

Spinozerebelläre Ataxie Typ 2: Untersuchungen zur Rolle von Ataxin-2 in der transkriptionellen Regulation

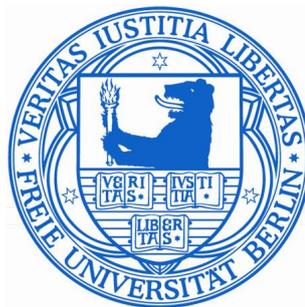
Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Bereich der Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Linda Camilla Hallen
aus Heidelberg



August 2010

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2006 bis August 2010
am **Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik**
unter der Leitung von **Prof. Dr. Hans Lehrach** angefertigt.

1. Gutachterin **Prof. Dr. Constance Scharff**
Institut für Neurobiologie und Verhaltensbiologie
Freie Universität Berlin
Takustrasse 6, 14195 Berlin
Tel. +30 838 53841
E-Mail: Scharff@zedat.fu-berlin.de

2. Gutachter **Prof. Dr. Hans Lehrach**
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik
Innestrasse 63-73, 14195 Berlin
Tel. +030 8413 1220
E-Mail: Lehrach@molgen.mpg.de

Disputation am: 29. November 2010

Was unser Denken begreifen kann, ist kaum ein Punkt, fast gar nichts im Verhältnis zu dem, was es nicht begreifen kann.“

(John Locke (1632-1704))

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen, als die hier angegeben Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe.

Berlin, den 31. August 2010

Linda Camilla Hallen

für meine Eltern.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	13
1.1 Polyglutaminerkrankungen.....	13
1.2 Spinozerebelläre Ataxie Typ 2.....	16
1.2.1 Symptomatik und Ursachen.....	16
1.2.3 Das SCA2-Genprodukt, Ataxin-2, und seine biologische Funktion.....	18
1.2.4 Biologische Funktionen von ATXN2-Homologen.....	20
1.3 Dysregulierte Stoffwechselwege in der Pathogenese von SCA2 und weiteren Polyglutaminerkrankungen.....	23
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	30
2. Material und Methoden.....	33
2.1 Material.....	33
2.1.1 Geräte und Materialien.....	33
2.1.2 Reagenzien.....	35
2.1.3 Protein und DNA-Marker.....	37
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	37
2.1.5 Verwendete Hefestämme und Hefe-Medien.....	40
2.1.6 Verwendete Bakterienstämme und Hefestämme.....	41
2.1.7 Humane Zelllinien.....	42
2.1.8 Antikörper.....	42
2.1.9 Oligonukleotide.....	43
2.1.10 Plasmide.....	44
2.2 Methoden.....	47
2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	47
2.2.2 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	47
2.2.3 Plasmid-DNA Präparation.....	48
2.2.4 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen.....	48
2.2.5 Agarosegelelektrophorese.....	49
2.2.6 Restriktionsverdau.....	49
2.2.7 Ligation.....	49

2.2.8 Transformation von chemokompetenten E.coli-Stämmen.....	50
2.2.9 Plasmidtransformation in S. cerevisiae.....	50
2.2.10 Yeast-Two-Hybrid (Y2H)-Analyse.....	50
2.2.11 Quantitativer β -Galaktosidasetest.....	51
2.2.12 Herstellung intrazellulärer Antikörper mit interferierenden Eigenschaften für Protein-Protein-Interaktionen	51
2.2.13 Antikörper-Anreicherung mit Hilfe von Phagen-Display.....	52
2.2.14 Intrabody-Selektion mittels reverser Y2H-Analyse	52
2.2.15 Lagerung von Säugetierzellen.....	53
2.2.16 Kultivierung von Säugetierzellen.....	54
2.2.17 Transfektion von Säugetierzellen mit Plasmid-DNA	54
2.2.18 Induktion von oxidativem Stress in Säugetierzellen.....	55
2.2.19 Lyse von Säugetierzellen.....	55
2.2.20 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.2.21 Coomassie-Färbung.....	56
2.2.22 Immunoblotting.....	57
2.2.23 Koimmunpräzipitation.....	58
2.2.24 Chromatin-Immunpräzipitation.....	58
2.2.25 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	59
2.2.26 small interfering RNA	60
2.2.27 RNA-Extrahierung aus Säugetierzellen.....	61
2.2.28 Herstellung einzelsträngiger cDNA.....	61
2.2.29 Quantitative „RealTime“-PCR (qPCR)	62
2.2.30 Promotorstudien	62
3. Ergebnisse.....	65
3.1 Untersuchungen zur Interaktion zwischen ATXN2 und ZBRK1	65
3.1.1 ZBRK1 und ATXN2 interagieren im Y2H-System	65
3.1.2 ZBRK1 und ATXN2 interagieren in Säugerzellen.....	69
3.1.3 Lokalisation von ZBRK1 und ATXN2 in Säugerzellen.	70
3.2 Eine Überexpression von ZBRK1 beeinflusst die intrazelluläre ATXN2-Konzentration.	75

3.3 Der SCA2-Promotor enthält potentielle ZBRK1-Bindestellen.....	78
3.3.1 Ein Komplex bestehend aus ZBRK1 und ATXN2 aktiviert den SCA2-Promotor	81
3.4 Herstellung von Intrabodies mit interferierenden Eigenschaften für die Interaktion von ZBRK1 und ATXN2	82
3.4.1 Validierung der Intrabodies IB-ZBRK1-NT22-5/1, IB-ZBRK1-NT22-6/1 und IB-ZBRK1-NT22-7/1 im humanen System.....	86
3.5 Die Expression von Intrabody FLAG-IB-7/1 beeinflusst die SCA2-Genexpression	89
3.6 Identifizierung von Zielgenen des ZBRK1/ATXN2-Komplexes.....	90
3.7 Validierung der putativen ZBRK1-Bindestellen im ATM-Promotor.....	92
3.8 Ein ZBRK1/ATXN2-Komplex führt zur Aktivierung des ATM-Promotors.....	93
3.9 ZBRK1- bzw. ATXN2-Defizienz resultiert in einer reduzierten ATM-Expression	94
3.10 Reduzierte SCA2- und ATM-Expressionslevel in Dickdarmkarzinoma-Patienten mit geringer ZBRK1-Konzentration	96
3.11 Transkriptionelle Dysregulation in SCA2?.....	97
3.11.1 ZBRK1 interagiert mit der pathogenen Form von ATXN2	97
3.12 Pathogenes ATXN2 beeinträchtigt die Aktivierung des SCA2- und des ATM-Promotors	100
3.13 Beeinflusst pathogenes ATXN2 die Phosphorylierung der ATM-Substrate?.....	101
4. Diskussion.....	105
4.1 Interaktion zwischen ATXN2 und dem transkriptionellen Regulator ZBRK1	105
4.2 Kernlokalisierung von ZBRK1 und ATXN2	107
4.3 ZBRK1 und ATXN2 sind an der Aktivierung von SCA2 beteiligt.....	109
4.4 Der Aktivatorkomplex ZBRK1/ ATXN2 reguliert ATM.....	112
4.5 Reduzierte Expression von ZBRK1, ATXN2 und ATM in Kolonkarzinoma	114
4.6 Transkriptionelle Dysregulation in der Pathogenese von SCA2?	116
5. Zusammenfassung.....	123
6. Summary.....	125
7. Literaturverzeichnis.....	127
8. Abkürzungen.....	141
9. Publikationen	145
10. Lebenslauf.....	147

1. Einleitung

1.1 Polyglutaminerkrankungen

Polyglutaminerkrankungen gehören einer Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen an, die meistens im fortgeschrittenen Alter einsetzen und zunehmend zum Verlust von Nervengewebe führen. Sie zeichnen sich durch eine Expansion des Trinukleotids CAG aus, welche in der kodierenden Region des krankheitsauslösenden Gens lokalisiert ist und in einer für die Familie charakteristischen verlängerten Glutaminregion resultiert. Zur Zeit werden neun Krankheiten den Polyglutaminerkrankungen zugeordnet, wovon Chorea Huntington (Huntington-Krankheit, HD), die Spinozerebellären Ataxien (SCA) von Typ 1, 2, 3, 6, 7 und 17 sowie die Dentatorubropallidolusiane Atrophie (DRPLA) autosomal dominant vererbt werden, die Spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA) hingegen X-chromosomal rezessiv.

Neben der Familie der Polyglutaminerkrankungen existiert die Klasse der nicht-kodierenden Erkrankungen, welche ebenfalls den Trinukleotiderkrankungen zugeordnet werden und sich durch eine Trinukleotidsequenz in der nicht-kodierenden Region des krankheitsauslösenden Gens auszeichnen. Hierbei handelt es sich vorwiegend um multisystematische Erkrankungen, welche das Fragile-X Syndrom, die Friedreich Ataxie, die Myotonische Dystrophie sowie die Spinozerebellären Ataxien von Typ 8 und Typ 12 beinhalten [2-3].

Die jeweiligen Polyglutaminerkrankungen treten, wie bereits erwähnt meistens im mittleren Lebensabschnitt der betroffenen Personen auf und führen zu neuronalen Fehlfunktionen, welche in einer progressiven Neurodegeneration enden [3]. Interessanterweise treten die jeweiligen Degenerationen vorwiegend in den krankheitsspezifischen Gehirnarealen auf, welche zwischen den einzelnen Polyglutaminerkrankungen variieren (siehe Abbildung 1).

So kommt es bei der Huntington-Krankheit (HD) vorwiegend zur Degeneration im Nucleus caudatus und Putamen sowie zum neuronalen Zellverlust im Neostriatum. Im Falle der SBMA oder auch sogenannten Kennedy-Krankheit führt die Erkrankung zur Degeneration im Vorderhorn, der bulbären Region sowie des dorsalen Wurzelganglions. Die Neuropathologie bei DRPLA ist vorwiegend durch den neuronalen Zellverlust im Zerebralen und Zerebellären Cortex, im Globus pallidus und

Einleitung

im Striatum gekennzeichnet. Im Fall der Spinozerebellären Ataxien zeigt sich ein neuronaler Zellverlust der Purkinje-Zellen im Zerebellum. Interessanterweise sind bei SCA3 im Vergleich zu den anderen Spinozerebellären Ataxien vorwiegend die „Dentate Neuronen“ und nur vereinzelt die Purkinje-Zellen des Zerebellums betroffen [4].

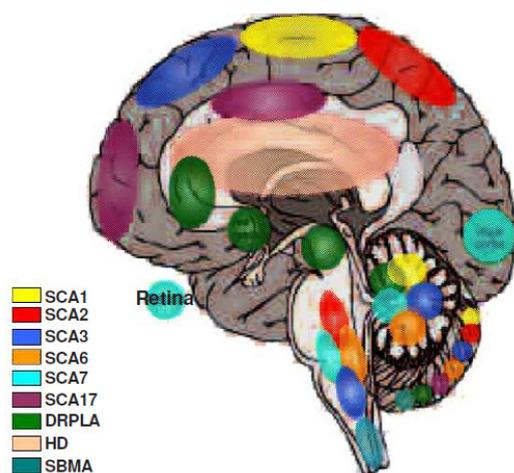


Abbildung 1: Schematische Darstellung betroffener Gehirnregionen bei bisher bekannten Polyglutaminerkrankungen (nach [4]).

Tabelle 1 verdeutlicht zunächst, dass die Anzahl der CAG-Wiederholungen sowohl in der Pathogenese als auch unter physiologischen Bedingungen zwischen den unterschiedlichen Erkrankungen variiert und zudem in den entsprechenden krankheitsauslösenden Genen stark polymorph ist [2]. Bei Erreichen einer bestimmten Anzahl an CAG-Wiederholungen, und somit dem Übertreten eines bestimmten Schwellenwerts, kommt es zum Ausbruch der entsprechenden Erkrankung. Interessanterweise führen längere CAG-Wiederholungen zu einer höheren Penetranz, einem früheren Krankheitsausbruch und resultieren in stärkeren Symptomen [3, 5]. Zudem weisen expandierte CAG-Wiederholungen sowohl in somatischen als auch in Keimbahnzellen eine geringere Stabilität auf, welche häufig bei Weitergabe auf die nächste Generation in einer größeren Expansion resultiert und als sogenannte Antizipation bezeichnet wird. Auch konnte eine stärkere Expansion der CAG-Wiederholungen durch paternale Vererbung beobachtet werden [5-6].

Des Weiteren konnte das Auftreten eines sogenannten „Graubereichs“ beobachtet werden, welcher anhand von Huntingtin erläutert werden soll. Unter physiologischen

Bedingungen kann die Anzahl der CAG-Wiederholungen im ersten Exon des *Huntingtin*-Gens zwischen 6 und 35 CAG-Triplets betragen. Beinhaltet die kodierende Region allerdings eine erhöhte Anzahl von Trinukleotidtriplets, welche zwischen 36 und 121 CAG-Wiederholungen variieren kann, kommt es im Laufe des Lebens zur entsprechenden Symptomatik sowie zur progressiven Neurodegeneration. Betroffene, welche im ersten Exon des *Huntingtin*-Gens zwischen 30 und 35-CAG-Wiederholungen besitzen, exprimieren den sogenannten „Graubereich“, da sie selber keine Symptome entwickeln müssen, aber aufgrund der Antizipation ein erhöhtes Risiko einer HD-Erkrankung in den direkten Nachkommen hervorrufen können [5].

Tabelle 1: Übersicht der bekannten Polyglutaminerkrankungen (nach [2])

Krankheit	Protein	CAG Normal	CAG pathogen
Huntington-Krankheit, HD	Huntingtin	6 – 35	36 - > 200
Spinale und bulbäre Muskelatrophie, SBMA	Androgenrezeptor	9 – 36	38 – 62
Dentatorubropallidoluisiane Atrophie, DRPLA	Atrophin 1	7 – 34	49 – 88
Spinozerebelläre Ataxie Typ 1, SCA1	Ataxin-1	6 – 39	40 – 82
Spinozerebelläre Ataxie Typ 2, SCA2	Ataxin-2	15 – 24	32 – 200
Spinozerebelläre Ataxie Typ 3, SCA3	Ataxin-3	13 – 36	61 – 84
Spinozerebelläre Ataxie Typ 6, SCA6	CACNA1A	4 – 20	20 – 29
Spinozerebelläre Ataxie Typ 7, SCA7	Ataxin-7	4 – 35	37 – 306
Spinozerebelläre Ataxie Typ 17, SCA17	TATA-Box-Bindeprotein	25 – 42	47 – 63

Über die Funktion der einzelnen Polyglutaminproteine ist bisher relativ wenig bekannt. So wird dem Huntingtin-Protein eine Rolle in der transkriptionellen Regulation zugeschrieben. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Huntingtin an der Regulierung von p53 sowie des nukleären Faktor Y (NF-Y) beteiligt ist [7]. Zudem assoziiert Huntingtin mit zellulären Vesikel sowie Mikrotubuli und spielt eine Rolle bei der Endozytose und dem axonalen Transport [8-11]. Ataxin-7 (ATXN7) und das TATA-Box-bindende Protein (TBP) gehören zum TFTC/STAGA-Komplex, welcher mit DNA-bindenden Aktivatoren interagiert und an der Regulierung der entsprechenden Gene beteiligt ist [12-14]. Der Androgen-Rezeptor, ein Transkriptionsfaktor, ist an der Spermatogenese sowie an der frühen Entwicklung männlicher Föten beteiligt [15]. Untersuchungen zu Ataxin-1 (ATXN1) ordneten das SCA1-krankheitsauslösende

Protein ebenfalls funktionell der transkriptionellen Regulation zu [16-17]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ATXN1 direkt an RNA bindet und am nukleären Export der mRNA beteiligt ist [18-20]. Auch konnte Atrophin-1 sowie Ataxin-3 (ATXN3) eine funktionelle Rolle in der transkriptionellen Regulation zugeordnet werden [21-22]. Zusätzlich kann ATXN3 mit dem Ubiquitin-vermittelten Abbau von Proteinen in Zusammenhang gebracht werden und ist somit an der Regulierung des Proteasoms beteiligt [23]. Das SCA6-krankheitsauslösende Protein CACNA1A (*calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit*) stellt eine Untereinheit des spannungsabhängigen P/Q-Kalzium-Kanals dar, welcher an der spannungsabhängigen Aktivierung von Neuronen beteiligt ist, die durch eine verlängerte Polyglutaminregion beeinträchtigt wird [24].

Wie bereits erwähnt resultiert eine Expansion der CAG-Wiederholungen in den jeweiligen Polyglutaminerkrankungen. Deren gemeinsames Merkmal ist die Bildung nukleärer und zytoplasmatischer Proteineinlagerungen, denen eine Rolle in der entsprechenden Pathogenese zugeschrieben wird. Bemerkenswerterweise kann dies nicht für SCA2 angenommen werden, da Betroffene nur in 1-2 % der Fälle Proteineinlagerungen aufweisen [3].

Im Folgenden wird speziell auf die Spinozerebelläre Ataxie Typ 2 sowie das krankheitsauslösende SCA2-Gen eingegangen, da diese den Schwerpunkt der folgenden Arbeit ausmachen.

1.2 Spinozerebelläre Ataxie Typ 2

1.2.1 Symptomatik und Ursachen

Wie bereits erwähnt gehört die Spinozerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2) der Familie der Polyglutaminerkrankungen an. Neben anderen Spinozerebellären Ataxien wird auch diese autosomal dominant vererbt. Weltweit werden ca. 13 % aller beobachteten dominant vererbten Spinozerebellären Ataxien als SCA2 diagnostiziert, wobei der Anteil in Deutschland ca. 27 %, in England und im Süden Italiens 45 % und in Indien sogar 47 % beträgt [25-28].

Ursprünglich wurde SCA2 durch eine auffällige Verlangsamung der Augensakkaden entdeckt. Im Laufe der Zeit wurden weitere Symptome wie Gangataxie, Tremor, Muskelatrophie, Dysarthrie, eingeschränkte oder fehlende Reflexe, periphere

Neuropathie, Parkinsonismus und Demenz beschrieben [29-31]. Diese für die Krankheit spezifischen Merkmale sind vorwiegend auf den starken Verlust von Purkinje-Zellen im Zerebellum zurückzuführen [32]. Dennoch sind darüber hinaus auch andere neuronale Bereiche, wie pontine Nuklei, Olivae inferiores, Substantia nigra, Thalamus, zerebraler Kortex und spinale Trakte von starkem Zellverlust betroffen [33-36].

Das für die Krankheit verantwortliche Gen wurde 1996 von drei unterschiedlichen Gruppen identifiziert und als *SCA2* bezeichnet [37-39]. Dessen genomische Sequenz, welche etwa 130 kb umfasst, ist auf Chromosom 12p23-24.1 lokalisiert und beinhaltet 25 Exons [40]. Die für Glutamin kodierende CAG-Wiederholung befindet sich im 5'-Bereich des *SCA2*-Gens. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass 90 % aller untersuchten *SCA2*-Allele 22 CAG- bzw. 6 % 23-CAG-Wiederholungen aufwiesen. Zudem konnte in beiden Fällen ebenfalls beobachtet werden, dass die CAG-Trinukleotidwiederholungen von einem bzw. zwei CAA-Tripletts unterbrochen werden. Dies führt zur Annahme, dass CAA-Tripletts an der genomischen Stabilisierung der CAG-Wiederholungen beteiligt sein könnten. Dies wird dadurch bestärkt, dass pathogene Allele, welche eine expandierte Abfolge von zwischen 33 und 200 CAG-Wiederholungen aufweisen, keine CAA-Tripletts beinhalten [38, 41]. Expressionsanalysen ergaben, dass das *SCA2*-Gen ubiquitär transkribiert wird. Neben der Expression in Gehirngeweben konnten ebenfalls in Gewebe von Herz, Lunge, Niere, Leber, Pankreas und der Skelettmuskulatur entsprechende *SCA2*-Transkripte nachgewiesen werden [42]. Im Gehirn wird das *SCA2*-Gen vorwiegend in den Purkinje-Zellen des Zerebellums, in den pyramidalen Nervenzellen im Frontalcortex sowie im Hippocampus und der Amygdala, in der Substantia nigra und in wenigen Nuklei des Hirnstamms transkribiert [39, 43].

Die Generierung einer homozygoten *SCA2*^{-/-}-Maus sollte der Überprüfung von neuronaler Degeneration bei ATXN2-Defizienz dienen, welche allerdings nicht beobachtet werden konnte. Ebenso wiesen diese Mäuse keine besonderen histologischen Anomalitäten auf. Interessanterweise wurden, im Vergleich zum Wildtyp, bei *SCA2*^{-/-}-Mäusen deutlich weniger weibliche Nachkommen beobachtet. Zum anderen konnte durch eine Zufuhr von kalorienreicherer Nahrung eine signifikante Gewichtszunahme der *SCA2*-defizienten-Mäuse beobachtet werden, welche wiederum durch fettreduzierte Nahrung verhindert werden konnte. Wie bereits erwähnt weisen nur geringe postmortale Gehirnschnitte von *SCA2*-Patienten nukleäre Proteineinlagerungen

auf. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass diese vermehrt eine erhöhte Konzentration des pathogenen ATXN2-Proteins im Gehirn exprimieren, was einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Krankheitsverlauf und der ATXN2-Konzentration vermuten lässt [44].

1.2.3 Das SCA2-Genprodukt, Ataxin-2, und seine biologische Funktion

Wie bereits eingangs erwähnt wurde, ist die genaue Funktion des SCA2-Genprodukts Ataxin-2 (ATXN2) bis heute noch nicht ganz verstanden.

Das humane ATXN2-Protein besteht aus 1312 Aminosäuren (AS) und weist eine molekulare Masse von 140 kDa auf. Wie der Abbildung 2 zu entnehmen ist, besitzt ATXN2 zwischen den AS-Positionen 166-187 eine N-terminal lokalisierte Polyglutaminregion, welche von einer Prolin- und Serin-reichen Region umgeben ist. Insgesamt ist das Protein basisch, enthält aber im Bereich der AS 254-475 eine saure Region, welche die evolutionär stark konservierte globuläre LSm/LsmAD-Domäne (like Sm and like Sm-associated-domain) beinhaltet. Innerhalb der LSm/LsmAD-Domäne ist eine potentielle Schnittstelle der Caspase-3 (AS 396-399), ein Clathrin-vermittelndes trans-Golgi-Signal (AS 414-416) sowie ein Endoplasmatisches Retikulum-Ausgangssignal (AS 426-428) vorhanden. In der C-terminalen Region des Proteins befindet sich das ebenfalls hoch konservierte PAM2-Motif (AS 908-925), welche ein PABC-Bindemotiv darstellt [45].

