-72.
- Shibata, H., D. P. Huynh, et al. (2000). "A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2." *Hum Mol Genet* **9**(9): 1303-13.
- Short, B., A. Haas, et al. (2005). "Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus." *Biochim Biophys Acta* **1744**(3): 383-95.
- Simon-Sanchez, J., M. Hanson, et al. (2005). "Analysis of SCA-2 and SCA-3 repeats in Parkinsonism: evidence of SCA-2 expansion in a family with autosomal dominant Parkinson's disease." *Neurosci Lett* **382**(1-2): 191-4.

- Song, C., G. Perides, et al. (2002). "Expression of full-length polyglutamine-expanded Huntingtin disrupts growth factor receptor signaling in rat pheochromocytoma (PC12) cells." J Biol Chem **277**(8): 6703-7.
- Soubeyran, P., K. Kowanetz, et al. (2002). "Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors." Nature **416**(6877): 183-7.
- Steffan, J. S., A. Kazantsev, et al. (2000). "The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6763-8.
- Stevanin, G., A. Durr, et al. (2002). "Spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions." Adv Exp Med Biol **516**: 47-77.
- Stradal, T., W. Kranewitter, et al. (1998). "CH domains revisited." FEBS Lett **431**(2): 134-7.
- Szymkiewicz, I., K. Kowanetz, et al. (2002). "CIN85 participates in Cbl-b-mediated down-regulation of receptor tyrosine kinases." J Biol Chem **277**(42): 39666-72.
- Tharun, S., W. He, et al. (2000). "Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay." Nature **404**(6777): 515-8.
- Thomson, T. and P. Lasko (2004). "Drosophila tudor is essential for polar granule assembly and pole cell specification, but not for posterior patterning." Genesis **40**(3): 164-70.
- Thomson, T. and P. Lasko (2005). "Tudor and its domains: germ cell formation from a Tudor perspective." Cell Res **15**(4): 281-91.
- Trottier, Y., V. Biancalana, et al. (1994). "Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset." J Med Genet **31**(5): 377-82.
- Truant, R., L. A. Raymond, et al. (2006). "Canadian Association of Neurosciences Review: polyglutamine expansion neurodegenerative diseases." Can J Neurol Sci **33**(3): 278-91.
- Tseng-Rogenski, S. S., J. L. Chong, et al. (2003). "Functional conservation of Dhh1p, a cytoplasmic DExD/H-box protein present in large complexes." Nucleic Acids Res **31**(17): 4995-5002.
- Turnbull, V. J., E. Storey, et al. (2004). "Different ataxin-2 antibodies display different immunoreactive profiles." Brain Res **1027**(1-2): 103-16.
- Twells, R. C., M. L. Metzker, et al. (2001). "The sequence and gene characterization of a 400-kb candidate region for IDDM4 on chromosome 11q13." Genomics **72**(3): 231-42.
- Velier, J., M. Kim, et al. (1998). "Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways." Exp Neurol **152**(1): 34-40.
- Wahlstrom, G., H. L. Norokorpi, et al. (2006). "Drosophila alpha-actinin in ovarian follicle cells is regulated by EGFR and Dpp signalling and required for cytoskeletal remodelling." Mech Dev **123**(11): 801-18.
- Waldherr, M., A. Ragnini, et al. (1993). "A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast." Curr Genet **24**(4): 301-6.
- Wu, L. G. (2004). "Kinetic regulation of vesicle endocytosis at synapses." Trends Neurosci **27**(9): 548-54.
- Wyszynski, M., V. Kharazia, et al. (1998). "Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring protein, in rat brain." J Neurosci **18**(4): 1383-92.
- Wyszynski, M., J. Lin, et al. (1997). "Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor." Nature **385**(6615): 439-42.
- Yamochi, T., I. Nishimoto, et al. (2001). "ik3-1/Cables is associated with Trap and Pctaire2." Biochem Biophys Res Commun **286**(5): 1045-50.
- Yue, S., H. G. Serra, et al. (2001). "The spinocerebellar ataxia type 1 protein, ataxin-1, has RNA-binding activity that is inversely affected by the length of its polyglutamine tract." Hum Mol Genet **10**(1): 25-30.
- Zuccato, C., A. Ciammola, et al. (2001). "Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease." Science **293**(5529): 493-8.

Anhang

Lebenslauf

Dipl. Biol. Florian Eich

Persönliche Daten

Geboren	09.November 1976 in Frankfurt am Main
Familienstand	ledig

Schulbildung

1983-1987	Anna-Schmidt-Grundschule in Frankfurt am Main
1987-1996	Anna-Schmidt-Gymnasium in Frankfurt am Main Abitur in den Fächern Biologie, Geschichte, Englisch und Kunst

Wehrdienst

November 1996 -August 1997	Grundwehrdienst in Budel/Niederlande und Bad Sobernheim
-------------------------------	--