Anhand vorangegangener Analysen konnte gezeigt werden, dass die LSm-Domäne von ATXN2 Ähnlichkeiten zu anderen LSm-Proteinen aufweist. Wie diese, enthält auch die LSm-Domäne von ATXN2 die stark konservierten SM-Motive SM1 und SM2 [46]. Generell sind LSm-Proteine funktionell an der RNA-Modifikation, am Spleißen von prä-mRNAs, am Abbau von mRNAs sowie am Entfernen der 5'-Kappenstruktur (decapping) beteiligt und werden demzufolge der RNA-Modifizierung zugeordnet [47-48]. Zusätzlich konnte eine Interaktion mit A2BP1, dem ATXN2-Bindeprotein-1, beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um einen Spleißregulator, welcher das RNA-bindende RNP-Motiv besitzt und an der Bindung sowie dem Spleißen von prä-mRNAs beteiligt ist [49]. Zudem wird die Beteiligung von ATXN2 im RNA-Metabolismus durch die Interaktion mit dem PABP-Protein (Poly(A)-Bindeprotein) untermauert. Generell werden dem PABP-Protein funktionelle Rollen in der Translationsinitiierung, dem Spleißen von prä-mRNAs sowie der Deadenylierung

und dem Abbau von mRNAs zugeordnet [50-52]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Expression des ATXN2-Proteins zu einer erhöhten PABP-Konzentration führte [53]. Des Weiteren wurde eine Assoziierung mit einem weiteren Interaktionspartner, der RNA-Helikase DDX6 (*DEAD/H-Box RNA helicase 6*) beschrieben [53]. DDX6 ist eine Komponente von sogenannten Prozessierungskörperchen (P-bodies) [54]. Hierbei handelt es sich um zytoplasmatische Strukturen, welche der Anreicherung sowie dem 5'-3'-gerichteten Abbau nicht-translatierter mRNA mittels mRNA-Abbau-Proteinen dient [55-56]. Zudem ist DDX6 eine Komponente der sogenannten Stresskörperchen (SG).

Bei SGs handelt es sich um zytoplasmatische Strukturen, welche sich unter diversen Stressbedingungen wie Hitze, oxidativem sowie metabolischem Stress und UV-Strahlung bilden. Diese werden durch Stress-aktivierte Kinasen, welche spezifische Initiationsfaktoren der Translation phosphorylieren, und der damit ausbleibenden Bildung des ternären Komplexes induziert. Dadurch wird die Bildung von Polysomen durch Assoziierung von TIA-1 oder TIAR mit dem Initiationskomplex unterbunden. Bis heute ist die genaue Funktion der SGs noch nicht ganz verstanden. Aufgrund des SG-Bildungs-Mechanismus wird vermutet, dass sich diese aufgrund fehlerhafter Translationsinitiation bilden [57]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass ATXN2 ebenfalls eine Komponente von SGs darstellt. Zudem führte eine reduzierte ATXN2-Konzentration bei oxidativem Stress zur verminderten SG-Bildung, was ATXN2 eine mögliche Rolle in der Bildung von SGs zuordnet [53].

Andererseits wird vermutet, dass ATXN2 ebenfalls an der Endozytose und der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sein könnte. Vorangegangene Analysen ergaben, dass ATXN2 mit Endophilin-A1 und -A3 interagiert und dadurch das Zusammenspiel zwischen Endozytose und verschiedenen Signalwegen bzw. dem Aktin-Zytoskelett koordiniert [58-59]. Auch konnte eine Assoziierung zwischen ATXN2 und T- bzw. L-Plastin beobachtet werden, welche an der Bildung von Aktinfilamenten beteiligt sind. Untersuchungen mit dem Hefehomolog Fimbrin ergaben, dass eine transiente Expression von ATXN2 in Fimbrin-defizienten-Hefezellen toxisch ist und demzufolge zu einer Inhibierung des Hefe-Wachstums führte. Interessanterweise konnte mittels zusätzlicher Expression der humanen T- und L-Plastin-Proteine die beobachtete Toxizität aufgehoben werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von ATXN2 in humanen Zellen zu einem Proteinanstieg von T-Plastin führte [58, 60].

Des Weiteren ließ sich eine Assoziierung von ATXN2 und dem SCA1-krankheitsauslösendem Protein ATXN1 beobachten, welche bemerkenswerterweise bei Expression von pathogenem ATXN1 in den SCA1-spezifischen nukleären Proteineinlagerungen kolokalisierten [61]. Zusätzlich ergaben Analysen im SCA1-*Drosophila*-Modell, dass eine verminderte ATXN2-Konzentration die Toxizität in Zellen, welche pathogenes ATXN1 exprimieren, reduzierte. Demzufolge könnte ATXN2 als potentieller Modifizierungsfaktor in der Pathogenese von SCA1 beteiligt sein [62].

1.2.4 Biologische Funktionen von ATXN2-Homologen

Interessanterweise wurden ATXN2-Homologe in *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Mus musculus* beschrieben, welche eine starke evolutionäre Konservierung der Proteinstruktur aufweisen.

- **Pbp1: das ATXN2-Homolog in *Saccharomyces cerevisiae***

Das bisher am besten untersuchte Homolog stellt das Pab1-binding protein 1 (*pbp1/mrs16*) aus der Bäckerhefe dar. 1993 wurde das Protein Pbp1 in einem Suppressor-Screen mit dem $\Delta mrs2$ -Hefestamm identifiziert [46]. Das Genprodukt von *mrs2* ist an der Aufrechterhaltung der innermitochondrialen Magnesiumkonzentration sowie am Spleißen von mitochondrialen Introns der Gruppe II beteiligt. Hefen, welche kein *Mrs2* exprimieren, zeigen ein verändertes Wachstum auf Glycerol-Medium. Eine Überexpression von Pbp1 konnte die beobachtete Wachstumsveränderung in *mrs2*-defizienten Hefezellen teilweise aufheben [46].

Strukturell gesehen zeigte sich, dass Pbp1 im Vergleich zum humanen ATXN2 keine Polyglutamindomäne, jedoch die N-terminal lokalisierte LSm/LsmAD-Domäne besitzt, welche ebenfalls eine Beteiligung am RNA-Metabolismus vermuten lässt (siehe Abbildung 2). Demzufolge konnte mittels eines umfassenden Interaktions-Netzwerks von Pbp1 eine weitere funktionelle Verbindung zu Proteinen, die am RNA-Metabolismus beteiligt sind, hergestellt werden [51].

So konnte gezeigt werden, dass Pbp1 an den C-terminalen Bereich von Pab1, dem Poly(A)-Bindeprotein 1, bindet. Im Zuge der funktionellen Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass *pbp1*-defiziente Hefen 3'-mRNA-Enden aufweisen, welche

nicht korrekt polyadenyliert sind. Demzufolge wurde angenommen, dass Pbp1 eine funktionelle Rolle in der Polyadenylierung der prä-mRNA übernimmt [63].

Desweiteren interagiert Pbp1 mit der DEAD/H-box RNA-Helikase Dhh1, welche einen Bestandteil der Prozessierungskörperchen darstellt und demzufolge an der Entfernung der mRNA-assoziierten Kappen-Struktur, der Deadenylierung und dem anschließenden Abbau von mRNAs in Hefe involviert ist [64-65]. Interessanterweise ergaben Untersuchungen mit *Dhh1*-defizienten Hefen eine beeinträchtigte Bildung dieser Prozessierungskörperchen, welche wiederum in einem gestörten mRNA-Abbau resultierte [66]. Ebenso wie sein humanes Homolog ATXN2, ist Pbp1 eine Komponente von SGs in Hefe. So konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Dhh1, welches ebenfalls eine Komponente der SGs darstellt, zu einer Rekrutierung von Pbp1 und Pab-1 und entsprechend zur Bildung der SGs führt [67].

Außerdem konnte eine Assoziation zwischen Pbp1 und dem bisher funktionell kaum bekannten transkriptionellen Regulator Dig1/ Rst1 beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um einen Ko-Repressor, welcher im Zusammenhang mit Dig2/Rst2 für die Reprimierung des pheromoninduzierbaren Transkriptionsfaktors Ste12 verantwortlich ist. Kommt es zum sogenannten *mating*, werden Dig1 und Dig2 durch Fus3 phosphoryliert und dissoziieren vom *Ste12*-Promotor. Demzufolge kommt es zur Transkription von *Ste12*, welches anschließend wiederum an der Aktivierung *mating*-spezifischer Gene beteiligt ist [68].

- **Catx2: das ATXN2-Homolog in *Caenorhabditis elegans***

Ein weiteres Homolog von ATXN2 ist Catx2 aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Catx2 besitzt ebenfalls die N-terminale LSM/LsmAD-Domäne sowie das konservierte PAM2-Motiv (siehe Abbildung 2). Wie bereits das *S. cerevisiae*-Homolog zeigte, konnte in *C. elegans* ebenfalls eine Assoziation von Catx2 und Cpab1, dem Poly(A)-Bindepotein 1, beobachtet werden. Diese Beobachtung sowie der strukturelle Aufbau des ATXN2-Homologs führen zu der Annahme, dass Catx2 ebenfalls eine funktionelle Rolle im RNA-Metabolismus ausüben könnte. Des Weiteren konnte ein Einfluss der Catx2-Defizienz auf die embryonale Entwicklung beobachtet werden, welche in einer veränderten Entwicklung der Geschlechtszellen resultierte und folglich zu einer defekten postembryonalen Entwicklung der Keimbahnzellen führte [50, 69].

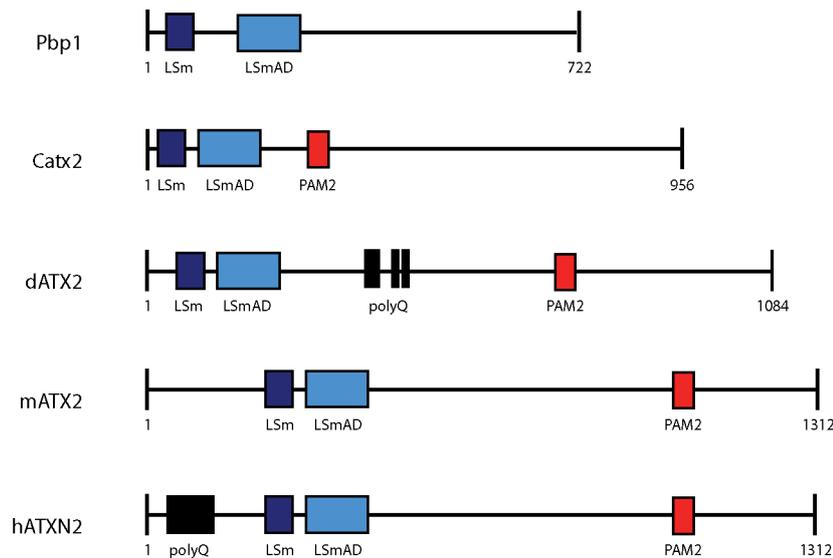


Abbildung 2: Schematische Darstellung der ATXN2-Homologe aus *Saccharomyces cerevisiae* (Pbp1), *Caenorhabditis elegans* (Catx2), *Drosophila melanogaster* (Datx2), *Mus musculus* (mATX2) und *Homo sapiens* (hATXN2). Der Polyglutaminbereich (PolyQ) ist in schwarz, die LSm- und LSmAD-Domänen in blau bzw. hellblau und das PAM2-Motiv in rot dargestellt. Zahlen geben die gesamte Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteine an.

- dATX2: das ATXN2-Homolog in *Drosophila melanogaster*

Das ATXN2-Homolog, dATX2, aus *Drosophila melanogaster* wurde im Jahr 2002 identifiziert. Interessanterweise besitzt dieses Protein neben der LSm/LsmAD-Domäne und dem PAM2-Motiv drei strukturell voneinander unabhängige Polyglutaminregionen (siehe Abbildung 2). Die biologische Funktion des ubiquitär exprimierten dATX2-Proteins ist bis heute noch nicht ganz verstanden. Bisherige Studien deuten auf eine Beteiligung an der Regulation der Aktinfilament-Bildung hin [70]. Es konnte gezeigt werden, dass funktionell inhibierende Mutationen sowie Überexpression von dATX2 in transgenen Fruchtfliegen zu Sterilität und anormaler Morphologie der Sinnesborsten führt. Außerdem konnte eine Degeneration verschiedener Gewebe sowie eine erhöhte Sterblichkeit der veränderten Organismen beobachtet werden [52, 70]. Da es zu keiner Assoziation zwischen dATX2 und den Aktinfilamenten kommt, wird vermutet, dass die Dysregulation der Aktinfilament-Bildung indirekt und somit womöglich über weitere, bisher unbekannte Interaktionspartner reguliert wird [70]. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass dATX2, mittels einer LSm/LsmAD-Domäne und PAM2-Motiv vermittelten Interaktion mit dPABP (Poly(A)-Bindeprotein) mit Polysomen assoziiert ist und demzufolge an der zellulären Translation beteiligt sein könnte [52].

- **mATX2: das ATXN2-Homolog in *Mus musculus***

mATX2, das ATXN2-Homolog der Maus, besitzt ebenfalls die LSm/LsmAD-Domäne sowie das C-terminale PAM2-Motiv. Entsprechend dem Homolog aus *S. cerevisiae* und *C. elegans*, besitzt mATX2 keine Polyglutaminregion (siehe Abbildung 2). Interessanterweise konnte eine >90 %-ige Übereinstimmung zwischen der Aminosäuresequenz von mATX2 und der des humanen ATXN2 beobachtet werden. Wie bereits zuvor erwähnt, wurde zur funktionellen Charakterisierung des ATXN2-Homologs in der Maus eine homozygote SCA2^{-/-}-Maus generiert, welche weder einen Abbau von neuronalem Gewebe noch histologische Anomalitäten aufwies [42].

1.3 Dysregulierte Stoffwechselwege in der Pathogenese von SCA2 und weiteren Polyglutaminerkrankungen

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Expression der krankheitsauslösenden Polyglutaminproteine eine Vielzahl an Stoffwechselwegen beeinträchtigt wird, und diese demzufolge eine Rolle in der jeweiligen Pathogenese spielen könnten. Auf diese Prozesse soll im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden.

- **Fehlfaltung und Aggregation mutierter Polyglutaminproteine**

Wie bereits erwähnt stellt ein Hauptmerkmal der Polyglutaminerkrankungen die Bildung nukleärer und zytoplasmatischer Akkumulierungen von Polyglutaminproteinen dar [3]. Welche Funktion die Aggregate in der Pathogenese der jeweiligen Krankheiten übernehmen, ist bis heute noch nicht ganz geklärt. Bis *dato* wird diskutiert, ob die Toxizität durch die Aggregate oder womöglich durch die vorab gebildeten intermediären oligomeren Strukturen hervorgerufen wird [7].

So schreiben einige Studien den krankheitsspezifischen Aggregaten eine schützende Funktion innerhalb der Zelle zu, da vermehrt eine Diskrepanz zwischen neuronaler Apoptose und Proteineinlagerungen beobachtet werden konnte [71]. Dementsprechend konnte in Neuroblastoma-Zelllinien, welche mutiertes Huntingtin-Protein exprimierten, Apoptose nachgewiesen werden, welche nicht mit der Bildung von Huntingtin-spezifischen Aggregaten korrelierte [72-73]. Diese Beobachtungen konnten durch Studien mit HD-transgenen Mäusen gefestigt werden, welche trotz vermehrter Aggregatbildung kaum Apoptose aufwiesen [74-75]. Im Fall von SCA3 ließen sich

nukleäre, zytoplasmatische wie auch mitochondriale Lokalisierungen des pathogenen ATXN3-Proteins nachweisen, was demzufolge die Frage, welches Kompartiment für die Pathogenese ausschlaggebend ist, unbeantwortet lässt [7].

Andere Beobachtungen hingegen lassen wiederum einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Aggregation und der einhergehenden Neurodegeneration vermuten [76-77]. So konnte zum Beispiel bei der Erkrankung SBMA die Bildung nukleärer Proteineinlagerungen des mutierten Androgen-Rezeptors ausschließlich in den betroffenen Neuronen des Rückenmarks und des Hirnstamms nachgewiesen werden [78].

Interessanterweise lässt sich nur eine geringe Korrelation zwischen der Pathogenese von SCA2 und der Bildung von Polyglutaminproteinaggregaten vermuten, da diese nur selten vereinzelt als zytoplasmatische Mikroaggregate vorwiegend in den Neuronen des Pons beobachtet werden [79]. Des Weiteren konnte in postmortalen Gehirnschnitten sowie in Mäusen gezeigt werden, dass eine zytoplasmatische Akkumulation oder eine Bildung zytoplasmatischer Mikroaggregate von pathogenem ATXN2 in der SCA2-Pathogenese resultieren [43, 80]. Zur weiteren Klärung der potentiellen Formierung pathogener ATXN2-Akkumulierungen wurden Untersuchungen in SCA2-transgenen Mäusen durchgeführt. Einer der transgenen SCA2-Mausstämme exprimiert unter dem für Purkinje-Zellen spezifischen Promotor die pathogene Form des humanen ATXN2-Proteins mit 58 Glutaminen. Fehlfunktionen in den Purkinje-Zellen sowie morphologischen Änderungen konnten beobachtet werden, welche allerdings weder in nukleären noch in zytoplasmatischen Proteineinlagerungen resultierten [80]. Eine weiteres Mausmodell, welches humanes ATXN2 mit 75 Glutaminwiederholungen unter dem endogenen SCA2-Promotor exprimiert, führte zur spezifischen Degeneration der Purkinje-Zellen sowie zu einer erhöhten Expression von pathogenem ATXN2-Protein in Gehirn, Leber und der Skelettmuskulatur [81]. Des Weiteren zeigten Zellkulturexperimente in PC12- und COS-1-Zellen durch transiente Expression der ATXN2-Fusionsproteine mit 58 bzw. 104 Glutaminen eine beeinträchtigte Assoziierung von ATXN2 und dem Golgi-System, welche unter physiologischen Bedingungen stattfindet [82].

- **Das Ubiquitin-Proteasom-System**

Erste Hinweise deuten darauf hin, dass eine veränderte Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) bei Polyglutaminerkrankungen auftritt.

So konnte zum Beispiel eine Ko-Lokalisierung zwischen dem Proteasom und den Polyglutaminproteinen ATXN1, ATXN3, ATXN7 sowie dem Androgen-Rezeptor beobachtet werden [3, 83-86]. Darüber hinaus konnten in Gewebeproben von SCA17-Patienten ubiquitinierte TBP-Proteineinlagerungen beobachtet werden, welche den Abbau der mutierten Proteine durch das UPS vermuten lassen [87]. Ebenso wird diskutiert, ob expandierte Polyglutaminproteine zu einer Blockierung des UPS führen und somit den Zugang von funktionell inaktiven Proteinen zum Proteasom verhindern, was wiederum in der zellulären Dysregulation resultieren könnte [88].

Auch konnte ein Zusammenhang zwischen pathogenem ATXN2 und dem UPS beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass Parkin, eine Komponente des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, mit der N-terminalen Region von normalem sowie pathogenem ATXN2 interagiert und beide Formen des Proteins ubiquitiniert [89]. Des Weiteren konnte eine Assoziierung von Parkin und pathogenem ATXN2 in zytoplasmatischen Proteineinlagerungen in Purkinje-Zellen von SCA2-Patienten beobachtet werden [89]. Dies führt zu der Annahme, dass ein beeinträchtigt UPS an der Pathogenese von SCA2 mitwirken könnte.

- **Einfluss von Chaperone auf mutierte Polyglutaminproteine**

Neben dem UPS scheinen auch Chaperone bei der Pathogenese von Polyglutaminerkrankungen eine entscheidende Rolle zu spielen.

So konnten Bercovich *et al.* zeigen, dass sowohl Hsp70 als auch das Ko-Chaperon Hsp40 an der Beseitigung fehlgefalteter Proteine durch das UPS beteiligt sind [90]. Im Bezug auf die Polyglutaminerkrankungen ergaben Untersuchungen mit SCA1- und SCA3-postmortalen Hirngewebeschnitten eine Ko-Lokalisierung von Hsp70, Hsp40 mit den krankheitsspezifischen Proteineinlagerungen. Diese Assoziierung konnte ebenfalls in Gehirnen von SCA1- und SCA7-transgenen Mäusen beobachtet werden [3, 86, 91-92].

Im Vergleich dazu führte eine Ko-Expression von Huntingtin, ATXN3 oder dem Androgen-Rezeptor mit Hsp40 und/oder Hsp70 zu einer reduzierten Bildung von Proteineinlagerungen [85, 93-96]. Entsprechend zeigten SCA1-transgene Mäuse, welche einen erhöhten Hsp70-Expressionslevel aufwiesen, eine verbesserte Motorik sowie eine Reduzierung der Neurodegeneration [97].

Interessanterweise konnte ein weiteres Protein identifiziert werden, welches einen Zusammenhang zwischen der funktionellen Beeinflussung der Chaperone und eines beeinträchtigten UPS in Polyglutaminerkrankungen vermuten lässt. Hierbei handelt es sich um das sogenannte CHIP-Protein (*C-terminus of Hsp70-interacting protein*) welches zum einen mit den Chaperonen Hsp70 und Hsp40 interagiert und zum anderen mit einer Untereinheit des Proteasomes assoziiert ist. *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen ergaben, dass CHIP an der Reduzierung sowie der Beseitigung pathogener Polyglutaminprotein-Einlagerungen beteiligt ist und demzufolge zur Reduzierung der Toxizität in Polyglutaminerkrankungen beitragen könnte [7].

Obwohl andere Polyglutaminerkrankungen einen Bezug zur beeinträchtigten Aktivität der Chaperone aufweisen, wurde für SCA2 bisher kein potentieller Einfluss auf diese beschrieben.

- Apoptose

Wie bereits erwähnt führen neurodegenerative Erkrankungen zum Verlust von neuronalem Gewebe, welcher durch Apoptose ausgelöst werden kann. Die Expression von mutierten Polyglutaminproteinen in den jeweiligen Erkrankungen kann durch unterschiedliche und komplexe Mechanismen zum programmierten Zelltod führen [7].

Im Fall von HD konnten Studien mit humanen Zellen, welche mutiertes Huntingtin exprimieren, eine mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und demzufolge eine Aktivierung der Caspasekaskade zeigen, welche in der Induzierung von Apoptose resultierte [98-99]. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass HD-transgene Mäuse eine erhöhte Aktivität der Caspase-1 und Caspase-3 aufwiesen. Wurden diese mit Minozyklin behandelt, was zur Inhibierung der Caspasenaktivität führt, konnte ein verzögertes Auftreten der Symptome sowie eine längere Lebensspanne der Mäuse beobachtet werden [7].

Expressionsanalysen von Primärneuronen des Zerebellums und des Neocortex, welche pathogenes ATXN7 exprimierten, sowie Untersuchungen mit pathogenem ATXN3 zeigten eine erhöhte Regulierung des pro-apoptischen Gens *Bax*. Diese resultierte in einer geringeren Konzentration von *Bcl-xL*, was wiederum zur Freisetzung und Aktivierung weiterer apoptotischer Proteine und somit zum programmierten Zelltod führte [100-102]. Eine erhöhte Konzentration des pro-apoptischen Proteins *Bax* konnte auch im Zusammenhang zwischen neuronaler Apoptose und der Erkrankung

SBMA beobachtet werden. So führte die transiente Expression eines expandierten N-terminalen-Fragments des Androgen-Rezeptors zur Aktivierung der cJun-Kinase, welche in einer Hochregulierung von Bax und somit in der Apoptose resultierte [103].

Interessanterweise konnte ebenfalls eine Verbindung zwischen Apoptose und dem SCA2-Genprodukt beobachtet werden. So ergaben Analysen mit Wildtyp- und mutiertem ATXN2 in Neuroblastomazellen, dass eine Überexpression des Wildtyp-Proteins zum programmierten Zelltod führte. Eine Expression der pathogenen Form des Proteins resultierte nicht in dieser Beobachtung [104]. Dagegen führte eine transiente Expression von expandiertem ATXN2 in PC12- und COS-7-Zellen zur Aktivierung der Caspase-3 und resultierte dementsprechend im programmierten Zelltod [82].

- mRNA-Metabolismus

Zudem konnte in einigen Erkrankungen auch ein Einfluss auf den mRNA-Metabolismus beobachtet werden, welcher interessanterweise meistens im Zusammenhang mit ATXN2 beschrieben wurde.

Interessanterweise wird ATXN1 eine Rolle am nukleären Export von mRNAs zugeschrieben. Weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass der Kernexport dieser mRNAs aufgrund der nukleären ATXN1-Inklusionskörperchen in der Pathogenese von SCA1 unterbunden sein könnte. Außerdem konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ATXN1 an RNA bindet [18, 20]. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass eine ATXN2-Defizienz in einer Abnahme der SCA1-Toxizität resultiert. Dies lässt vermuten, dass ATXN2 eine modulierende Funktion in der SCA1-Pathogenese übernehmen könnte [62]. Entsprechend ließ sich eine PABP-abhängige modulierende Funktion von dATX2 auf die Toxizität im SCA3-*Drosophila*-Modell beobachten. So konnte gezeigt werden, dass eine PABP-Defizienz zu einer steigenden ATXN2-Konzentration führte und diese wiederum in einer erhöhten Toxizität resultierte [1]. Interessanterweise konnte auch in humanen Zellen ein Einfluss von ATXN2 auf die zelluläre Konzentration von PABP beobachtet werden. Dementsprechend führte eine ATXN2-Defizienz zu einer steigenden PABP-Konzentration und eine erhöhte Expression von ATXN2 zu einem verminderten PABP-Level. Zusätzlich konnte auch eine Beeinträchtigung in der Bildung von Prozessierungskörperchen durch eine erhöhte ATXN2-Konzentration beobachten [53].

- **Transkriptionelle Dysregulation**

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die krankheitsauslösenden Polyglutaminproteine unter anderem auch mit transkriptionellen Regulatoren assoziieren.

Bemerkenswerterweise konnte eine direkte Bindung von mutiertem Huntingtin an DNA mittels *in vitro*- und *in vivo*-Studien gezeigt werden. Diese führten zu einer Konformationsänderung der DNA und somit zu einer veränderten Bindung der Transkriptionsfaktoren, was wiederum in einem modifizierten mRNA-Expressionsmuster und einer daraus resultierenden veränderte Genexpression führte [105].

Zudem konnte gezeigt werden, dass in kortikalen Neuronen ein erhöhter Level an BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), einem neuronalen Wachstumsfaktor, welcher für den Fortbestand von Neuronen im Striatum notwendig ist, mittels transienter Expression des Wildtyp-Huntingtin-Proteins induzierbar war [106]. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die dafür notwendige Interaktion mit dem Repressorkomplex RE1/NRSE (*repressor element 1/neuron restrictive silencer element*) durch die Expression von mutiertem Huntingtin abgeschwächt wurde, was wiederum in einer nukleären Anreicherung des RE1/NRSE Komplex und schlussendlich in der transkriptionellen Repression von BDNF resultierte [107].

Im Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen Huntingtin und dem nukleären Faktor Y (NF-Y) beobachtet werden. Ursprünglich konnte gezeigt werden, dass NF-Y an der transkriptionellen Regulierung von Hsp70 beteiligt ist. Interessanterweise führt die Expression von mutiertem Huntingtin zu einem geringeren Hsp70-Level, welcher mit einer vermehrten Bildung von Polyglutaminprotein-Einlagerungen korrelierte. Eine Assoziierung zwischen Huntingtin-Aggregaten und NF-Y konnte auch im HD-Mausmodell beobachtet werden [108-111].

Ferner wurde eine Assoziierung von Huntingtin mit p53 beobachtet, welche durch die Expression einer verlängerten Polyglutaminregion beeinflusst wird. Es zeigte sich, dass Zellkulturexperimente, *in vivo*-Modelle bzw. postmortalen Hirnproben von HD-Patienten einen erhöhten p53-Level aufwiesen. Dieser deutet auf eine erhöhte transkriptionelle Aktivität des *p53*-Gens hin und lässt somit eine Korrelation zwischen der expandierten Polyglutaminregion im Huntingtin-Protein und der zunehmenden transkriptionellen Aktivität vermuten. Interessanterweise führte eine p53-Defizienz im

Drosophila melanogaster-HD-Modell zu einer verminderten Neurodegeneration [112-113].

In weiteren Untersuchungen konnte eine Interaktion von Huntingtin und dem Transkriptionsfaktor SP1 (*specificity protein 1*) beobachtet werden. SP1, welcher ebenfalls eine polyglutaminreiche Region besitzt, ist an der Regulierung sowie am Zusammenspiel des transkriptionellen Apparates des Transkriptionsfaktors II D (TFIID) beteiligt. Dieser Komplex besteht aus TBP, dem SCA17-krankheitsauslösenden Protein, und zahlreichen TBP-assoziierten Faktoren, welche als TAF_{II}s bezeichnet werden. Interessanterweise kann mit zunehmender Länge der N-terminalen Polyglutaminregion im Huntingtin-Protein eine abgeschwächte Assoziierung mit SP1 beobachtet werden [114-115]. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die daraus resultierende verminderte Aktivität von SP1 zu einem reduzierten Dopamine D₂- bzw. einem reduzierten Level des Neuronenwachstumsfaktors (NGF) führte [114]. Im Vergleich dazu konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von SP1 und TAF_{II}130, einem TBP-assoziiierendem Faktor, zum Wiedererwerb der Dopamin D₂-Rezeptoraktivität führte [116].

Weiterführend konnte TAF_{II}130 selbst als direkter Interaktionspartner von mutiertem Huntingtin identifiziert werden. Zudem ergaben mikroskopische Analysen auch eine Ko-Lokalisierung von TAF_{II}130 und ATXN3 bzw. Atrophin-1 [14, 114].

Auch der Transkriptionsfaktor CREB sowie sein Ko-Aktivator, das CREB-Bindeprotein (CEB) sind, in Assoziation mit pathogenen Formen von Polyglutaminproteinen, ebenfalls an der Reprimierung von Genen beteiligt [113]. Unter physiologischen Bedingungen ist CBP an der Ko-Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren beteiligt. Anhand seiner Histoneacetyltransferase-Aktivität ermöglicht es dem jeweiligen Transkriptionsfaktor, sein spezifisches DNA-Bindemotiv zu binden [7]. Zudem scheint CBP auch eine wichtige Rolle in den Signalwegen innerhalb von Neuronen zu übernehmen. Nucifora *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von mutiertem Huntingtin bzw. mutiertem Atrophin-1 zu einer Anreicherung von CBP in den jeweiligen pathogenen Aggregaten führte [117]. Da sich eine solche Beobachtung ebenfalls in den Polyglutaminerkrankungen SBMA, SCA3 und SCA7 bestätigen ließ, wird vermutet, dass eine veränderte Genexpression durch eine beeinträchtigte Interaktion von CREB und seinem Ko-Aktivator CBP ein potentieller gemeinsamer

Mechanismus in der Neurodegeneration von Polyglutaminerkrankungen sein könnte [21, 118-119].

Analysen mit dem SCA1-krankheitsauslösenden Protein ATXN1 zeigten eine Ko-Lokalisierung mit dem vorwiegend in Purkinje-Zellen exprimierten Transkriptionsfaktor LANP32 (*leucine-rich repeat acidic nuclear protein 32*). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen ATXN1 und LANP32 durch die Expression einer expandierten Polyglutamindomäne beeinflusst wird [16]. Unter normalen zellulären Bedingungen ist LANP32 an der Aktivierung der Phosphatase-2 beteiligt. Interessanterweise resultierte die Expression von mutiertem ATXN1 in einer stärkeren Assoziierung mit LANP32 und führte zu einer dysregulierten Phosphatase-2-Expression, welche potentiell an der Pathogenese von SCA1 beteiligt sein könnte [17].

Ebenso wie HD und SCA1 konnte auch SCA7 mit transkriptioneller Dysregulation in Verbindung gebracht werden. Wie bereits zuvor erwähnt bildet ATXN7 eine Untereinheit des transkriptionellen TFTC/STAGA-Komplex, welcher mit dem Photorezeptor-spezifischen Transkriptionsaktivator Crx (*cone-rod homeobox*) interagiert [13, 120-121]. Anhand der Expression von pathogenem ATXN7 kommt es zur Freisetzung von Crx, welche zur Reprimierung der Acetyltransferaseaktivität des TFTC/STAGA-Komplex führt. Die daraus resultierende Abnahme der transkriptionellen Regulierung von TFTC/STAGA-Komplex-spezifischen Zielgenen, führte zur retinalen Degeneration, welche in der Pathogenese von SCA7 beschrieben wurde [120-121].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die physiologische Funktion des ATXN2-Proteins sowie dessen veränderte Funktionalität in der Pathogenese von SCA2 sind bis heute nicht ganz verstanden. Interessanterweise konnte in postmortalen Gehirnproben von SCA2-Patienten ein erhöhter Level des pathogenen ATXN2-Proteins beobachtet werden, welcher einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten ATXN2-Konzentration und dem Krankheitsverlauf vermuten lässt. Erste Yeast-two-Hybrid(Y2H)-Analysen in der Arbeitsgruppe ergaben eine potentielle Interaktion von ATXN2 und dem transkriptionellen Regulator ZBRK1, welcher mittels Ko-Repressoren an der Reprimierung von Genen beteiligt ist.

Daher war das Ziel dieser Arbeit eine putative Interaktion von ATXN2 und dem transkriptionellen Regulator ZBRK1 mittels Y2H- und Ko-Immunopräzipitations-Analysen sowie mikroskopischen Ko-Lokalisierungsstudien zu untersuchen. Da ZBRK1 an DNA bindet und folglich an der Regulierung von Genen beteiligt ist, sollte mittels Überexpressionsstudien und RNA-Interferenz ein funktionelles Zusammenspiel von ZBRK1 und ATXN2 analysiert werden. Zusätzlich sollte dieses mittels Generierung eines Intrabodys mit interferierenden Eigenschaften für die Interaktion zwischen ZBRK1 und ATXN2 tiefgreifend analysiert werden. Aufgrund korrelierender Expressionslevel des ZBRK1- und ATXN2-Proteins sollte der SCA2-Promotor anhand bioinformatischer Analysen bezüglich putativer ZBRK1-Bindestellen untersucht und diese anschließend mittels Chromatin-Immunpräzipitations(ChIP)-Experimenten und Promotoranalysen charakterisiert werden.

Zur weitergehenden Validierung der biologischen Signifikanz der ZBRK1/ATXN2-Interaktion sollten weitere Kandidatengene identifiziert werden. Mittels ChIP- und Promotoranalysen sowie RNA-Interferenz sollte eines der resultierenden Gene regulatorisch untersucht werden. Da eine expandierte Polyglutaminregion im ATXN2-Protein zur SCA2-Pathogenese führt, sollte abschließend der Einfluss von pathogenem ATXN2 auf die Funktionalität der ZBRK1/ATXN2-Interaktion untersucht werden und bezüglich der Regulierung der zuvor untersuchten Gene weitergehend charakterisiert werden. Daher könnten diese Untersuchungen einer beeinträchtigten transkriptionellen Regulation durch ZBRK1 und ATXN2 zu einem tieferen Verständnis des Pathomechanismus von SCA2 beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Hersteller
Zellkulturplatten	Biochrom
96-Kammer-Mikrotiterplatten	Biochrom
384-Kammer-Platte für qPCR	Applied Biosystems
Agarosegelkammer und Kämme	MPI-Werkstatt
Analysenwaage AT 250	Mettler
Bioruptor	Diagenode
Blotapparatur (<i>semi-dry</i>)	Peqlab
Deckgläschen (Ø 12/ 18 mm)	Roth
elektronische Mehrschritt-Pipetten	Eppendorf
Faltenfilter	Schleicher & Schuell
Fotofilme Hyperfilm ECL	Amersham
Fotofilm-Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Fotokassette	Fujifilm oder Mersham Life Science
Geldokumentationssystem AlphaImager	Alpha Innotech
Gelkammer und Einsätze Protean II	Bio-Rad
Gelkämme	Bio-Rad
Glasplatten	MPI-Werkstatt
Heizblock	Eppendorf
Horizontale Gelkammer	MPI-Werkstatt
Immersionsöl	Zeiss
Klebefolien Microamp (für qPCR)	Applied Biosystems
Kunststoffküvetten	Roth
Kryoröhrchen	Nalgene
LSM 510 Meta (mit Axiovert 200M)	Zeiss
LSM700	Zeiss
Magnetrührer	IKA-Combimag-REO
Magnetständer DynaMag	Dynal
Membranvakuumpumpe	Vacuubrand
Nano Drop® ND-1000 UV-Spektrometer	Nano Drop Technologies
Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad
Nitrozellulosemembran Protran®	Perkin Elmer
Nitrozellulosemembran Hybond, ECL	GE Healthcare

NuPAGE Novex (4 – 12 %)	Invitrogen
Objektträger	Roth
Parafilm®	American National Can Company
Pasteurpipetten	Brand
PCR-Maschinen PTC-100, PTC-225	MJ Research
Petrischalen	Greiner
Photometer Ultraspec 3000	Amersham
Pipetten	Gilson
PräzisionswaagePM 3000	Mettler
Replikator 96-Spitzen	Nalgen Nunc
Speedvac SC110	Savant
ABI-Prism 7900 HT	Applied Biosystems
Schüttelinkubatoren Innova 44, 4330	New Brunswick Scientific
Skalpelle	Brand
sterile Glaskugeln	MPI-Werkstatt
sterile Pipetten (10 ml, 25 ml) - sterile	Corning Inc./ Sarstedt
Impfösen	Nunc
Qubit – Fluorometer	Invitrogen
Tankblott - Apparatur	Hoefler
Tiefkühler -20 °C	Bosch
Tiefkühler -80 °C	Forma Scientific
Tischzentrifugen 5424, 5810R, 5417C	Eppendorf
UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab
Vortexer Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG
Wasserbad	Memmert
Wipptisch Rocky® RT-1S	Fröbel Labortechnik
Whatman-Filterpapier 3mm	Whatman
Y2H-Schalen OmniTray	Nunc
Zellkulturflaschen (T75)	Biochrom/ Sarstedt
Zellkulturinkubatoren	Heraeus/ New Brunswick Scientific
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter

2.12 Reagenzien

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Acrylamid/ Bisacrylamid Rotiphorese	Roth
Adenin	Sigma
Agarose UltraPure®	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ammoniumsulfat	Merck
Ampizillin	Sigma
Bakto-Agar	Becton, Dickson & Co
Bakto-Pepton	Difko
Bakto-Trypton	Becton, Dickson & Co
Benzonase	Merck
Betain	Fluka
Bradford Protein Assay	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
Coomassie Brilliant Blue	Sigma
Cycloheximid	Roth
DEPC-Wasser	Ambion
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen Gibco®
dNTPs 100 mM	Pharmacia
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	Invitrogen Gibco®
Entwickler- und Fixiererlösung für Fotofilme	Agfa
Essigsäure	Merck
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Fluoromount-G	SouthernBiotech
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
GeneElute™ - LPA	Sigma
D-Glukose-Monohydrat	Merck
Glyzin	Merck
Glyzerin	Merck
Hefeextrakt	Difko
HiPerfect® -Transfektionsreagenz	Qiagen
Heringsperma-DNA-Natriumsalz	Sigma

Histidin	Sigma
Hoechst 33258	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Lithiumazetat-Dihydrat	Sigma
Magermilchpulver	Uelzena
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol absolut	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natrium-meta-Arsenit	Merck
Paraformaldehyd (PFA) 16 %	Polysciences
Penizillin/ Streptomysin	Biochrom
p-Phenylendiamin (PDA)	Sigma
Polyethylenglykol 3350 g/mol	Sigma
Polyethylenglykol 8000 g/mol	Fluka
Polyethylenimid (PEI)-Transfektionsreagenz	Polysciences, Inc.
Puromycin	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
D-Sorbitol	Sigma
Tetramethylethylendiamin	Invitrogen
Tris-HCl	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma® Base)	Sigma
Triton X-100	Merck
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Roth
Urazil	Sigma
Western Blot-Nachweisreagenzien	Pierce
Western Blue®	Promega
Super Signal West Femto	Thermo Scientific
SYBR® Green	Applied Biosystems
Western Lightning	Perkin-Elmer
X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galaktosid)	Sigma
Xylenzanolblau	Roth
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Difko

2.1 3 Protein und DNA-Marker

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Grössen-Marker

Marker	Hersteller
DNA-Marker 1 kb	New England Biolabs
DNA-Marker 100 bp	New England Biolabs
Proteinmarker Page Ruler Prestained Plus	Fermentas

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Zusammensetzung einzelner Puffer und Lösungen, welche verwendet wurden

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
10x PBS, pH 7,4	1,37 M NaCl 27 mM KCl 80 mM Na ₂ HPO ₄ 18mM KH ₂ PO
50x TAE-Puffer, pH 8,0	50 mM Tris 25 mM Essigsäure 2,5 mM EDTA
TE-Puffer, pH 7,5	10 mM Tris 1 mM EDTA
5x Concentrated Enhancer Solution (CES)	2,7 M Betain 6,7 mM DTT 6,7 % (v/v) DMSO 5,5 µg/ ml BSA
10x Taq-Puffer, pH 8,8	650 mM Tris-HCl 166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 31 mM MgCl ₂ 0,1 % Tween 20
DNA-Ladepuffer	4 % (v/v) Glycerin 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylenzyanoblau

ChIP-Lysepuffer-1 (L1)	50 mM Hepes pH 7,6 140 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % Glycerol 0,5 % NP40 0,25 % Triton X-100
ChIP Lysepuffer-2 (L2)	10 mM Tris-HCl pH 8,0 200 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 10 mM Tris-HCl pH 7,4
ChIP Lysepuffer-3 (L3)	100 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 0,1 % Na-Deoxycholate 0,5 % N-lauroylsarcosine
ChIP-Waschpuffer	50 mM Hepes pH 7,6 500 mM LiCl 1 mM EDTA 1 % NP-40 0,7 % Na-Deoxycholate
ChIP-TE + NaCl	0,99 x 1x TE 50 mM NaCl
ChIP - Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA 1% SDS
Lysepuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1mM Tris-EDTA pH 8,0 1 % (v/ v) Triton X-100 1µl/ 10ml Benzonase 40 µl/ 1ml 50x Protease Inhibitor

Lysepuffer für Intrabody	50 mM Tris-HCl pH 8,8 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,5 % NP40 1 mM EDTA
5x Lämmli-puffer	250 mM Tris pH 6,8 10 % SDS 0,5 % Bromphenolblau 50 % (v/ v) Glycerin, 100 mM DTT)
Sammelpuffer, pH 6,8	125 mM Tris 01% SDS
4x Trennpuffer, pH 8,8	375 mM Tris 0,4 % SDS
10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1920 mM Glyzin 1% SDS
Coomassie-Färbelösung	2,4 % Brilliant Blue 60 % (v/ v) Methanol 12% (v/ v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	50 % (v/ v) Methanol 7% (v/ v) Essigsäure
10x Blotpuffer	480 mM Tris 400 mM Glyzin 0,37 % SDS
1x Blotpuffer	zusätzlich 20 % (v/ v) Methanol
Heringsperma-DNA	0,2 % DNA-Natriumsalz 0,5 mM EDTA

H - Puffer	100 mM Hepes pH 7,0 150 mM NaCl 2 mM MgCl ₂
Yeast-two-Hybrid-MIX 1	100 mM Lithiumacetat 1 M Sorbitol 0,5 x TE
Yeast-two-Hybrid-MIX 2	100 mM Lithiumacetat 40 % PEG 3350 1 x TE
X-Gal-Färbelösung	0,15 % (v/v) X-Gal 10 mM DTT in Z-Puffer
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 40 mM NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O 10 mM KCl 1mM MgSO ₄ * 7 H ₂ O

2.1.5 Verwendete Hefestämme und Hefe-Medien

Tabelle 6: Zusammensetzung von Bakterien- und Hefemedien

Medium	Zusammensetzung
LB (Luria Bertani)-Medium, pH 7,0	0,5 % NaCl 1% Bacto-Pepton 0,5 % Hefeextrakt
LB – Festmedium	zusätzlich 1,7 % Bacto-Agar
SD II-Medium	0,68 % Yeast Nitrogen Base 2 % Glucose-Monohydrat 0,02 % Histidin 0,02 % Adenin 0,02 % Uracil
SD III - Medium	0,68 % Yeast Nitrogen Base 2 % Glucose-Monohydrat 0,02 % Histidin 0,02 % Uracil