Studium

Oktober 1997 -Januar 2003	Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
März 2000	Diplom-Vorprüfung in den Fächern Zoologie, Botanik, Chemie und Physik
März 2002	Diplomprüfung in den Fächern Zell- und Entwicklungsbiologie, Neurobiologie und Biochemie
April 2001 -Januar 2004	Studentische Hilfskraft/Hilfskraft „Biologie für Mediziner“ am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität bei Dr. Frank Bonzelius
April 2002 -Januar 2003	Diplomarbeit im Fach Zell- und Entwicklungsbiologie Arbeitsgruppe Kinematische Zellforschung der Johann Wolfgang Goethe-Universität bei Prof. Dr. J. Bereiter- Hahn
Januar 2003	Abschluss als Diplom-Biologe

Juni 2003
-September 2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis
kardiovaskuläre Physiologie des Klinikums der Johann
Wolfgang Goethe-Universität bei Prof. Dr. R. Busse

Seit März 2004 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Molekulare
Neurogenetik des Klinikums der Johann Wolfgang
Goethe-Universität bei Prof. Dr. G. Auburger

Publikationen

2008 Nonis D, Schmitt M, van de Loo S, Tanaka S, Eich F,
Dikic I, Nowock J, Auburger G; *Ataxin-2 associates with
the Endocytosis Complex at Membranes and affects EGF
Receptor trafficking*; Cellular Signalling; positiv
Begutachtet

2008 van de Loo S, Eich F, Nonis D, Nowock J, Auburger G;
Ataxin-2 associates with rough endoplasmic reticulum;
Experimental Neurology; in Begutachtung

2008 Lastres-Becker I, Fittschen M, Wolburg H, Nonis D, Eich
F, Walter M, Auburger G; *Function of Ataxin-2 in RNA-
metabolism*; Manuskript in Voreireitung

Teilnahme an Meetings und Posterpräsentationen

2004 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie
in Berlin

2005 16th World Congress on Parkinson Disease & related
Disorders Eich F, Nowock J, Auburger G: Protein
Interaction of „Similar to golgin-like“ and Ataxin-2

2007 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie
in Frankfurt am Main

2007 III. Meeting on the Molecular Mechanisms of
Neurodegeneration in Mailand/Italien
Eich F, Nowock J, Auburger G: Ataxin-2 interacts with
„Similar to golgin-like“

Fortbildungen und Aufenthalte bei Kooperationspartnern

2004 *EUROSCA Core facility training in use of yeast-two-hybrid
system for protein interaction investigation in Berlin*

2004 *EUROSCA Core facility training in use of microarrays for
expression analysis in London*

- 2004 *EUROSCA Core facility training in generation and use of monoclonal and polyclonal antibodies in Illkirch*
- 2004 *EUROSCA Core facility training in use of drosophila as a model for neurodegenerative diseases in Paris*
- 2005 *EUROSCA Core facility training in proteomic approaches for the investigation of neurodegeneration in spinocerebellar ataxias*
- 2006 Forschungsarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Arbeitsgruppe Intracellular Protein Transport bei Dr. Francis Barr
- 2007 *II. EUROSCA Core facility training in use of drosophila as a model for neurodegenerative diseases in Paris*

Sonstiges

Ehrenamtliche Tätigkeiten 1992-1996 Mitarbeiter im evangelischen Jugendwerk
1998-2002 Mitarbeit in diversen Fachbereichsgremien der Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt am Main

Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen und Herren:

Bereiter-Hahn, Starzinski-Powitz, Zimmermann, Volkmandt, Kröger, Osiewacz, Plassmann,
Wiltschko R., Wiltschko W., Ludwig, Soppa, Melcher, Busse, Brandes

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Georg Auburger danke ich für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Herbert Zimmermann danke ich für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit.

Dem EuroSCA Konsortium gebührt herzlicher Dank für die Bereitstellung der Mittel und die Durchführung exzellenter Schulungen während meiner Arbeit.

Dr. Joachim Nowock, Dr. Isabel Lastres-Becker, David Nonis, Simone van de Loo, Mekhman Azizov, Dr. Suzana Gispert-Sanchez, Dr. Hans-Hermann Höpken, Alexander Kurz, Filomena Ricciardi, Marina Talamini und Birgitt Meseck-Selchow danke ich für die gute Zusammenarbeit, anregende Diskussionen und die freundliche, angenehme Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors.

Ein herzlicher Dank gebührt auch Prof. Dr. Ritva Tikkanen für die Bereitstellung des Konfokalen Mikroskopes, Dr. Daniel Becker für seine Unterstützung bei den FRAP – Experimenten, Dr. Francis Barr und Dr. Alexander Haas für die freundliche Aufnahme im MPI für Biochemie in München und Unterstützung für die VSV-G Experimente, Prof. Dr. Hermann Rohrer und Tobias Reiff vom MPI für Hirnforschung in Frankfurt für die Bereitstellung und die Einweisung in den Amara Nucleofactor, Prof. Dr. Hermann Schägger und Dr. Ilka Wittig für die Ermöglichung der 2D-Gelelektrophorese, Dr. Mirko Schmidt für Diskussionen und Hilfe bei den EGF-Experimenten und Prof. Dr. Masato Okada für den TRAP-Antikörper.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Freundin Jacqueline Mahlo für ihre liebevolle Unterstützung und die Durchsicht meiner Arbeit.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, die mich während meines Studiums und meiner Promotionszeit sehr großzügig unterstützt haben und mir den Rückhalt gaben, den ich brauchte.