SD IV – Medium	0,68 % Yeast Nitrogen Base 2 % Glucose-Monohydrat 0,02 % Adenin
SD V-Medium	0,68 % Yeast Nitrogen Base 2 % Glucose-Monohydrat
SD II-, SD III-, SD IV- und SDV-Festmedium	zusätzlich 2 % Bacto-Agar
YPD-Medium	1 % Hefeextrakt 2 % Bacto-Trypton 2 % Glucose-Monohydrat

2.1.6 Verwendete Bakterienstämme und Hefestämme

Tabelle 7: Zusammenfassung der verwendeten Bakterienstämme

Mikroorganismen	Genotyp
Stratagene-XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq Z_M15 Tn10 (Tetr)]</i>
Stratagene-XL10-Gold	<i>Tetr Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]</i>
Invitrogen-DH5α	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>
Invitrogen-One Shot® OmniMAX™ 2 T1-Phagen-Resistent	<i>F' {proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR) Δ(ccdAB)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA pand</i>

Tabelle 8: Zusammenfassung der verwendeten Hefestämme

Hefestämme	Genotyp
L40ccuA	MATa <i>his3_200 trp1-901 leu2-3,112</i> <i>LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop) 8-lacZ</i> <i>ADE2::(lexAop)8-URA3 gal80 can1 cyh2</i>
L40ccuAade	MATa <i>his3Δ200 trp1-901 leu2-3, 112</i> <i>LYS2::(lexAop)4-HIS3 ura3::(lexAop)8-lacZ</i> <i>ade2::KanMX4-(lexAop)8-URA3 GAL4 gal80</i> <i>can1 cyh2</i>

2.1.7 Humane Zelllinien

Tabelle 9: Zusammenfassung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	ATCC® - Nummer
Hek293T	Niere	CRL-1573™
HeLa	Gebärmutterhals	CCL-2™
MCF-7	Brust	HTB-22™
U2OS	Knochen	HTB-96™

2.1.8 Antikörper

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung Western Blot	Verdünnung Mikroskopie	Hersteller
α ATXN2	Maus	1:2000	1:200	BD Bioscience
α ATXN2	Kaninchen	1:1000	1:200	Bethyl
α ATM	Kaninchen	1:5000	1:250	Abcam
α P-ATM/ ATR Substrate	Kaninchen	1:5000	1:250	Cell Signaling
α Flag	Kaninchen	1:5000	1:500	Sigma
α Flag-M2	Maus	1:5000	1:500	Sigma
α HA-Fluorescein		1:5000	1:10	Roche
α P-Ser139-H2AX	Kaninchen	1:1000	1:500	LP BIO
α cMyc	Kaninchen	1:5000	1:500	Sigma
α Myc	Maus	1:100	1:500	Millipore
α PML	Kaninchen	1:5000	1:10	Abcam
α Tubulin	Maus	1:1000	1:50	Sigma
α ZBRK1	Kaninchen	1:100	-	Sigma
α ZBRK1	Maus			gift f. Wen-Hwa Lee

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Verdünnung	Hersteller
		Western Blot	Mikroskopie	
α Rabbit-POD	Ziege	1:10.000	-	Sigma
α Maus-POD	Ziege	1:10.000	-	Sigma
α Rabbit-AP	Ziege	1:10.000	-	Dianova
α Maus-AP	Ziege	1:10.000	-	Dianova
Alexa488- α Maus	Ziege	-	1:500	Molecular Probes
Alexa568- α Kaninchen	Ziege	-	1:500	Molecular Probes
Alexa532- α Maus	Ziege	-	1:500	Molecular Probes
Fitc- α Kaninchen	Ziege	-	1:500	Dianova
Fitc- α Maus	Ziege	-	1:500	Dianova
Cy3- α Kaninchen	Ziege	-	1:500	Dianova
Cy3- α Maus	Ziege	-	1:500	Dianova

2.1.9 Oligonukleotide

Tabelle 12: Oligonukleotide welche für PCR-Reaktionen eingesetzt wurden

Primer	Sequenz
ZBRK1-s-Sal1	5' GAGTCGACAATGATCCAGGCCAGGAATCCATAACAC 3'
ZBRK1-as-Not1	5' TATAGCGGCCGCCTATGGGTTTTCTGTAACATAAAAATA 3'
pGL3-ATXN2-FW	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGGGTTTTGCAATGGTCCCTTGATCT 3'
pGL3-ATXN2-RV	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACCCGGATCCGCCTTCCTCAAG 3'
pGL3-ATXN2-Exon1-FW	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTTGCAATGGTCCCTTGATCTACTTTT
pGL3-ATXN2-Exon1-RV	3'
pGL3-ATM+UTR-FW	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTGGGAGCGGAGGTGCGGATAG 3'
pGL3-ATM+UTR-RV	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAAACCACAGCAGGAACCAC 3'
	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGCCCTACCACTGCACTCGGAA 3'

Tabelle 13: Oligonukleotide welche für qPCR-Analysen eingesetzt wurden

Primer	Sequenz
qPCR-ActB-FW	5' TCAAGATCATTGCTCCTCT 3'
qPCR-ActB-RV	5' ACATCTGCTGGAAGGTGGACA 3'
qPCR-B2M-FW	5' ACTGAATTCACCCCACTGA 3'
qPCR-B2M-RV	5' CCTCCATGATGCTGCTCCTCT 3'
qPCR-HPRT-FW	5' AGGAAAAGCAAAGTCTGCATTGTT 3'
qPCR-HPRT-RV	5' GGTGGAGATGATCTCTCAACTTTAA 3'
qPCR-ZBRK1-FW	5' CTGACCACRGGCTGTCCAC 3'
qPCR-ZBRK1-RV	5' AACTCTGCTAACGGGGCGAC 3'
qPCR-ATXN2-FW	5' GGCCTCCAAGGATGTCCCAA 3'
qPCR-ATXN2-RV	5' CCACTGGATATGGAACCCCTG 3'
qPCR-ATM-FW	5' TTCAGGGGATTTGGATCCTGC 3'
qPCR-ATM-RV	5' GCTGATATAGGCAAATGTTGC 3'

Tabelle 14: Oligonukleotide, welche für Chromatin-Immunopräzipitationsanalysen eingesetzt wurden

Primer	Sequenz
qPCR-ChIP-PromotorATXN2-ZBS1+2-FW	5' GGATCCGCCTTCCTCAAG 3'
qPCR-ChIP-PromotorATXN2-ZBS1+2-RV	5' CGCAGAAGTGAAGATGCTGA 3'
qPCR-ChIP-PromotorATXN2-ZBS3-FW	5' GCGGAGAATGTGTCTTGCTA 3'
qPCR-ChIP-PromotorATXN2-ZBS3-RV	5' ACTGGAGCGCCTACTGTGTG 3'
qPCR-ChIP-PromotorATXN2-ZBS4-FW	5' GCCACCCGGGCCACCT 3'
qPCR-ChIP-PromotorATXN2-ZBS4-RV	5' CGGAGGTGCGGATAGG 3'
qPCR-ChIP-PromotorATM-ZBS1-FW	5' TTAAAGCAAACACAGCGACAG 3'
qPCR-ChIP-PromotorATM-ZBS1-RV	5' CTGCCGTGAAGCGAAAGAG 3'
qPCR-ChIP-PromotorATM-ZBS2-FW	5' GTTCGCCTTCGGAAGTGC 3'
qPCR-ChIP-PromotorATM-ZBS2-RV	5' GCTCTCACCCACCTCTTC 3'

2.1.10 Plasmide

Yeast-two-Hybrid-Plasmide

Die für die Yeast-two-Hybrid-Analysen verwendeten Hefe-Expressionskonstrukte wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Sylvia Krobitsch hergestellt. Die entsprechenden kodierenden Regionen wurden in die Vektoren pACT-4-1b (*prey*-Vektor) oder pBTM-117c (*bait*-Vektor), welche von Prof. Dr. Erich Wancker (MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt wurden, kloniert. Beide Vektoren besitzen das Ampicilin-Resistenzgen.

Der Vektor pACT4-1b besitzt einen Alkoholdehydrogenase (ADH)-Promotor sowie eine Gal4-Aktivierungsdomäne (AD). Zusätzlich beinhaltet dieser das Reportergen *Leu2*, welcher als Auxotrophiemarker dient. Der Vektor pBTM-117c enthält ebenfalls einen ADH-Promotor sowie eine LexA-Bindedomäne. Als Auxotrophiemarker fungiert das *trp1*-Gen, welches zur Tryptophansynthese dient.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Y2H-Plasmide verwendet:

- **Ataxin-2**

(a) pBTM-ATXN2-Q22₁₋₃₉₆ und pBTM-ATXN2-Q79₁₋₃₉₆, welche jeweils die N-terminale Polyglutamindomäne mit 22- oder 79-CAG-Wiederholungen sowie eine Teilregion der LSM-Domäne beinhalten, (b) pBTM-ATXN2₂₅₄₋₄₇₅, welches die LSM/LSMAD-Domäne exprimiert, (c) pBTM-ATXN2₄₈₁₋₈₁₅, welches die zentrale Region des ATXN2-Proteins besitzt, sowie (d) pBTM-ATXN2₈₁₆₋₁₃₁₂, welches den C-terminalen-Bereich mit dem PAM2-Motiv beinhaltet.

- **Huntingtin-Exon1**

pBTM-HD-Q25, pBTM-HD-Q45 und pBTM-HD-Q72, welche die Polyglutamindomäne des ersten Exons mit 25-, 45- bzw. 72 CAG-Wiederholungen beinhaltet.

- **Ataxin-3 Protein**

pBTM-ATXN3, welches die kodierende Region des Ataxin-3-Proteins exprimiert.

- **ZBRK1-Protein**

pACT4-1b-ZBRK1-CT, welches den C-terminalen Bereich inklusive der CTRD-Domäne von ZBRK1 beinhaltet.

Säugereexpressionsplasmide

Die Säugereexpressionsplasmide pCMV-MYC und pCMV-HA wurden von Dr. Marie-Laure Yaspo (MPIMG, Berlin) zur Verfügung gestellt. Zur Selektion weisen beide Vektoren das Resistenzgen Ampicilin auf. Die im jeweiligen Vektor enthaltene kodierende Gen-Regionen wird mit einer N-terminalen MYC- bzw. HA-Region versehen und unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert. Die Säugereexpressionsplasmide pCMV-MYC-ATXN2Q22 und pCMV-MYC-ATXN2Q79, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten wurden, wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Sylvia Krobtsch hergestellt und exprimieren jeweils die kodierende Region des SCA2-Gens, mit entweder 22 oder 79 CAG-Wiederholungen.

Zur Generierung des Plasmids pCMV-MYC-ZBRK1 diente das Plasmid pOTB7-ZBRK1 (IRAUp969A0148D/RZPD, Berlin) als Template. Das vollständige offene Leseraster des *ZBRK1*-Gens wurde mit den Primern ZBRK1-s-Sal1 und ZBRK1-as-Not1 mittels PCR (siehe 2.1.9) amplifiziert und anschließend mit Hilfe der Schnittstellen Sal1, Not1 in den pCMV-MYC-Vektor ligiert (siehe 2.2.7). Die Herstellung des Plasmids pCMV-HA-ZBRK1 erfolgte durch Umklonierung mittels der Restriktionsenzyme *Sal1/Not1*.

Das Säugereexpressionsplasmid pTL-FLAG wurde von Prof. Erich Wancker (MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt. Es enthält das Ampicillin-Resistenzgen, welches der Selektion dient. Zudem beinhaltet es einen SV40-Promotor zur *in vivo*- sowie einen T7-Promotor zur *in vitro* Expression. Die zu kodierende Sequenz, welche mittels der multiplen-Klonierungsstelle eingefügt wird, wird zusätzlich mit einer N-terminalen FLAG-Region versehen. Die Herstellung des Plasmids FLAG-ZBRK1 erfolgte

ebenfalls anhand der Restriktionsenzyme *SalI/NotI* und dem Plasmid pCMV-MYC-ZBRK1. Da das Expressionsplasmid pTL-FLAG keine *SalI*-Restriktionsschnittstelle besitzt, wurde der Vektor mit den Enzymen *XhoI/NotI* behandelt.

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Herstellung des pCMV-MYC-ZBRK1-Expressionsplasmids wurde das offene Leseraster des *ZBRK1*-Gens mit einer Kombination aus der *Taq/Pfu*-Polymerase (im Verhältnis 1:25) sowie den Primern ZBRK1-s-Sal1 und ZBRK1-as-Not1 mittels PCR amplifiziert. Als Vorlage diente das Expressionsplasmid pOTB7-ZBRK1 (RZPD, IRAUp969A0148D). Dementsprechend wurde das ZBRK1-DNA-Fragment in einem 50 μ l Ansatz, welcher 10 ng pOTB7-ZBRK1-Plasmid-DNA, 1 μ l *Taq:Pfu*-Polymerase, 5 μ l 10x-Taqpuffer, 1 μ l der jeweiligen 20 μ M Primer-Lösungen, 1 μ l 25 mM dNTPS, 5 μ l 5x CES-Lösung, 5 μ l 25 mM $MgCl_2$ -Lösung und 30 μ l bi-destilliertes Wasser enthielt, bei folgendem Programm in der PCR-Maschine amplifiziert:

Tabelle 15: Temperaturprogramm der durchgeführten PCR-Reaktionen

Schritt	Temperatur	Zeit
Erstes Aufschmelzen	98 °C	30 Sek
Aufschmelzen	98 °C	10 Sek
Anlagerung	55 °C	30 Sek
Verlängerung	72 °C	1 Min
		} X 30
Letzte Verlängerung	72 °C	5 Min

2.2.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die ZBRK1-DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Aufreinigung aus diesem erfolgte, entsprechend der Vorschriften der Hersteller mit dem Wizard PCR Clean UP Kit (Promega). Dafür wurde die Menge der isolierten Agarosegel-Bande bestimmt, mit gleicher Menge Membran-Binde-Puffer und für 10 Min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf die entsprechenden Säulen überführt und die DNA-Fragmente mittels Zentrifugation (1 Min, 13000 rpm, RT) an die Silikamembran gebunden. Nach zwei aufeinanderfolgenden Waschschr

wurde die DNA in 50 µl bi-destilliertem Wasser eluiert und die DNA-Konzentration mittels „Nanodrop“-Messung bestimmt (siehe 2.2.4).

2.2.3 Plasmid-DNA Präparation

Die Isolierung von Plasmiden aus *E.coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe verschiedener DNA Präparationskits (PeqLab, Fermentas, Promega, Invitrogen) und wurde entsprechend der Vorschriften der Hersteller durchgeführt. Dafür wurden, entsprechend der Applikationen Übernacht-Kulturen der entsprechenden *E.coli*-Stämme in einem Volumen von 3 ml für eine Mini-, 100 ml für eine Midi- und 200 ml für eine Maxi-Präparation angesetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden diese mittels Zentrifugation (Mini-Präparation: 1 Min, 13000 rpm, RT bzw. Midi-/Maxi-Präparation: 10 Min, 4000 rpm, RT) geerntet und in Resuspensionspuffer aufgenommen. Danach wurde die *E.coli*-Zellsuspension mit Lysepuffer versetzt, für 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert und Zellreste sowie chromosomale-DNA durch Zugabe von Präzipitationspuffer gefällt. Die Überstände wurden auf entsprechende Säulen (Silicamembran (Mini-Plasmidpräparation) oder Anionenaustauscherchromatographie (Midi-, Maxi-Plasmidpräparation)), mittels Zentrifugation (Mini-Präparation: 1 Min, 13000 rpm, RT) bzw. Vakuum überführt wodurch die Plasmid-DNA binden konnte. Nach zweifachen Waschschritten wurde die Plasmid-DNA in 50 µl (Mini-Präparation) bzw. 200 µl (Midi-/Maxi-Präparation) Wasser eluiert und die DNA-Konzentration mittels Nanodrop-Technologie bestimmt.

2.2.4 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von wässriger DNA und RNA-Lösung erfolgte mittels photometrischer Messung in einem „Nano Drop“-Spektrophotometer. Dafür wurde jeweils 1,5 µl der unverdünnten DNA-Lösung auf die Messvorrichtung aufgetragen und anschließend das Verhältnis der Absorption der Lösung von 260 nm zu 280 nm bestimmt.

DNA-Lösungen, mit Konzentration < 20 ng/µl, wurden fluorimetrisch mittels Quant-IT DNA Assay Kit und gemäss den Herstellerangaben in einem Qubit-Fluorometer (Invitrogen) bestimmt.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente der Analyse von Restriktionsansätzen, DNA-Fragmenten sowie der Überprüfung isolierter RNA. Dafür wurden 1-3 % Agarose in 50 ml TAE-Puffer aufgekocht, mit 0,5 g/ml Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer gegossen. Die DNA- oder RNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, zusammen mit einem 1 kb- bzw. 100 bp-DNA Marker auf das horizontale Agarosegel aufgetragen und in TAE-Puffer bei 50 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden im Geldokumentationssystem unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.6 Restriktionsverdau

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme *SalI*, *NotI* und *XhoI* stammen alle von *New England Biolabs*. Jeder Restriktionsansatz erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl, welcher aus 0,2-1 µg DNA, jeweils 0,5 µl der Restriktionsenzyme *SalI* und *NotI*, 2 µl des dazugehörigen 10x Puffers bestand und mit dem entsprechenden Volumen an bi-distilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt wurde. Nach einer Inkubation von 1-3 h bei 37°C wurde der Restriktionsansatz mittels einem 1 % -igen Agarosegel analysiert (siehe 2.2.5).

2.2.7 Ligation

Ligationen erfolgten in einem 20 µl Ansatz, und enthielt Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis 1:3. Ausserdem erfolgte die Zugabe von 1 µl T4-Ligase, 1x T4-Ligasepuffer und Wasser. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und am darauffolgenden Tag in chemokompetente *E.coli*-Zellen transformiert.

Ligationen welche tagsüber mittels der T4-Quick-Ligase durchgeführt wurden erfolgten ebenfalls in einem Reaktionsansatz von 20 µl. Dieser bestand aus Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis 1:3, 1 µl T4-Ligase, 1x T4-Quick-Ligasepuffer und wurde anschließend mit dem entsprechenden Volumen an bi-distilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Danach wurde der Ansatz für 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert und zur Transformation von chemokompetenten *E.coli*-Zellen eingesetzt.

2.2.8 Transformation von chemokompetenten *E.coli*-Stämmen

Für eine Transformation wurden zwischen 10 und 100ng des gewünschten Plasmids mit 20µl chemokompetenter *E.colis* (XL1-blue, XL-Gold, DH5α) versetzt und für 15 Min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze für 45 Sek. einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend für 2 Min auf Eis inkubiert. Die Transformationsansätze wurde mit 800µl LB-Medium versetzt und 1h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Durch kurze Zentrifugation wurden die *E.coli*-Zellen pelletiert, in einem Volumen von 50 µl resuspendiert und mit sterilen Glaskugeln auf Ampicillin- (100 µg/ml) oder Chloramphenicol- (17 µg/ml) Agarplatten plattiert.

2.2.9 Plasmidtransformation in *S. cerevisiae*

Für die Hefetransformationen wurden 3ml YPD-Medium mit dem benötigten Hefestamms angeimpft und die Kultur über Nacht bei 30°C und 170 rpm inkubiert. Am darauffolgendem Tag wurde eine Hauptkultur mit einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,1 angesetzt, welche anschließend bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 inkubiert wurden. Anschließend wurde die Hefesuspension zentrifugiert (5 Min, 3000 rpm, RT), die Zellen mit 1xTE gewaschen und erneut zentrifugiert (5 Min, 3000 rpm, RT). Hiernach wurden die Zellen mit 1ml Yeast-Two-Hybrid-MIX 1 versetzt und für 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Je 40 µl Zellsuspension wurden mit 500ng der jeweiligen Transformationsplasmide, 5 µl denaturierter Heringsperma-DNA und 230 µl Yeast-Two-Hybrid-MIX 2 versetzt und der Ansatz für 30 Min bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze mit 30 µl DMSO versetzt und für 7 Min einem Hitzestress bei 42 °C ausgesetzt. Nach Zentrifugation (5 Min, 3000 rpm, RT) wurden die Zellen in 50 µl bi-destilliertem Wasser resuspendiert und mit sterilen Glaskugeln auf SDII-Selektionsmedium plattiert und für 72 h bei 30 °C inkubiert.

2.2.10 Yeast-Two-Hybrid (Y2H)-Analyse

Zur Y2H-Analyse wurde der Hefestamm L40ccuA wie in 2.2.9 beschrieben mit den zu untersuchenden *bait*- und *prey*-Plasmiden transformiert, auf SDII-Selektionsmedium plattiert und für drei Tage bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden sechs Einzelklone der Transformanten in 96-Kammer-Zellkulturplatten mit 200 µl bi-destilliertem Wasser resuspendiert. Mit Hilfe eines 96-Spitzen-Replikators erfolgte die Überführung der

transformierten Einzelklone auf SDII- und SDIV-Platten sowie auf eine SDII-Nylontransfermembran. Nach einer weiteren Inkubation bei 30 °C für 72 h bis 96 h wurde das Wachstum der Hefetransformanten auf den jeweiligen Selektionsplatten analysiert und ein β -Galaktosidasetest durchgeführt. Dazu wurde die Membran in Flüssigstickstoff inkubiert und anschließend auf ein Whatmanpapier, welches zuvor in Yeast-Two-Hybrid-X-Gal Lösung getränkt worden war, plaziert und für 3 h bis 5 h bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum der Transformanten auf Selektionsmedium sowie eine Blaufärbung im β -Galaktosidasetest wurde photographisch dokumentiert.

2.2.11 Quantitativer β -Galaktosidasetest

Des Weiteren erfolgte eine quantitative Bestimmung der Protein-Protein Interaktionen mittels eines β -Galaktosidasetest, bei welchem die Aktivität des *LacZ*-Gens anhand der umgesetzten β -Galaktosidase Substrate photometrisch bestimmt wird. Jede Analyse wurde mit vier unabhängigen Hefe-Klonen durchgeführt. Dazu wurden diese in 2 ml SDII-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Übernacht-Kultur in eine Hauptkultur, bestehend aus 5 ml SDII-Medium überführt, und bis zu einer OD_{600} zwischen 0,6 und 1,0 inkubiert. Anschließend wurde die Hefesuspension zentrifugiert (2 Min, 5000 rpm, RT), der Überstand abgenommen und die Zellen bei -80 °C schockgefroren. Hiernach wurden diese mit einem Gemisch aus 665 μ l H-Puffer, 55 μ l Chloroform und 55 μ l 0,1 % SDS für 1 Min auf dem Vortexer aufgeschlossen. Nach der Zugabe von 125 μ l ONPG-Puffer, dem β -Galaktosidase Substrat wurden die Lysate für 60-90 Min bei 37 °C schwenkend inkubiert. Sobald es zum Farbumschlag kam, wurde die Reaktion mit 400 μ l 1 M Na_2CO_3 beendet, die Lysate für 5 Min bei 16000 rpm zentrifugiert und der Überstand photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen. Die Berechnung der relativen β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte mittels der Formel $Ur = (1000 \times OD_{420}) / (V_{(ml)} \times T_{(h)} \times OD_{600})$.

2.2.12 Herstellung intrazellulärer Antikörper mit interferierenden Eigenschaften für Protein-Protein-Interaktionen

Intrabodies sind artifiziell hergestellte intrazelluläre Antikörper, welche aus einem Unterfragment des Immunglobulin G Proteins bestehen. Bei diesem handelt es sich um

das sogenannten scFv-Fragment, welches aus der variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Kette zusammengesetzt wird und mittels einer Peptidverbindung stabilisiert wird. Die Generierung der ZBRK1-spezifischen Intrabodies erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Schritten: 1. der Antikörper-Anreicherung mittels Phagen-Display und 2. der Intrabody-Selektion mittels reverser Y2H-Analyse.

2.2.13 Antikörper-Anreicherung mit Hilfe von Phagen-Display

Für den Phagen-Display wurde der filamentöse Phage M13 verwendet, welcher mittels eines Phagemids ein grosses Repertoire an Antikörper-Fusionsproteinen auf der Phagen-Oberfläche exprimiert. Das Repertoire der Oberflächenpräsentierenden Antikörper wurde mittels einer humanen scFv-Bibliothek angereichert. Das Antikörper spezifische Antigen ZBRK1-CT wurde über die Restriktionsschnittstellen *Sall/NotI* in den Expressionsvektor pRSET-BH6 kloniert und anschließend als biotinyliertes ZBRK1-CT-Fusionsprotein exprimiert. In einem weiteren Schritt erfolgte mittels mehrerer „Panning“-Runden die *in vitro* Anreicherung spezifisch bindender Antikörperfragmente an immobilisiertes ZBRK1-CT-Fusionsprotein. Durch folgende Waschschritte wurden ungebundene Antikörper-tragende Phagen beseitigt. Im Anschluss wurde die Anreicherung mittels polyklonalem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) überprüft und die Diversität der monoklonalen Antikörper mittels DNA-Sequenzierungen oder massenspektrometischer Methoden bestimmt.

In einem weiteren Schritt wurden die angereicherten Antikörper-Fragmente mittels PCR und den spezifischen Primern VH-tom-NcoI_f und VL-tom-NotI_rev amplifiziert und für die *in vivo* Selektion über die Restriktionsschnittstellen *NcoI/NotI* in den Hefeexpressionsvektor pIB-NLS kloniert. Dies erfolgte durch Carola Stochek und Jeannine Wilde in der Arbeitsgruppe von Dr. Zóltan Konthur.

2.2.14 Intrabody-Selektion mittels reverser Y2H-Analyse

Die Selektion von ZBRK1-Intrabodies für die ZBRK1-ATXN2 Interaktion erfolgte mittels reverser Y2H-Analyse. Hierfür wurde der in Tabelle 8 beschriebene Hefestamm L40ccuAade mit dem Fusionsprotein AD-ZBRK1-CT als *bait* und LexA-ATXN2Q22₁₋₃₉₆ als *prey*, sowie der zuvor angereicherten pIB-NLS-ZBRK1-Bibliothek bzw. einer nicht angereicherten pIB-NLS-naive-Bibliothek als Kontrolle, transformiert (siehe

2.2.9). Der Transformationsansätze wurden auf SDIII-Festmedium ausplattiert und bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung von 1152 Transformanten im 384er-Format in SDIII-Flüssigmedium. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 30 °C, erfolgte mittels 384er-Replikatoren die Überführung auf SDIII- und SDV-Selektionsplatten. Nach einer Inkubation von 3-5 Tagen bei 30 °C wurde das Wachstum der Hefetransformanten analysiert. Fehlendes Wachstum auf SDV-Festmedium verwies auf eine beeinträchtigte Transkription der Reportergene und demzufolge auf die Expression eines Intrabodies mit interferierenden Eigenschaften.

Zur Isolierung von Intrabody-Kandidaten wurden Klone, welche kein Wachstum auf der SDV-Platte zeigten, von der Kontrollplatte (SDIII-Medium) in 3 ml SDIII-Medium überführt, über Nacht bei 30 °C inkubiert und am darauffolgendem Tag zentrifugiert (5 Min, 2000 rpm, RT). Zur Isolierung der Intrabody-Plasmid-DNA erfolgte die Generierung von Spheroblasten. Dazu wurden die Hefezellen für 30 Min bei 37 °C mit Zymolyase inkubiert (5 mg/ml Zymolyase, 1 M Sorbitol, 100 mM di-Kaliumhydrogenphosphat pH 7,5, 1xTE). Im Anschluss erfolgte die Isolierung der Intrabody-Plasmid DNA mittels DNA-Plasmid-Präparation (siehe 2.2.3) sowie die Transformation XL1-blue-*E.coli*-Zellen (siehe 2.2.8).

Die im Y2H validierten Intrabody-Kandidaten wurden für weiterführende Analysen in Säugerexpressionsvektoren kloniert. Dafür wurden durch Carola Stoschek (AG Dr. Zoltán Konthur, MPIMG) die Intrabody-Sequenzen mittels PCR und den spezifischen Primern 5'scFv_HindIII_pFLAG sowie 3'scFv_pFLAG amplifiziert und anschließend über die entsprechenden HindIII/ Not1 Restriktionsschnittstellen in den Säugerexpressionsvektor pFlagCMV5a-ccdB kloniert. Eine anschließende Sequenzanalyse zum Ausschluss eventueller Mutationen oder Leserasterverschiebungen wurde durchgeführt.

2.2.15 Lagerung von Säugetierzellen

Für eine langfristige Lagerung von Säugetierzellen wurden Kryogefrierstocks hergestellt. Dafür wurden die entsprechenden Zelllinien in T75-Kulturflaschen (75 cm² Grundfläche) bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen vorsichtig mit 1X DPBS gewaschen, mit 1ml Trypsin (0,25 % in 1 mM EDTA) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in 6 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach anschließender Zentrifugation (5 Min, 2000 rpm, 4 °C) wurde das Zellpellet in 2,7 ml Einfriermedium aufgenommen und auf Kryoröhrchen verteilt. Danach wurden diese

in einem, mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfrierkontainer, 1 °C pro Minute auf –80 °C gekühlt und am darauffolgenden Tag in einem mit flüssigen Stickstoff befüllten Tank überführt.

2.2.16 Kultivierung von Säugetierzellen

Die Kultivierung der Zelllinien Hek293T, MCF-7, HeLa und U2OS erfolgte bei 5 % CO₂ und 37 °C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), welches zusätzlich mit 10 % fötalem Hitze-inaktiviertem Rinderserum (Biochrom), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin versetzt wurde. Je nach Konfluenz der Zellen wurden diese alle 3-5 Tage mit Hilfe von 1-2 ml Trypsin (0,25 % in 1 mM EDTA) vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und im Verhältnis 1:10 in neue Kulturflaschen (Sarstedt) überführt.

Tabelle 16: Ansätze humaner Zelllinie für die jeweiligen Applikationen

Zelllinie	Zellkulturplatte	Zellzahl
Hek293T	15 mm Platte	2-3 Mio.
	12-Kammer-Platte	30.000-60.000
MCF-7	15 mm Platte	2 Mio.
	12-Kammer-Platte	25.000-40.000
	24-Kammer-Platte + Deckgläschen	10.000
HeLa	12-Kammer-Platte	40.000
	24-Kammer-Platte + Deckgläschen	20.000
U2OS	24-Kammer-Platte + Deckgläschen	15.000

Für die jeweiligen experimentelle Ansätze wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, verdünnt und, wie in Tabelle 16 dargestellt, den Applikationen entsprechenden Angaben in die jeweiligen Zellkulturplatten oder -kammern ausgesät.

2.2.17 Transfektion von Säugetierzellen mit Plasmid-DNA

Wie in Tabelle 17 dargestellt wurde die gewünschte Plasmid-Konzentration mit entsprechender Menge PEI (1 mg/ml), 150 mM NaCl oder DMEM Medium (ohne Zusatz von fötalem Rinderseum sowie Penicillin und Streptomycin) versetzt und die Transfektionsansätze für mindestens 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und wie in Tabelle 17 beschrieben kultiviert.

Tabelle 17: Zusammenfassung der verschiedenen Transfektionsansätze in Säugerzellen

Zellkulturplatte	Plasmid-DNA	PEI	150mM NaCl oder DMEM	Inkubationszeit
15mm Platten	20 – 25 µg	42 µl	540 µl	48 h
12-Kammer-Platte	2 – 4 µg	6,6 µl	100 µl	48 h
24-Kammer-Platte+Deckgläschen	1 µg	3,3 µl	50 µl	16 – 24 h
96 – Kammer-Platte	0,1 µg	3 µl	50 µl	24 h

2.2.18 Induktion von oxidativem Stress in Säugetierzellen

HeLa-Zellen wurden durch Zugabe von H₂O₂ (Endkonzentration 0,5mM) oxidativem Stress ausgesetzt. Nach Zugabe von H₂O₂ -versetztem Zellkulturmedium wurden die Zellen für 1h bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Anschließend wurde die Stressinduktion durch einmaliges Waschen mit 1x DPBS beendet und die Zellen entsprechend den vorhergesehenen Applikationen aufgearbeitet.

2.2.19 Lyse von Säugetierzellen

Zur Lyse von Säugetierzellen wurden die jeweiligen Zellen mit 1x DPBS gewaschen, anschließend mit 3-5 ml Lysepuffer bei 15 mm-Zellkulturplatten bzw. 150-200 µl bei 12-Kammer-Zellkulturplatten versetzt und für 45 Min bei 4 °C schwenkend inkubiert. Nicht lysiertes Zellmaterial wurde anschließend durch Zentrifugation (10 Min, 16.000 rpm, 4 °C) entfernt, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford bestimmt. Hierfür wurden je 5 µl der Proteinlysate mit 200 µl Bio-Rad-Lösung und 800 µl 1x PBS versetzt. Nach einer Inkubation von 5 Min wurden die Ansätze bei einer Absorption von 595 nm photometrisch bestimmt und die Proteinkonzentration anhand einer BSA-Standardreihe berechnet.

2.2.20 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse auftrennen. Durch die Zugabe von

Sodiumdodecylsulfat, einem starken Detergenz, werden die Proteine negativ geladen und vollständig denaturiert.

Die Herstellung von SDS-Gelen erfolgte zwischen zwei Glasplatten, welche in den dafür vorhergesehenen Haltern befestigt wurden. Anschließend wurde wie in Tabelle 18 angegeben das Trenngel vorbereitet, zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 200 µl Isopropanol überschichtet. Im Anschluss an die vollständige Polymerisation des Trenngels, wurde überschüssiges Isopropanol entfernt, mit einem 5%-igen Sammelgel (siehe Tabelle 18) beschickt und ein entsprechender Taschenkamm eingesetzt.

Tabelle 18: Zusammensetzung verschiedener Trenngele sowie des Sammelgels

	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	10 %	12,5 %	5%
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	3,125 ml
bi-distilliertes Wasser	5 ml	4,2 ml	3,3 ml	-
Akrylamid (30 %)	2,5 ml	3,3 ml	4,2 ml	0,625 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,005 ml

Nach Fertigstellung des Gels konnte dieses in die mit 1x Elektrophoresepuffer vorgesehene Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Der Taschenkamm wurde gezogen und die Taschen mit Proteinproben sowie Proteinmarker (PageRuler™ Plus, Fermentas) beladen. Im Anschluss daran erfolgte der Gellauf bei einer Spannung von 90 V.

2.2.21 Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung von Proteinbanden, wurden diese mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt. Hierfür wurde das Gel für 1 Min in Coomassie-Färbelösung aufgekocht und anschließend für 10-30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe der Entfärbelösung wurde überschüssiger Farbstoff aus dem Gel entfernt und das Bandenmuster anschließend photographisch dokumentiert.

2.2.22 Immunoblotting

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse lassen sich Proteine auf eine Nitrozellulose Membran transferieren. Dies erfolgte nach der semi-dry Methode, welche in Towbin *et al.* (1979) beschrieben wurde.

Hierfür wurde zunächst eine Nitrozellulosemembran für 2 Min in bi-distilliertem Wasser inkubiert, mit Blotpuffer benetzt und anschließend auf drei, in Blotpuffer getränkte Whatmann-Papiere, auf die Blotapparatur gelegt. Anschließend wurde das SDS-Gel auf die Membran gelegt, mit drei weiteren Lagen getränkten Whatmann-Papieren bedeckt und die Apparatur geschlossen. Der Transfer erfolgte für 65 Min bei 150 mA pro Gel.

Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde im Anschluss an den Transfer, die Membran für mindestens 1h oder über Nacht bei 4 °C in 5 % bzw. 2 % und 0,1 % Tween 20 Magermilch inkubiert. Nach dreimaligem waschen mit 1x PBS/ 0,1% Tween 20 wurde die Membran mit den entsprechenden primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran erneut dreimal mit 1x PBS/ 0,1 % Tween 20 gewaschen und mit den jeweiligen sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpern behandelt. Diese wurden in 2 % -iger Magermilch mit 0,1 % Tween 20 verdünnt und für 1-3 h bei Raumtemperatur inkubiert (Verdünnung der Antikörper s. 4.7.1 und 4.7.2). Anschließend wurde die Membran erneut mit 1x PBS/ 0,1 % Tween 20 gewaschen und in einer Entwicklerkassette mit 1 ml Entwicklerlösung benetzt. Durch Auflegen eines Fotofilms wurde die Fluoreszenz der immunmarkierten Proteine auf den Fotofilm übertragen und schliesslich mittels der Entwicklermaschine entwickelt.

Im Falle von AP-(Alkaline Phosphatase) gekoppelten sekundären Antikörpern, erfolgten alle Waschschritte sowie die Verdünnung der sekundären Antikörper in 1x TBS. Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran mit Western Blue® Nachweisreagenz benetzt und bis zur Visualisierung der immunmarkierten Proteine im dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von bi-distilliertem Wasser beendet.

2.2.23 Koimmunpräzipitation

Mittels Koimmunpräzipitation (Ko-IP) lassen sich direkte und indirekte Interaktionen zwischen Proteinen nachweisen. Zur Ko-IP-Analyse wurde jeweils 1 mg Zelllysat mit 0,75 µg Maus-anti-ATXN2-Antikörper (BD Bioscience) für 90 Min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden $20,1 \times 10^5$ Schaf-anti-Maus-IgG-Dynabeads M-280 (Invitrogen) zugegeben und die Ko-IP-Ansätze für weitere 60 Min bei 4 °C inkubiert.

Für die Durchführung einer Ko-IP in HeLa-Zellkernen, wurde 250 µg Kernlysat mit 1 µg Maus-anti-ZBRK1-Antikörper versetzt und für 3 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von $10,05 \times 10^5$ Schaf-anti-Maus-IgG-Dynabeads M-280 (Invitrogen) in die jeweiligen Ansätze sowie eine erneute 60-minütige Inkubation bei 4 °C. Mit Hilfe eines Magnetständers wurden die präzipitierten Proteine dreimal mit 3 % BSA/ 1x PBS sowie dreimal mit 1xPBS gewaschen und mit 15 µl 5x Lämmlypuffer versetzt. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine für 5 Min bei 95 °C denaturiert.

2.2.24 Chromatin-Immunpräzipitation

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) dient dem direkten und indirekten Nachweis von Protein-DNA Bindungen im Zellkern. Hier macht man sich die Eigenschaft zu nutze, dass durch Zugabe von Formaldehyd der *in vivo* Zustand von Chromatin und den daran assoziierten Proteinen fixiert wird. In Abhängigkeit der Sonifizierungszyklen, kann die genomische DNA des eingesetzten Zellmaterials in kurze Fragmente unterteilt werden. Durch Zugabe eines spezifischen Primärantikörpers, können DNA-Fragmente, welche an das Antikörper spezifische DNA-gebundene Protein fixiert waren, präzipitiert werden.

Hierfür wurden drei 15 mm-Zellkulturplatten mit jeweils 1 Mio. MCF-7-Zellen ausgesät und für 3-4 Tage bis zu einer Konfluenz von 85-90 % inkubiert. Daraufhin wurden diese mit 0,1 % (v/ v) Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde die Vernetzung durch eine fünfminütige Zugabe von 0,1 Vol. 2,5 M Glycin beendet, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und die Zellkerne in drei aufeinanderfolgenden Lysesritten (ChIP Lysepuffer-1; ChIP-Lysepuffer-2; ChIP-Lysepuffer-3) wie nach Sultan *et al.* isoliert und lysiert [122]. Im folgenden Schritt wurde die Chromatin-DNA mittels Sonifizierung (65 Zyklen/ jeder Zyklus: 30 Sek an, 30 Sek aus; Diagenode; Bioruptor) in 700-1200 bp grosse DNA-Fragmente geschält

und jeweils drei Ansätze über Nacht bei 4 °C mit 10 µg Kaninchen-anti-ZBRK1 oder 10 µg Maus-anti-ATXN2 Primärantikörper auf einem Rotator inkubiert. Hiernach wurde jeder Ansatz mit jeweils 67 µl Protein-A-Dynabeads versetzt und für weitere 3 h bei 4°C rotierend inkubiert. Mit Hilfe eines Magnetständers wurden die präzipitierten Protein-DNA Verknüpfungen dreimal mit ChIP-Waschpuffer und einmal mit 1x TE/ 50 mM NaCl gewaschen. Daraufhin wurden die präzipitierten Proteine durch Zugabe von Elutionspuffer und einer 15-minütigen Inkubation bei 65 °C von den Dynabeads getrennt. Anschließend erfolgte die Auflösung der Protein-DNA Vernetzung durch Zugabe von 8 µl 5 M NaCl bei 65 °C über Nacht. Verbliebene RNA-Moleküle sowie Proteine wurden in aufeinanderfolgenden 90-minütigen Inkubationsschritten mittels RNase A- und Proteinase K-Behandlungen abgebaut. Die verbleibende DNA wurde mittels Ethanol fällung präzipitiert. Diese wurden mit gleichen Mengen des jeweiligen ChIP-Ansatzes und einem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-(PCI)-Gemisches (25:24:1, v/v) versetzt, mittels vorsichtigem Schütteln homogenisiert und anschließend zentrifugiert (5 Min, 16000 rpm, RT). Die dabei entstandene obere Phase, welche die Chromatin-DNA-Fragmente enthielt, wurde in eine neues Eppendorfgefäß überführt, mit 16 µl 5 M NaCl, 1,5 µl GeneElute™-LPA sowie 800 µl eiskaltem Ethanol (-20 °C) versetzt und für eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation (16000 rpm, 4 °C) wurden die DNA-Pellets mit 500 µl 80 % eiskaltem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (10 Min, 16.000 rpm, 4°C) und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Abschliessend wurden die Chromatin-DNA-Fragmente in 25 µl 1xTE pH 8,0 resuspendiert und die DNA-Konzentration mittels Qubit-Fluorometer (siehe 2.2.4) bestimmt.

2.2.25 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Für konfokale Mikroskopiestudien wurden die entsprechenden Zellen wie in Tabelle 16 beschrieben direkt auf Deckgläschen ausgesät und nach 24 h später mit den jeweiligen DNA-Plasmiden transfiziert. Nach 14-16-stündiger Inkubation wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen, durch Zugabe von eiskaltem Methanol (-20 °C) für 45 Min bei -20 °C fixiert, permeabilisiert und für 30 Min bei Raumtemperatur in 3 % BSA/ 1x PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 75-100 µl entsprechender Erstantikörperlösungen für 1 h inkubiert, dreimal mit 1x PBS gewaschen und abschliessend mit 100 µl der entsprechenden Sekundärantikörper bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden wie in 4.7.1 und 4.7.2 beschrieben in 3 % BSA/ 1x PBS oder 1x PBS verdünnt. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst (10 µg/ml in 1x PBS) für 20 Sek. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen mittels Mountigmedium (FluorochromG) auf einem Objektträger eingebettet.

Die eingebetteten Präparate wurden entweder mit einem inversen konfokalem Laserscanningmikroskop (LSM 510 Meta/ Zeiss) oder einem aufrechten konfokalem Laserscanningmikroskop (LSM 700/ Zeiss) untersucht. Zur Analyse wurden 40x - oder 63x – Ölobjektive verwendet. Zur konfokalen Aufnahme der Präparate wurden die jeweils entsprechenden Laser und Kanäle benutzt:

Tabelle 19: Anregungs-Wellenlängen der Mikroskopie-Fluoreszenefarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Anregung (nm)
FITC, Alexa488	488 nm
Cy3, Alexa568	543 nm
DAPI, Alexa350	351 nm

Die Intensität der Aufnahme wurde entweder mit der Software LSM 5 oder Zen 2009 (Zeiss) so eingestellt, dass der Hintergrund die geringste und zelluläre Strukturen die höchstmögliche Helligkeit aufwiesen. Von jeder Probe wurde, mittels der Software LSM 5 oder Zen 2009 ein Bildstapel angefertigt, welcher die Schichten mit der stärksten Färbung der relevanten Strukturen enthielt. Anschliessend, wurde aus diesen eine Projektion erstellt. Weiterführende Bearbeitungen erfolgten mit der Software Axiovision LE (Zeiss) und Adobe Photoshop.

2.2.26 small interfering RNA

RNA-Interferenz-Experimente erfolgten mittels siRNA-Moleküle von Dharmacon:

Tabelle 20: Zusammenfassung der verwendeten siRNA-Moleküle

siRNA-Molekül	Nummer
<i>On Target smart pool human SCA2</i>	L-011772-00-0005
<i>On Target smart pool human ZNF350</i>	L017814-02-0005
<i>On Target smart pool human non targeting</i>	L-063731-01-0005

Die gefriergetrockneten si-RNAs wurden zunächst nach Herstellerangaben in DEPC-Wasser aufgenommen und auf eine Endkonzentration von 20 μM eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Für RNA-Interferenz-Experimente wurden zwischen 40.000 und 60.000 Zellen in 1 ml Penicillin/Streptomycin freien Zellkulturmedium wie in Tabelle 16 beschrieben ausgesät und für 16-24 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes, welcher aus 2,4 μl der entsprechenden siRNA, 200 μl DMEM-Medium ohne FCS-Zusatz und 12 μl HiPerfect bestand. Nach einer 10-15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die zuvor ausgesäten Zellen mit dem entsprechenden Ansatz behandelt und für 72 oder 96 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

2.2.27 RNA-Extrahierung aus Säugetierzellen

Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen) und entsprechend der Vorschriften des Herstellers extrahiert. Zunächst wurden Hek293T- oder HeLa-Zellen in 12-Kammer-Zellkulturplatten ausgesät (siehe Tabelle 16) und entsprechend mit siRNA-Molekülen oder Expressionsplasmiden behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, und durch Zugabe des Lysepuffers lysiert. Die homogenisierten Lysate wurden mit gleichem Volumen an 70 % -igem Ethanol versetzt und mittels Zentrifugation (1 Min, 13000 rpm, RT) an die Silicamembran der dazugehörigen Säulen gebunden. Anschließend erfolgte der Abbau verbliebener genomischer DNA mittels einer 15-minütigen Dnase-Behandlung der Ansätze. Danach wurde die Membran-gebundene RNA in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mit Waschpuffer gewaschen, mittels eines weiteren Zentrifugationsschritt (1 Min, 13000 rpm, RT) getrocknet und in 50 μl Rnase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration der jeweiligen Proben wurde mittels „Nanodrop“-Messungen bestimmt (siehe 2.2.4).

2.2.28 Herstellung einzelsträngiger cDNA

Die Herstellung von Einzelstrang-cDNA (ss cDNA) erfolgte im 20 μl Ansatz. Dazu wurden in einem ersten Schritt 100-500 ng Gesamt-RNA mit 0,25 μg Oligo-dT₍₁₂₋₁₈₎ Primer und 0,5 μl 25 mM dNTPs versetzt und mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 13 μl aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation der Ansätze in einem Thermocycler bei $65\text{ }^\circ\text{C}$. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis, wurde jeder

Ansatz mit 4 μ l 5X Erststrangpuffer, 1 μ l 0,1M DTT, 100 U Superscript II und 1,5 μ l DEPC-Wasser versetzt und für weitere 90 Min bei 42 °C inkubiert. Durch eine 15-minütige Inkubation bei 85 °C wurde die Reaktion beendet. Für folgende qPCR-Analysen wurden die Ansätze mit DEPC-Wasser 1:4 verdünnt.

2.2.29 Quantitative „RealTime“-PCR (qPCR)

Mit Hilfe der qPCR wird die relative Quantifizierung von RNA bestimmt. Über Messung der Fluoreszenzemission wird die Entstehung von PCR-Produkten während der Amplifikation gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SYBR-Green-Methode verwendet. Diese beruht auf der Zugabe des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR-Green, welcher durch Bindung an doppelsträngige DNA die Intensität der messbaren Fluoreszenz erhöht. Die Reaktionen wurden in 384-Kammer-Platten mit zwei biologischen- und jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Ein 10 μ l-Ansatz enthielt 2 μ l Einzelstrang-cDNA, 0,5 μ l des entsprechenden 5 μ M Primerpaarmixes, 2,5 μ l 2x SYBR® Green und 5 μ l DEPC Wasser. Die Fluoreszenzemission der Proben während der Amplifikation wurde mit folgendem Programm in der qPCR – Maschine gemessen:

Tabelle 21: Temperaturprogramm der qPCR

Schritte	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Vorbereitung	50 °C	2 min	
Aufschmelzen	95 °C	10 min	
Aufschmelzen	95 °C	15 sec	X 40
Anlagerung	60 °C	1 min	

Die Auswertung erfolgte mittels der Software SDS 2.1 (Applied Biosystems) und nach der vergleichenden $\Delta\Delta C_t$ – Methode (Gebrauchsanleitung #2, Applied Biosystems).

2.2.30 Promotorstudien

Promotor-Expressionsplasmide

Die Herstellung der Promotor-Plasmide für spätere Promotoranalysen erfolgte mittels der Gateway-Technologie (Invitrogen). Hierfür wurden die Promotorbereiche des

SCA2- sowie des *ATM*-Promotors (siehe Anhang A2) mit Hilfe des Genombrowsers von UCSC definiert und mit dem Phusion-Kit[®] (Finnzyme) sowie spezifischen Primern (Tabelle 12) amplifiziert. Als Vorlage diente genomische-SW480-DNA. Hierfür wurde ein 20 µl-Ansatz mit 5 ng-genomischer DNA, 0,2 µl Phusion-Polymerase, jeweils 1 µl beider Primer (20 µM), 1 µl der 10 mM dNTP-Lösung, 4 µl des 4x GC-Puffer und 11 µl bi-destilliertes Wasser zusammenpipettiert und anschließend in der PCR-Maschine wie in Tabelle 15 beschrieben inkubiert. Zur Überprüfung der Amplifizierung wurden die Promotor-DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetragen.

Anschließend erfolgte über homologe Rekombination und mittels der *attB*-Adapter-Sequenzen, welche an den jeweiligen Enden der Promotorkonstrukte exprimiert wurde, die Klonierung in den pGL3basic-Expressionsvektor. Dafür wurde ein 20 µl Ansatz aus 100-300 ng *attB*-Promotor-DNA-Fragmenten, 300 ng pGL3basic-Vektor, 4 µl 5X BP Clonase Reaktionspuffer, 4 µl BP Clonase[™] Enzymmix mit 1x TE pH 8,0 versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 4 µg Proteinase K wurde die Reaktion beendet und 1 µl des Ansatzes in 50 µl One Shot[®] OmniMAX[™] 2 T1-Phagen-Resistente Zellen transformiert.

Luziferase-Reporter-Analyse

Für die Promotoranalysen in dieser Arbeit wurde das Dual-Glo[®] Luziferase-Reporter-System von Promega nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden Hek293T-Zellen in 96-Kammer-Zellkulturplatten ausgesät und für 16-24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden diese mit einem Transfektionsansatz, bestehend aus 50 µl DMEM-Medium (ohne Zusatz von FCS und Penicillin/Streptomycin), 10 ng pRL-TK-Renilla, 50 ng pGL3-ATXN2, pGL3-ATXN2-Exon1 oder pGL3-ATM, 100 ng pCMV-HA-ZBRK1, pCMV-MYC-ATXN2Q22 bzw. pCMV-MYC-ATXN2Q79 und 3 µl PEI-Transfektionsreagenz behandelt. Als Kontrolle diente das Reporter-Luziferase-Plasmid pGL3basic bzw. die Expressionsplasmide pCMV-HA und pCMV-MYC. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen in 20 µl Luziferase-Lysepuffer und für 10 Min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde die Reporteraktivität in einem Centro LB960 Luminometer (Berthold, Bad Wildbad) gemessen und in Relation zur Expression der *Renilla* Luziferase berechnet

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Interaktion zwischen ATXN2 und ZBRK1

Wie bereits erwähnt, ist die zelluläre Funktion des ATXN2-Proteins bis heute noch nicht vollständig verstanden. Deshalb wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Sylvia Krobitch Y2H-Analysen mit dem ATXN2-Protein durchgeführt, um über die Identifizierung von Interaktionspartnern Einblicke in dessen funktionelle Eigenschaften zu gewinnen. Diese wurden mit unterschiedlichen Regionen von ATXN2 durchgeführt, welche zusammen das ganze Protein umfassen (siehe Abbildung 3). Eine dieser Y2H-Analysen, durchgeführt mit der LSm-Domäne als *bait* und einer *humanen fötalen Hirn-Bibliothek* (Clontech) als *prey*, resultierte in der Isolierung eines *prey*-Plasmids, welches Sequenzen für die C-terminale Region des transkriptionellen Regulators ZBRK1 (*BRCA1-interacting protein with a KRAB domain 1*) enthielt (siehe Abbildung 3). ZBRK1 ist ein transkriptioneller Regulator, welcher an der Reprimierung von Genen beteiligt ist, die der DNA-Reparaturmaschinerie zugeordnet werden [123]. Interessanterweise deuteten erste Y2H-Ergebnisse darauf hin, dass die Interaktion zwischen ZBRK1 und ATXN2 durch die Länge des Polyglutaminbereichs beeinflusst sein könnte.

3.1.1 ZBRK1 und ATXN2 interagieren im Y2H-System

In einem ersten Schritt sollten zunächst diese vorläufigen Ergebnisse mittels weiterer Y2H-Analysen bestätigt werden. Dazu wurde der Hefestamm L40ccuA wie in 2.2.9 beschrieben mit den entsprechenden *bait*- und *prey*-Plasmiden sowie Kontrollplasmiden transformiert. Die Transformanten wurden isoliert und, wie in Material und Methoden beschrieben, auf die verschiedenen Selektionsmedien überführt. Nach einer dreitägigen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Hefetransformanten analysiert.

Wie anhand der Abbildung 3 ersichtlich, zeigten Hefezellen, welche die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA-ATXN2(Q22)₁₋₃₉₆ exprimierten, ein eindeutiges Wachstum auf SDIV-Medium sowie eine Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test. Daraus lässt sich schließen, dass eine Interaktion zwischen ZBRK1 und dem N-terminalen Bereich von ATXN2 stattfindet. Interessanterweise zeigten Transformanten, welche die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA-ATXN2(Q79)₁₋₃₉₆ exprimierten,

ein geringeres Wachstum auf SDIV-Medium sowie eine schwächere Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test, was auf eine geringere relative Aktivität der Reportergene schließen und letztendlich eine schwächere Interaktion vermuten lässt. Hefezellen, welche die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA-ATXN2₂₅₄₋₄₇₅ exprimierten, zeigten kein Wachstum auf SDIV-Medium, aber eine sehr schwache Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test, was ebenfalls auf eine geringere relative Reporterogenaktivität und somit auf eine schwächere Assoziierung beider Proteine schließen lässt.

Um zu überprüfen, ob die veränderte relative Reporterogenaktivität besteht und somit die relative Stärke der Interaktion weitergehend zu festigen, sollte im folgenden die relative Aktivität des *LacZ*-Gens durch einen β -Galaktosidase-Test quantitativ ermittelt werden.

Dazu wurde der Hefestamm L40ccuA erneut in Kombination mit den entsprechenden *bait*- und *prey*-Plasmiden sowie Kontrollplasmiden transformiert. Die Transformanten wurden isoliert und ein β -Galaktosidase-Test, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass Hefezellen, welche die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA-ATXN2(Q22)₁₋₃₉₆ exprimierten, die stärkste *LacZ*-Gen-Aktivität aufwiesen (siehe Abbildung 3). Hefezellen, die die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA-ATXN2(Q79)₁₋₃₉₆ exprimierten, wiesen im Vergleich eine deutlich geringere Aktivität des *LacZ*-Gens auf. Zusätzlich konnte die Interaktion zwischen AD-ZBRK1-CT und LexA-ATXN2₂₅₄₋₄₇₅ ebenfalls mittels der quantitativen Bestimmung der relativen *LacZ*-Reporterogenaktivität bestätigt werden, wobei hier allerdings die geringste relative *LacZ*-Gen-Aktivität beobachtet werden konnte. Demzufolge zeigte diese Analyse, dass die Interaktion zwischen ZBRK1 und dem N-Terminus von ATXN2 mit zunehmender Länge des Polyglutaminbereichs beeinträchtigt wird.

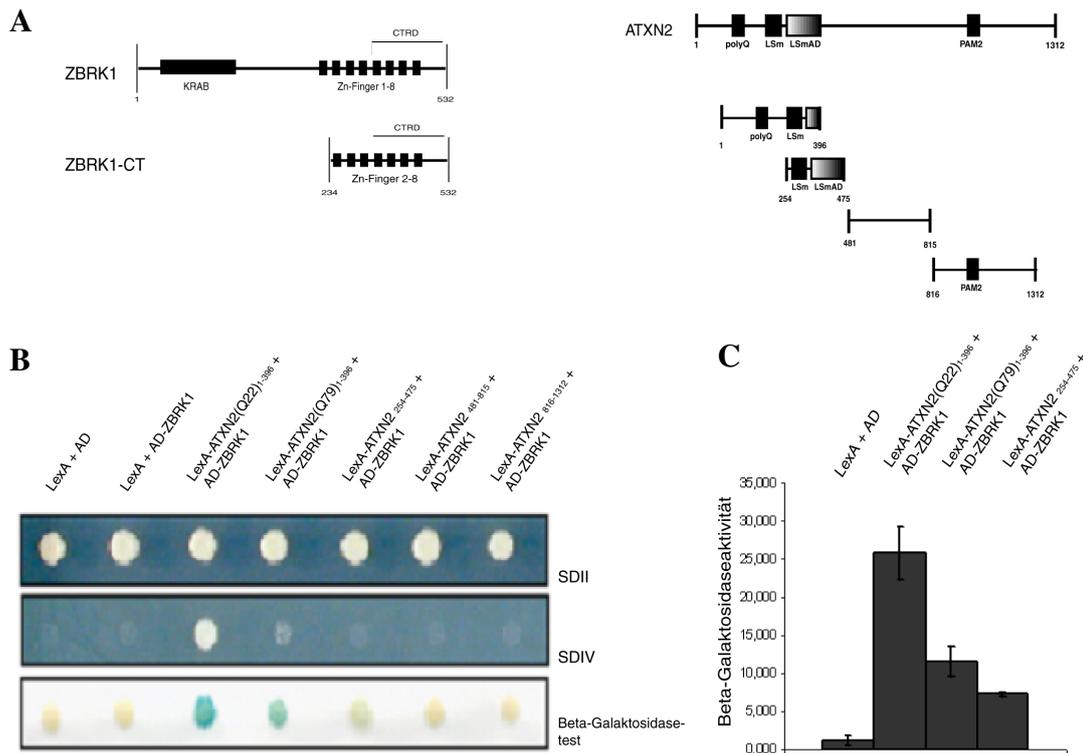


Abbildung 3: ZBRK1 und ATXN2 interagieren im Y2H-System. (A) Schematische Darstellung der Proteinstrukturen von ZBRK1 und ATXN2. (linke Seite) ZBRK1 besteht aus einer N-terminalen KRAB-Domäne, 8 Zinkfingern und einer C-terminalen CTRD-Domäne. ZBRK1-CT entspricht der Aminosäuresequenz, welche in der ursprünglichen Y2H-Analyse identifiziert wurde. (rechte Seite) Schematische Darstellung von ATXN2 sowie den unterschiedlichen ATXN2-Regionen, welche insgesamt das ganze Protein umfassen. ATXN2 enthält einen N-terminalen Polyglutaminbereich, eine LSm/ LsmAD-Domäne sowie ein C-terminales PAM2-Motiv. (B, linke Seite) Y2H-Analyse. Der Hefestamm L40ccuA wurde mit den entsprechenden *bait*- und *prey*-Plasmiden transformiert. Transformanten wurden auf SDII-, SDIV-Festmedium und SDII-Membran überführt und die Platten für drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der Reportergene untersucht. Positive Interaktionen zeichnen sich durch Wachstum auf SDIV-Medium sowie einer Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test aus. (rechte Seite) β -Galaktosidase-Test. Entsprechende Hefekulturen wurden in SDII-Medium bis auf eine OD_{600} von 0,8-1 kultiviert, anschließend lysiert, in ONPG/H-Puffer resuspendiert und nach dem Farbumschlag die optische Dichte bei 420 nm bestimmt. Die Messwerte wurden wie in Material und Methoden beschrieben berechnet. Dargestellt ist eine repräsentative Analyse basierend auf jeweils vier Parallelkulturen. Fehlerbalken repräsentieren die berechnete Standardabweichung von vier eingesetzten Hefeklonen.

Abschliessend wurde auch die Spezifität dieser Interaktion untersucht. Hierzu sollten Y2H-Analysen mit weiteren Polyglutaminproteinen durchgeführt werden. Dafür wurde

das Protein Ataxin-3, involviert in die Machado-Joseph-Erkrankung, sowie das Exon1 des Huntingtin-Proteins, involviert in HD, herangezogen.

Diese Y2H-Analyse ergab, dass Hefezellen, welche die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA-ATXN3 exprimierten, kein Wachstum auf SDIV-Medium zeigten. Zusätzlich konnte keine Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test beobachtet werden (Abbildung 4). Entsprechend zeigten Hefetransformanten, die die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA-HDQ25 exprimierten, ebenfalls kein Wachstum auf SDIV-Medium sowie keine Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test, woraus geschlossen werden kann, dass keine Interaktion zwischen ZBRK1 und ATXN3 stattfindet. Zusätzlich wurde auch der Einfluss einer expandierten Polyglutaminregion untersucht. Dementsprechend wurden Hefezellen mit den Fusionsproteinen AD-ZBRK1-CT und LexA-HDQ46 bzw. LexA-HDQ72 transformiert.

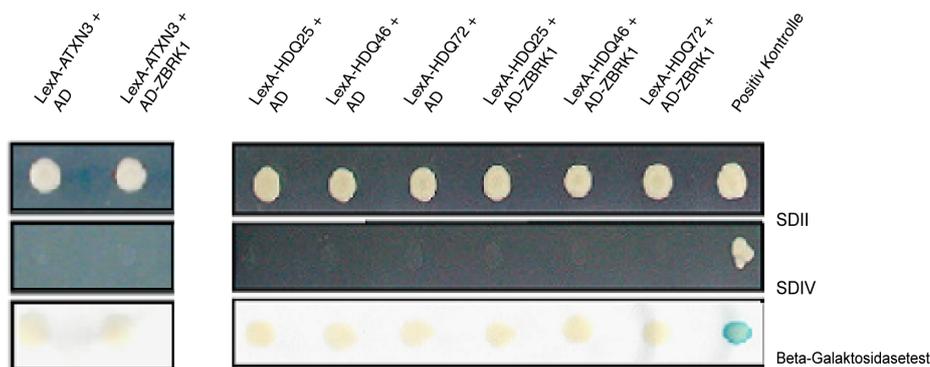


Abbildung 4: ZBRK1 interagiert nicht mit ATXN3 und Huntingtin. Hefezellen wurden mit den entsprechenden *prey* – und *bait* – Plasmide transformiert und für drei Tage auf SDII-, SDIV- Festmedium und einer SDII-Membran inkubiert. Eine Interaktion zeichnet sich durch Wachstum auf SDIV-Festmedium sowie einer Blaufärbung der Zellen im β -Galaktosidase-Test aus. Als Positiv-Kontrolle diente die Interaktion zwischen LexA-ATXN2₈₁₆₋₁₃₁₂ und AD-PABC. Eine Autoaktivität der *bait* – Plasmide wurde durch eine Transformation mit dem *prey*-Vektor pACT4-1b ausgeschlossen.

Wie der Abbildung 4 zu entnehmen ist, ließ sich bei entsprechenden Hefetransformanten keine Reporterogenaktivität, und somit weder ein Wachstum auf SDIV-Medium noch eine Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test nachweisen. Demzufolge kann ausgeschlossen werden, dass eine Interaktion zwischen ZBRK1 und ATXN3 sowie HD mit normalem bzw. expandiertem Polyglutaminbereich im Y2H stattfindet. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich auf eine spezifische Interaktion zwischen ZBRK1 und ATXN2 im Y2H schließen, welche mit zunehmender Länge des

Polyglutaminbereichs beeinträchtigt wird. Demzufolge könnte diese Interaktion für die Pathogenese von *SCA2* relevant sein.

3.1.2 ZBRK1 und ATXN2 interagieren in Säugerzellen

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich die Interaktion zwischen ZBRK1 und ATXN2 auf das humane System übertragen lässt. Folglich wurden für Ko-IP-Experimente zunächst Hek293T-Zellen, zur Überexpression von ZBRK1, mit dem Plasmid pTL-FLAG-ZBRK1 oder pTL-FLAG als Kontrolle transfiziert. Je 1 mg Zelllysate wurde mit ATXN2-Antikörper wie in 2.1.8 beschrieben inkubiert. Um eine unspezifische Bindung der FLAG-Region an die Dynabeads nachzuweisen, wurde jeweils ein Ansatz ohne Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einem spezifischen ZBRK1-Antikörper inkubiert.

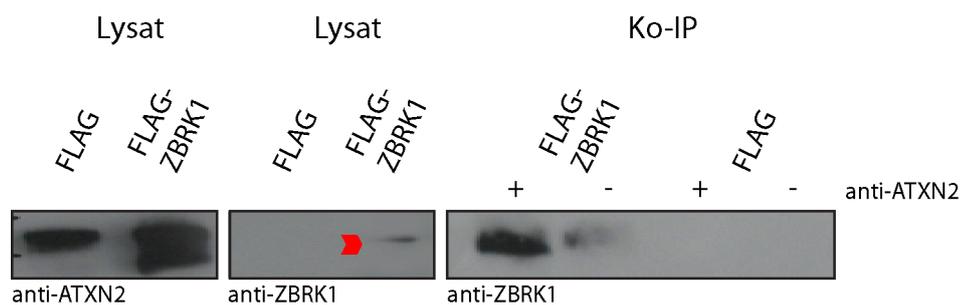


Abbildung 5: Interaktion zwischen ZBRK1 und endogenem ATXN2 in humanen Zellen. Hek293T Zellen wurden mit dem Plasmid FLAG-ZBRK1 und dem entsprechenden Kontrollplasmid transfiziert und lysiert. 1 mg Zelllysate wurde mit 3 µl anti-ATXN2-Antikörper inkubiert. Als Kontrolle diente ein identischer Ansatz ohne Primärantikörper. Präzipitierte Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit anti-ZBRK1 Antikörper nachgewiesen.

Wie der Abbildung 5 zu entnehmen ist, konnte das Protein FLAG-ZBRK1 mit einem ATXN2-spezifischen Antikörper präzipitiert werden. In Kontrolllysaten hingegen konnte keine ZBRK1-Präzipitation nachgewiesen werden. Somit konnte die Interaktion zwischen endogenem ATXN2 und ZBRK1 auch mittels Ko-IP in Säugerzellen nachgewiesen werden.

3.1.3 Lokalisation von ZBRK1 und ATXN2 in Säugerzellen.

In einem nächsten Schritt sollte die zelluläre Lokalisation beider Proteine mikroskopisch untersucht werden. Bisherige Lokalisierungsstudien mit ZBRK1, welche auf Zellen, die das Fusionsprotein GFP-ZBRK1 exprimierten, zurückzuführen sind, beschreiben den transkriptionellen Regulator ausschließlich als Kernprotein[123]. Mikroskopische Analysen und Untersuchungen mittels Zellfraktionierung ergaben, dass ATXN2 vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert sowie teilweise mit dem Golgi-Apparat assoziiert vorliegt [82]. Interessanterweise konnte aber gezeigt werden, dass der Einsatz von verschiedenen ATXN2-Antikörpern in unterschiedlichen ATXN2-Lokalisierungen sowie -Expressionsmustern resultiert. So konnte zum Beispiel eine Assoziierung von ATXN2 mit dem Trans-Golgi-Netzwerk in PC12 Zellen aus der Ratte beobachtet werden, welche sich allerdings in humanen HeLa- oder SY5Y-Zellen nicht bestätigen ließ [124]. Außerdem ließ sich in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers eine Lokalisierung von ATXN2 im Zytoplasma, am Golgi-Apparat und teilweise im Zellkern nachweisen [82, 124]. Zusätzlich ergaben Studien im SCA1-Drosophila-Modell, dass ATXN2 mit den, für SCA1 charakteristischen, pathogenen ATXN1-nukleären Inklusionskörperchen assoziiert ist [62].

Aufgrund einer sehr geringen Expression von ZBRK1 in humanen Zellen, wie es in Abbildung 6 illustriert ist, basieren die bisherigen Untersuchungen zu ZBRK1 auf Überexpressionsanalysen.

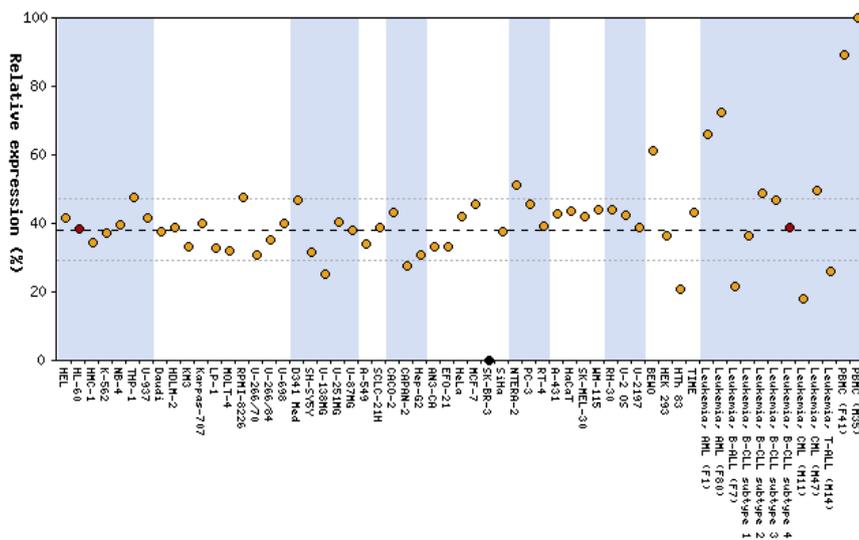


Abbildung 6: Relative Genexpression von ZBRK1 in humanen Zelllinien. Die hier dargestellten Expressionslevel von ZBRK1 beziehen sich auf den humanen Proteinatlas (www.proteinatlas.org/ Juli 2010).

Wie bereits erwähnt, wurden aufgrund der geringen Expression von ZBRK1 in humanen Zellen Lokalisierungsstudien bisher ausschließlich mit GFP-ZBRK1-Fusionsproteinen durchgeführt. Zusätzlich stand während dieser Arbeit kein geeigneter anti-ZBRK1-Antikörper für die mikroskopischen Untersuchungen zur Verfügung. Demzufolge wurden die folgenden Lokalisierungsstudien mit zwei unterschiedlichen ZBRK1-Fusionsproteinen durchgeführt. Dafür wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit dem Plasmid FLAG-ZBRK1 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und ZBRK1 mittels anti-FLAG-Antikörpern visualisiert.

Interessanterweise ergab diese Analyse, dass Zellen mit transients Expression des Proteins FLAG-ZBRK1 zwei unterschiedliche nukleäre Expressionsmuster aufwiesen (siehe Abbildung 7). Auf der einen Seite ließ sich eine gleichmäßige Verteilung des FLAG-ZBRK1-Proteins im Kern beobachten. Diese wurde bereits durch Überexpression eines GFP-ZBRK1 Fusionsproteins in vorherigen Arbeiten beobachtet [123]. Auf der anderen Seite wurden nukleäre ZBRK1-Foci beobachtet, welche bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurden.

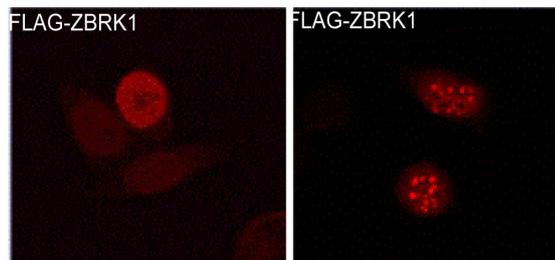


Abbildung 7: Kernlokalisierung des Proteins FLAG-ZBRK1: HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert und die Ansätze für 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit einem FLAG-spezifischen Antikörper behandelt.

Demzufolge sollten im nächsten Schritt diese ZBRK1-Foci näher untersucht werden. Verschiedene nukleäre Strukturen, wie zB. Cajal-Nukleärkörperchen, PML-Nukleärkörperchen, nukleäre- *speckles* und *paraspeckles* wurden bisher beschrieben. Interessanterweise wurde beschrieben, dass ein Interaktionspartner von ZBRK1, BRCA1 (*breast cancer 1, early onset*), mit PML-Nukleärkörperchen (PML-NB) assoziiert vorliegt [125]. Aufgrund dieser Tatsache sollte anhand mikroskopischer Analysen untersucht werden, ob ZBRK1 ebenfalls ein Bestandteil von PML-NBs sein

könnte. Dafür wurden HeLa-Zellen entsprechend vorbereitet und das Fusionsprotein HA-ZBRK1 sowie endogenes PML-Protein mittels spezifischer Antikörper visualisiert.

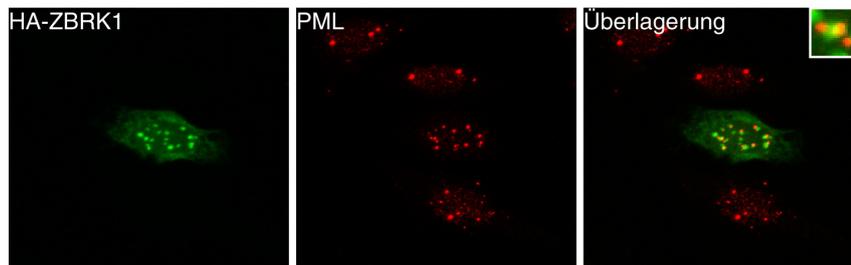


Abbildung 8: ZBRK1 assoziiert mit PML-Nukleärkörperchen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert und die Ansätze für 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt.

Die Abbildung 8 verdeutlicht eine Assoziation zwischen ZBRK1 und endogenen PML-Foci. Demzufolge sind die Ergebnisse ein Beleg dafür, dass ZBRK1 unter bestimmten zellulären Bedingungen mit PML-NBs assoziiert.

Wie bereits eingangs erwähnt, wird ATXN2 vorwiegend als zytoplasmatisches Protein beschrieben. Dennoch weisen einige Analysen mit ATXN2-Fusionsproteinen oder Lokalisierungsstudien von postmortalen Gewebeproben auf eine potentielle Kernlokalisierung von ATXN2 hin [82, 126]. Demzufolge sollte im Folgenden eine putative Kernlokalisierung von ATXN2 mittels unterschiedlicher anti-ATXN2-Antikörper genauer untersucht werden.

Im Zuge dessen wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und nach einer 24-stündigen Inkubation wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. Zur Visualisierung von endogenem ATXN2 wurde neben dem bisher verwendeten ATXN2-Antikörper der Firma BD-Bioscience ein weiterer spezifischer Antikörper der Firma Bethyl eingesetzt, welcher gegen ein anderes C-terminales Epitop von ATXN2 gerichtet ist.

Die mikroskopischen Analysen ergaben (siehe Abbildung 9), dass ATXN2 die bereits beschriebene und vorwiegende zytoplasmatische Lokalisierung aufwies. Dennoch konnte mittels beider Antikörper auch eine eindeutige Visualisierung von ATXN2 im Zellkern beobachtet werden.

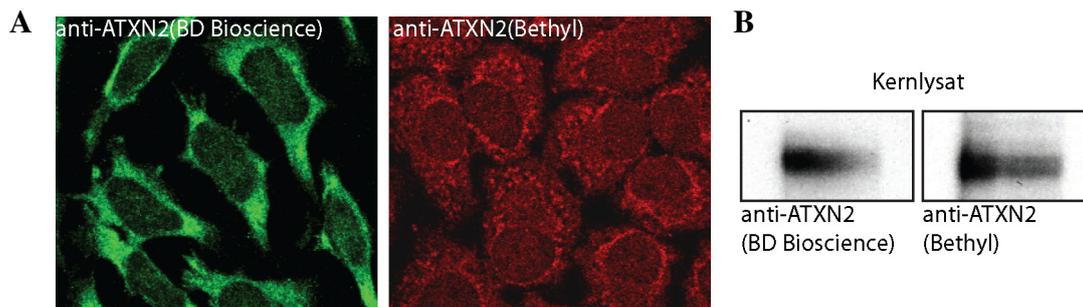


Abbildung 9: ATXN2 lokalisiert im Kern. (A) HeLa-Zellen wurde auf Deckgläschen ausgesät, für 24 h inkubiert, fixiert, mit anti-ATXN2-Antikörper behandelt und mikroskopisch analysiert. (B) Proteine aus HeLa-Kernlysaten wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und ATXN2 mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

Um diese Ergebnisse zu stützen, sollte in einem weiteren Schritt geklärt werden, ob die Expression von ATXN2 im Zellkern ebenfalls per Immunoblot nachgewiesen werden kann. Dafür wurden die Proteine von HeLa-Kernlysaten (SantaCruz) mittels SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und ATXN2 unter Einsatz der beschriebenen Antikörper detektiert. Wie der Abbildung 9 zu entnehmen ist, konnte endogenes ATXN2-Protein mit beiden spezifischen Antikörpern in HeLa-Kernlysaten nachgewiesen werden. Demzufolge sind diese Ergebnisse ein weiterer Beleg dafür, dass ATXN2 in humanen Zellen sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert und exprimiert wird.

Abschließend sollte mittels konfokaler Mikroskopie untersucht werden, ob ATXN2 und der transkriptionelle Regulator ZBRK1 im Zellkern ko-lokalisieren und miteinander interagieren. Wie bereits zuvor erwähnt, kann das Expressionsmuster von Proteinen innerhalb unterschiedlicher Gewebetypen variieren.

Demzufolge wurden für die mikroskopischen Ko-Lokalisierungsstudien Zelllinien verwendet, welche aus unterschiedlichen Gewebetypen entnommen wurden. Zum einen wurden HeLa-Zellen eingesetzt, welche ursprünglich aus einem Gebärmutterhalskarzinom isoliert wurden, und wie zuvor gezeigt, nukleäres ATXN2 exprimieren (siehe Abbildung 10). Zusätzlich wurden U2OS-Zellen verwendet, die aus einem Osteosarkom isoliert wurden und vorwiegend in Expressions-Analysen mit ZBRK1-Fusionsproteinen eingesetzt wurden.

Entsprechend wurden HeLa- und U2OS-Zellen, welche transient FLAG-ZBRK1, bzw. HA-ZBRK1 exprimierten, wie in Material und Methoden beschrieben behandelt und ZBRK1 sowie ATXN2 mit entsprechenden Antikörpern visualisiert.

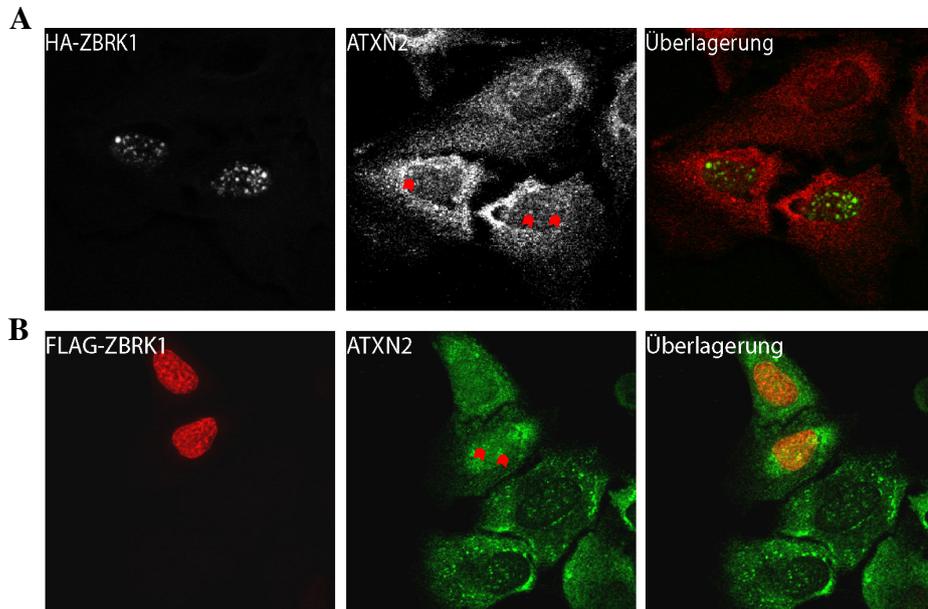


Abbildung 10: ZBRK1 und ATXN2 kolokalisieren im Kern. (A) HeLa-Zellen bzw. (B) U2OS-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert und für 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Anhand der Abbildung 10 wird ersichtlich, dass bei HeLa-Zellen, welche ZBRK1-positiv markierte Foci aufwiesen, eine Kolokalisierung mit ATXN2 in den nukleären Körperchen beobachtet werden konnte. Ebenso zeigten U2OS-Zellen im Zellkern eine Kolokalisierung beider Proteine. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich die Aussage treffen, dass die Assoziierung zwischen beiden Proteinen vorwiegend im Zellkern stattfindet.

Abschließend sollten diese Ergebnisse durch Ko-IP-Experimente gestützt werden. Dazu wurden 250 µg HeLa-Kernlysate mit anti-ZBRK1-Antikörper versetzt und über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Ansätze mit Dynabead-gekoppelten Sekundärantikörper versetzt. Um eine potentielle unspezifische Bindung an die Dynabeads zu überprüfen, wurde ein Ansatz nur mit Sekundärantikörper inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und die präzipitierten Proteine mit entsprechenden Antikörpern visualisiert.

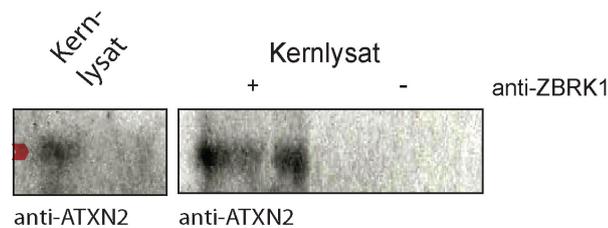


Abbildung 11: ZBRK1 und ATXN2 interagieren im Zellkern. 250 μ g HeLa-Kernlysät (Santa Cruz) wurde mit 1 μ l anti-ZBRK1-Antikörper inkubiert. Ein Ansatz ohne Primärantikörper diente als Kontrolle. Präzipitiertes ATXN2 wurde mittels Immunoblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Wie Abbildung 11 illustriert, zeigen die Ko-IP-Experimente, dass ATXN2 mit einem spezifischen anti-ZBRK1-Antikörper aus Kernlysaten präzipitiert werden konnte. Im Kontrollansatz hingegen konnte kein präzipitiertes ATXN2 beobachtet werden. Demzufolge konnte die Interaktion zwischen ZBRK1 und ATXN2, welche zuvor im Y2H identifiziert und validiert wurde, auch in Säugerzellen bestätigt werden. Zudem deutet diese Analyse darauf hin, dass eine Assoziierung beider Proteine vorwiegend im Zellkern stattfindet. Dies lässt vermuten, dass ATXN2, durch seine Interaktion mit dem transkriptionellen Regulator ZBRK1 eine Funktion in der transkriptionellen Regulation besitzen könnte, welche im Rahmen dieser Arbeit weitergehend untersucht wurde.

3.2 Eine Überexpression von ZBRK1 beeinflusst die intrazelluläre ATXN2-Konzentration

Die vorangegangenen mikroskopischen Analysen führten zu der Beobachtung, dass Zellen, die eine transiente Überexpression des FLAG-ZBRK1-Proteins aufwiesen, im Gegensatz zu nicht transfizierten Zellen eine erhöhte Immunreaktivität von ATXN2 aufzeigten (siehe Abbildung 10). Dies führte zu der Annahme, dass der transkriptionelle Regulator ZBRK1 an der Regulation von ATXN2 beteiligt sein könnte. Um dies zu untersuchen, sollte im folgenden Schritt eine potentielle Korrelation zwischen ZBRK1 und ATXN2 auf Proteinebene analysiert werden.

Hierfür wurden Hek293T-Zellen mit dem Expressionsplasmid pCMV-MYC-ZBRK1 oder pCMV-MYC als Kontrolle transfiziert, anschließend lysiert und wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mittels spezifischer anti-MYC- und anti-ATXN2-Antikörper (siehe 2.1.8).

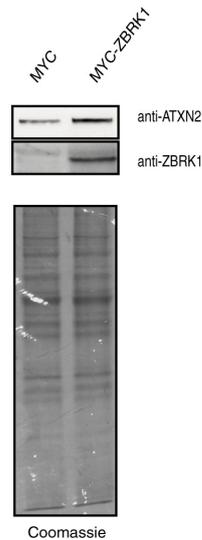


Abbildung 12: Überexpression von ZBRK1 führt zu einer erhöhten intrazellulären ATXN2 Konzentration. Hek293T-Zellen wurden mit dem Plasmid MYC-ZBRK1 transfiziert, für 48 h inkubiert und lysiert. 15 µg Gesamt-Protein-Lysat wurde elektrophoretisch aufgetrennt und ATXN2 sowie ZBRK1 anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Zur Kontrolle gleichmässiger Proteinkonzentrationen wurde ein Gel mit Coomassie gefärbt.

Die Immunoblot-Analyse ergab, dass eine erhöhte ZBRK1-Konzentration zu einem Anstieg des intrazellulären ATXN2-Levels führte (siehe Abbildung 12). Dies stärkt die Beobachtungen der vorangegangenen mikroskopischen Analyse, dass ein erhöhter ZBRK1-Proteinlevel mit einem erhöhten ATXN2-Level korreliert.

Infolgedessen sollte nachfolgend der Einfluss eines geringeren ZBRK1-Levels auf die ATXN2-Konzentration untersucht werden. Hierfür wurden Hek293T-Zellen mit einem Pool an verschiedenen ZBRK1-siRNA-Molekülen (siehe 2.2.26) transfiziert und die Ansätze für 96 h inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer Kontroll-siRNA (si-NS) transfiziert sowie nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt (mock). Anschließend wurden die Transfektionsansätze lysiert, die Proteine wie in Material und Methoden beschrieben auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunologisch nachgewiesen.

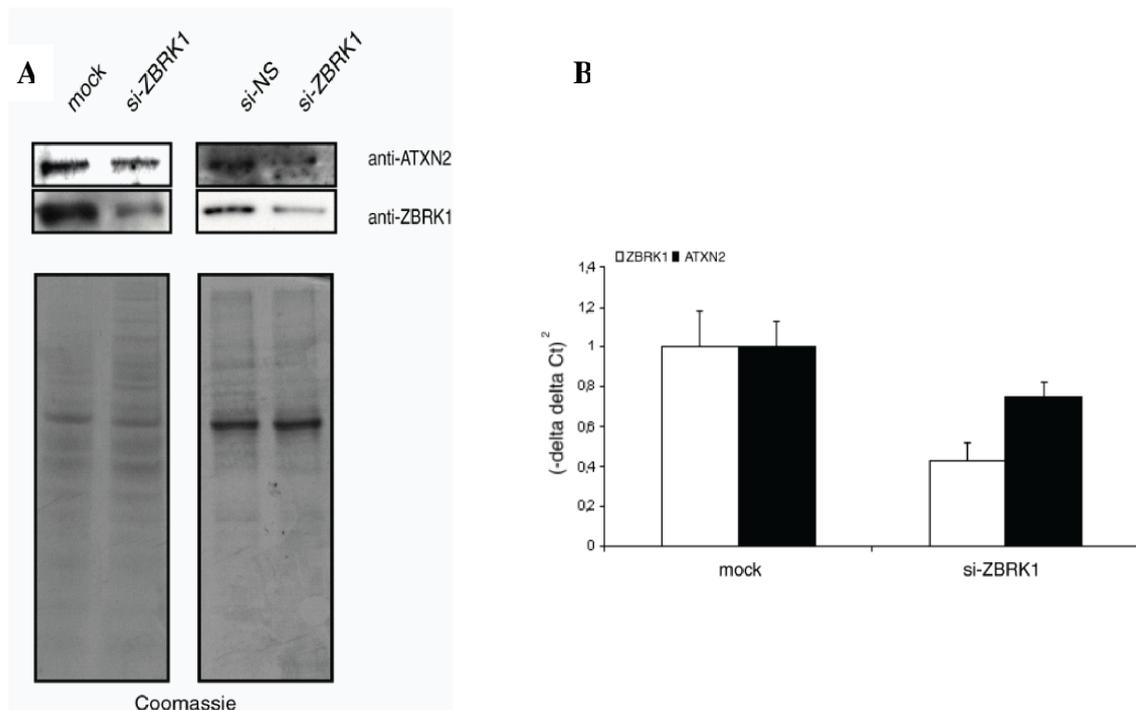


Abbildung 13: Ein reduzierter ZBRK1-Level resultiert in einer verminderten ATXN2-Expression. Hek293T-Zellen wurden in 12-Kammer-Zellkulturplatten ausgesät und für 96 h mit einer gegen ZBRK1 gerichteten siRNA (si-ZBRK1) inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, welche mit einer unspezifischen siRNA (si-NS) oder nur mit dem Transfektionsreagenz (mock) behandelt wurden. (A) Anschliessend wurden die Proteine entweder auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunblotting nachgewiesen oder (B) die Gesamt-RNA isoliert und mittels qPCR analysiert. Zur Überprüfung gleichmäßiger Proteinkonzentrationen wurde eine Gel mit Coomassie behandelt.

Die Analyse ergab, dass Zellen, die mit ZBRK1-siRNA behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (mock) bzw. Zellen, die mit einer unspezifischen siRNA behandelt wurden, eine geringere ATXN2-Konzentration aufwiesen (siehe Abbildung 13A).

Diese Resultate sind ein weiterer Beleg dafür, dass die ATXN2-Konzentration mit der Expression von ZBRK1 korreliert. Demzufolge stellte sich die Frage, ob ZBRK1 direkt an der SCA2-Genexpression beteiligt sein könnte.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Hek293T Zellen in Zweifach-Ansätzen mit siRNA-ZBRK1-Molekülen transfiziert und für 96 h inkubiert. Kontrollzellen (mock) wurden nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert (siehe 2.2.27), durch Reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.28) und die

Genexpression von ZBRK1 und ATXN2 mittels spezifischer Primerpaare in einer quantitativen Real-Time PCR analysiert. Zur internen Normalisierung diente das Haushaltsgen HPRT. Wie in Abbildung 13B zu erkennen ist, sank der Transkriptionslevel von ZBRK1 durch die Behandlung mit der entsprechenden siRNA auf ca. 40 %. Ebenfalls ersichtlich ist eine Reduktion des ATXN2-Transkriptionslevels um etwa 30 %. Dies führte zu der Annahme, dass die Transkription des *SCA2*-Gens durch einen regulatorischen Komplex aus ZBRK1 und ATXN2 reguliert und aktiviert werden könnte.

3.3 Der SCA2-Promotor enthält potentielle ZBRK1-Bindestellen

Um die Hypothese, dass ein Komplex bestehend aus ZBRK1 und ATXN2 an der direkten Regulierung der *SCA2*-Transkription beteiligt sein könnte, weitergehend zu untermauern, wurde im folgenden Schritt untersucht, ob der *SCA2*-Promotor das potentielle ZBRK1-Bindemotiv, welches ursprünglich von Zheng *et al.* [123] isoliert wurde, besitzt. Diese Analyse, welche von Dr. Holger Klein (Abteilung Prof. Vingron/MPIMG) durchgeführt wurde, erfolgte mit der IUPAC-Abfolge GGGnnnCAGnnnTTT oder seiner reversen komplementären Sequenz, wobei bis zu drei Fehlanlagerungen in den außenliegenden Nukleotidtripletts erlaubt waren.

Interessanterweise ergab diese bioinformatische Analyse (siehe Abbildung 14) sieben potentielle ZBRK1-Bindestellen (ZBS) in der Promotorregion des *SCA2*-Gens, die sich innerhalb der Sequenz, welche die Region 500 bp stromaufwärts und 300 bp stromabwärts vom Transkriptionsstart (TSS) umfasst, befinden.

Zur Validierung dieser putativen Bindestellen im *SCA2*-Promotor wurden im Rahmen dieser Arbeit Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente (ChIP) durchgeführt. Hierbei wurde der Fokus auf vier Bindestellen gesetzt: ZBS1 und ZBS2, welche sich in der Nähe des TSS befinden und teilweise überlappen; ZBS3, welches sich in einer nicht-konservierten Region des Promotors befindet sowie ZBS4, welches sich im Exon 1 der kodierenden Sequenz des *SCA2*-Gens befindet.

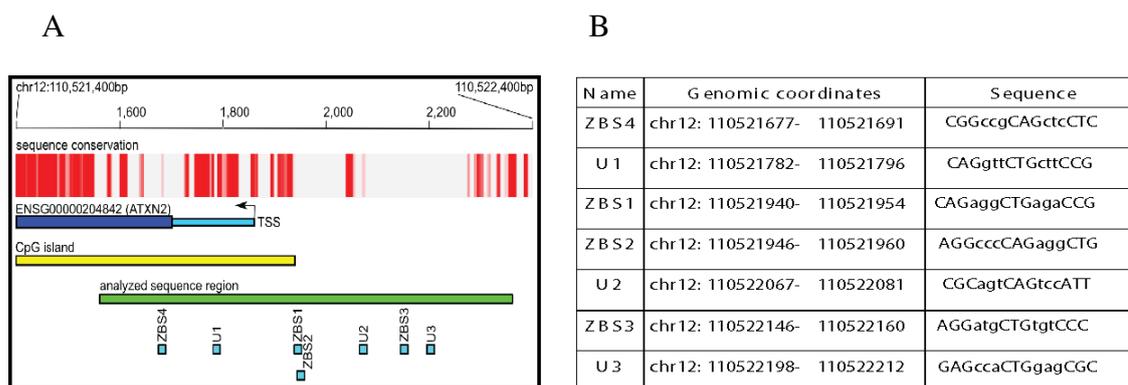


Abbildung 14: Potentielle ZBRK1-Bindestellen im SCA2-Promotor. (A) Darstellung der genomischen Ortsbestimmung des SCA2-Promotors bezogen auf Ensembl 46/NCBI36. Konservierte Regionen wurden in rot dargestellt. Die untersuchte Region im SCA2-Promotor wurde in grün, das Exon1 des SCA2-Gens in blau und die 3'UTR in Türkis dargestellt. Abschnitte mit potentiellen ZBRK1-Bindestellen wurden ebenfalls Türkis hervorgehoben. Zu untersuchende Bindestellen wurden als ZBS 1-4, nicht zu untersuchende Bindestellen als U 1-3 bezeichnet. (B) Lokalisation und Sequenz der potentiellen ZBRK1-Bindestellen im SCA2-Promotor. Basen in Großbuchstaben entsprechen in der Sequenz den konservierten Regionen im ZBRK1-SELEX-Motiv V\$ZBRK1_01. In Fettschrift dargestellte Basen entsprechen Nukleotiden, die im SELEX-Set mindestens einmal an dieser Position erschienen sind. Die aufgelisteten genomischen Koordinaten beziehen sich auf Ensembl 46 / NCBI36.

Die Analyse der potentiellen Bindestellen wurde in MCF-7-Zellen durchgeführt, da diese im Vergleich zu Hek293T-Zellen eine zweifach höhere endogene ZBRK1-Konzentration aufweisen (siehe Abbildung 6).

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurden MCF-7-Zellen auf entsprechenden Platten ausgesät, bis zu einer Konfluenz von 80-90 % inkubiert und anschließend mit Formaldehyd inkubiert (siehe 2.2.24). Danach wurden die Zellkerne in mehreren Lysesritten isoliert und sonifiziert. Der Pool an 800-1200 bp langen Chromatin-DNA-Fragmenten wurde mit spezifischen Antikörper gegen ZBRK bzw. ATXN2 über Nacht inkubiert und anschließend mit Protein-A-gekoppelten Dynabeads präzipitiert. Um eine unspezifische Bindung der Chromatin-DNA an die magnetischen Dynabeads auszuschließen, wurde ein Kontrollansatz ohne Primäntikörper inkubiert. Anschließend wurden die präzipitierten Proben eluiert und die Quervernetzung zwischen Chromatin-DNA, Proteinen und RNA aufgehoben. Abschließend erfolgte der Abbau der RNA sowie der Proteine mittels RNase A- und Protease K-Behandlung. Die verbliebenen Chromatin-DNA-Fragmente wurden aufgereinigt und die zu untersuchenden ZBRK1-Bindestellen ZBS1+2, ZBS3 sowie ZBS4 anschließend anhand spezifischer Sequenz-flankierender Primerpaare (siehe Tabelle 14) über quantitative

Real-Time PCR (qPCR) analysiert. Als Negativkontrolle diente der chromosomale Abschnitt chr5:132037145-132037263 im Gen von IL-4.

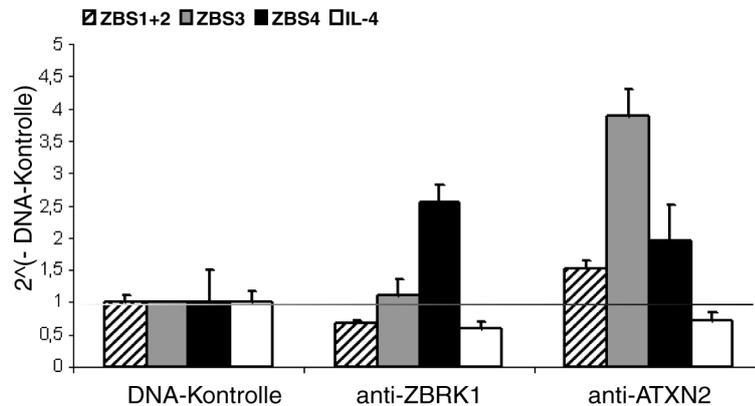


Abbildung 15: Validierung der potentiellen ZBRK1-Bindestellen durch Chromatin-Immunpräzipitationsexperimente. MCF-7-Zellen wurden auf 15 mm Zellkulturplatten ausgesät, bis zu einer Konfluenz von 80-90 % inkubiert, lysiert und sonifiziert. Die geschärte Chromatin-DNA wurde mit spezifischen Antikörpern gegen ZBRK1 und ATXN2 präzipitiert und aufgereinigt. Die angereicherte DNA wurde mittels qPCR und spezifischen Primer für die Bindestellen ZBS1-4 analysiert. Die Region 132037145-132037263 auf Chromosom 5 diente als Kontrolle (IL-4). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

Die qPCR-Analyse ergab (siehe Abbildung 15), dass bei Einsatz des ZBRK1-Antikörpers Chromatin-DNA-Fragmente, welche das Bindemotiv ZBS4 beinhalten, präzipitiert und im Vergleich zum Kontrollansatz um das 1,5-fache angereichert werden konnten. Ebenso war es möglich, DNA-Fragmente zu präzipitieren, welche das Bindemotiv ZBS3 enthielten. Eine Anreicherung der Bindestellen ZBS1+2 konnte unter den eingesetzten Bedingungen nicht beobachtet werden. Ebenso ließ sich keine Anreicherung der IL4-Kontrolle beobachten.

Interessanterweise konnten mit einem spezifischen ATXN2-Antikörper ebenfalls die Bindestellen ZBS3 und ZBS4, im Vergleich zur DNA-Kontrolle, um das 3-fache bzw. das Doppelte angereichert werden. Zusätzlich konnten DNA-Fragmente, welche die Bindestellen ZBS1+2 enthielten, präzipitiert und um das 0,5-fache angereichert werden. Die Negativkontrolle ließ sich hier ebenfalls nicht anreichern.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ein ZBRK1/ATXN2-Komplex über ZBRK1 an die ZBRK1-Bindestellen im *SCA2*-Promotor bindet und die *SCA2*-Transkription direkt reguliert.

3.3.1 Ein Komplex bestehend aus ZBRK1 und ATXN2 aktiviert den SCA2-Promotor

Die identifizierten Bindestellen im SCA2-Promotor sowie die bisherigen Analysen, welche sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptebeine (siehe Abbildung 14 und 15) eine Korrelation zwischen der Expression von ZBRK1 und der von ATXN2 aufwiesen (siehe Abbildung 12 und 13), deuten darauf hin, dass der ZBRK1/ATXN2-Komplex an der Aktivierung des SCA2-Gens beteiligt sein könnte. Um nachzuweisen, dass beide Proteine für die transkriptionelle Aktivierung des SCA2-Gens essentiell sind, wurde der SCA2-Promotor mittels Promotoranalysen weitergehend untersucht.

Demzufolge wurden über homologe Rekombination zwei Promotorkonstrukte generiert, von denen pGL3-ATXN2-Exon1 die ZBRK1-Bindestellen ZBS1-4 und pGL3-ATXN2 die ZBS1-3 enthielt (siehe 2.2.30). Für die Promotoranalysen wurden Hek293T-Zellen mit dem entsprechenden SCA2-Luziferase-Promotorkonstrukten sowie mit dem Plasmid pCMV-HA-ZBRK1 bzw. pCMV-MYC-ATXN2Q22 transfiziert. Als Kontrolle diente ein identischer Ansatz, wobei Hek293T-Zellen mit den Kontrollvektoren pCMV-HA bzw. pCMV-MYC transfiziert wurden. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert, die Reportergenaktivität der *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase gemessen und in Relation zueinander berechnet.

Diese Promotoranalyse ergab (siehe Abbildung 16), dass die Überexpression des ZBRK1-Proteins zu einer Aktivität des SCA2-Promotors führte. So konnte im Vergleich zur Kontrolle bei Anwesenheit aller vier Bindestellen eine Luziferaseaktivität von 80, bei Anwesenheit der Bindestellen ZBS1-3 nur von 30 beobachtet werden. Auch führte die Überexpression von ATXN2 bei Vorhandensein aller vier Bindemotive zu einer höheren Aktivierung des SCA2-Promotors, welche bei Anwesenheit der Bindestellen ZBS1-3 eine Luziferaseaktivität von 15 aufwies. Somit konnte, im Vergleich zur Überexpression des MYC-Kontrollvektors, bei Vorhandensein der ZBRK1-Bindemotive 1-3 keine Aktivierung des SCA2-Promotors beobachtet werden.

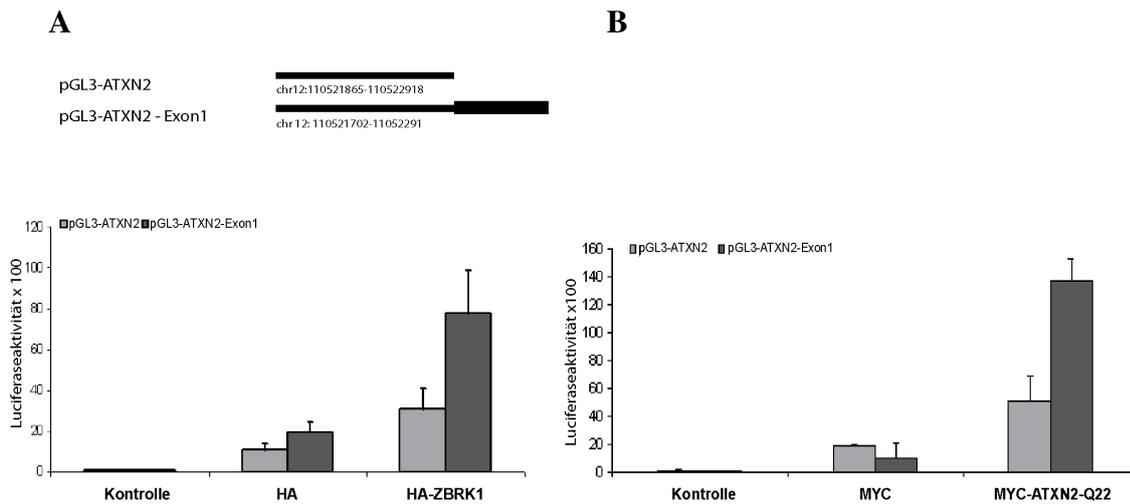


Abbildung 16: Eine Überexpression von ZBRK1 und ATXN2 führten zu einer Aktivierung des SCA2-Promotors. Hek293T-Zellen wurden in 96-Kammer-Zellkulturplatten ausgesät und mit den Plasmiden pRL-TK *Renilla*, pGL3-ATXN2 oder pGL3-ATXN2-Exon1 transfiziert. Zusätzlich wurden die Ansätze entweder mit dem Plasmid (A) pCMV-HA-ZBRK1 oder (B) pCMV-MYC-ATXN2Q22 behandelt. Die Expression der pGL3-*Firefly*-Luziferase sowie der Plasmide pCMV-HA bzw. pCMV-MYC dienten als Kontrolle. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert, die Reporteraktivität gemessen und in Relation zur Expression der *Renilla*-Luziferase berechnet. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich die Aussage treffen, dass ZBRK1 in der transkriptionellen Aktivierung des *SCA2*-Gens involviert ist. Zudem führen diese Ergebnisse zu der Annahme, dass ATXN2 im ZBRK1/ATXN2-Komplex als Ko-Aktivator fungiert und dementsprechend ebenfalls an der Aktivierung der *SCA2*-Transkription beteiligt ist.

3.4 Herstellung von Intrabodies mit interferierenden Eigenschaften für die Interaktion von ZBRK1 und ATXN2

Um weitergehend zu untermauern, dass ATXN2 ein transkriptioneller Ko-Aktivator von ZBRK1 ist, sollten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Zoltán Konthur Intrabodies generiert werden, welche spezifisch für eine Protein-Protein-Interaktion interferierende Eigenschaften besitzen. Hierbei handelt es sich um intrazelluläre Antikörper, welche aus dem sogenannten scFv-Unterfragment des Immunglobulin G-Proteins bestehen. Dies entspricht den variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Kette, welche durch eine Peptidverbindung stabilisiert wird. Ein

beachtlicher Vorteil dieser Technologie gegenüber der RNA-Interferenz besteht darin, dass die zelluläre Konzentration des Zielproteins, welches spezifisch vom Intrabody erkannt und gebunden wird, nicht verändert wird, sondern dessen Protein-Protein-Interaktionen gezielt unterbunden werden. Diese Methode basiert auf einer kombinierten *in vitro*- und *in vivo*- Analyse in welcher mittels Phagen-Display Protein-spezifische Antikörperfragmente angereichert werden, die anschließend in einer reversen Y2H-Analyse auf interferierende Eigenschaften selektioniert werden (siehe Abbildung 17)

Wie in Abbildung 17 schematisch dargestellt, wurden für die Generierung der Intrabodies mittels Phagen-Display potentiell ZBRK1-bindende scFv-Fragmente des Immunglobulin G-Proteins isoliert (durchgeführt von Carola Stochek und Jeanine Wilde). Für deren Anreicherung wurde das biotinylierte Fusionsprotein ZBRK1-CT in *E. coli* exprimiert und putativ bindende Antikörperfragmente aus einer humanen scFV-Bibliothek mittels magnetischer Dynabeads wie in Material und Methoden beschrieben aufgereinigt. Die angereicherten ZBRK1-CT-spezifischen Antikörperfragmente wurden anschließend mittels PCR amplifiziert und in den Hefe-Expressionsvektor pIB-NLS kloniert. Nachfolgend wurde die pIB-NLS-ZBRK1-Bibliothek in einer entsprechenden Y2H-Analyse auf Protein-Protein-interferierende Eigenschaften untersucht. Dazu wurde der Hefestamm L40ccuA/ade, welcher die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA-ATXN2(Q22)₁₋₃₉₆ exprimiert, mit der angereicherten ZBRK1-Intrabodybibliothek (pIB-NLS-ZBRK1) transformiert und die Transformanten auf SDIII-Festmedium ausplattiert. Eine unspezifische Bibliothek an scFV-Antikörperfragmenten (pIB-NLS-naiv) diente als Kontrolle. Anschließend wurden jeweils 3x 384 Hefetransformanten isoliert und auf SDIII- und SDV- Selektionsmedium übertragen. Nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C wurden die Hefetransformanten auf Aktivität der Reportergene untersucht.

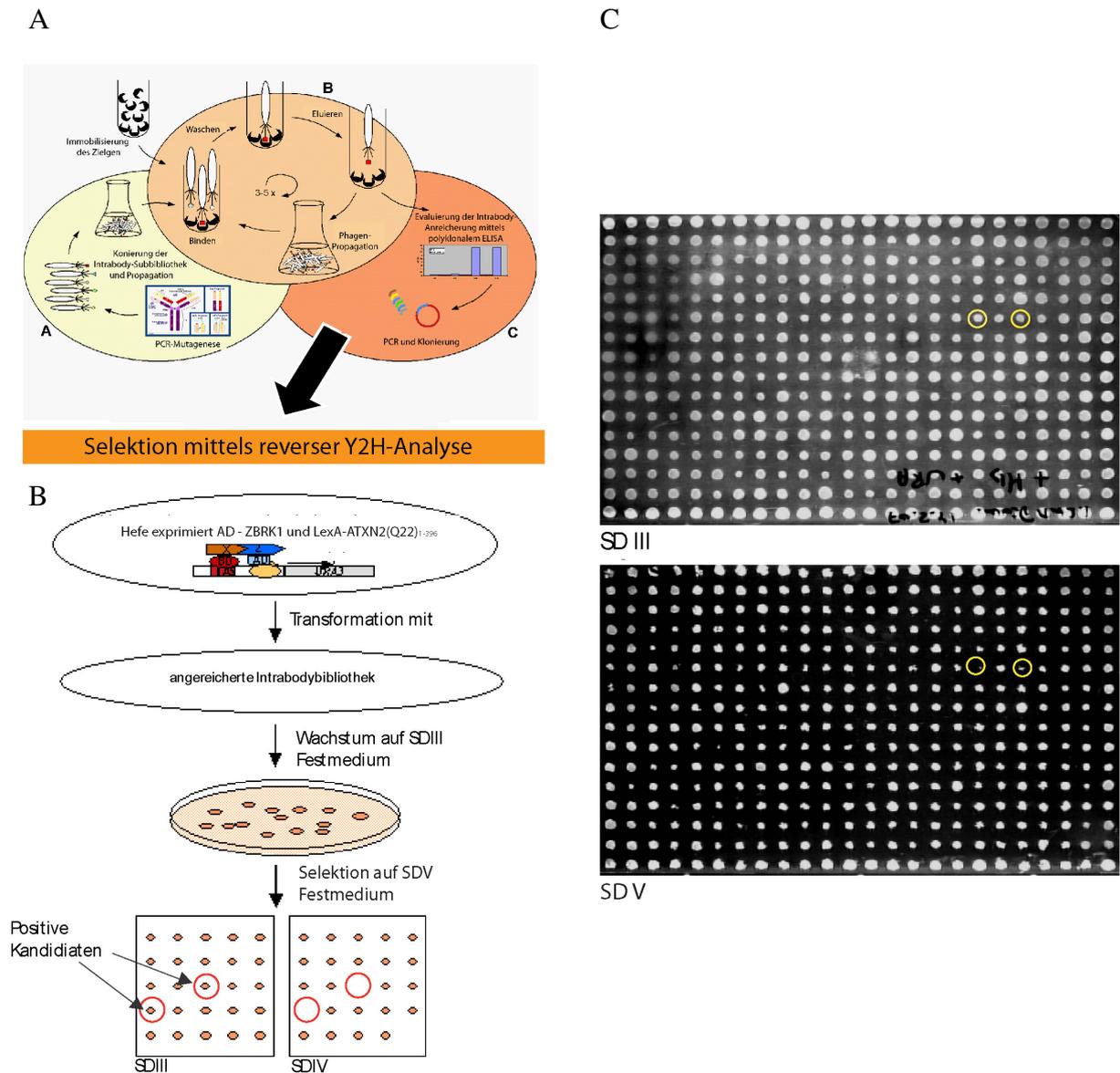


Abbildung 17: Beeinträchtigung der Interaktion zwischen ZBRK1 und ATXN2 durch Intrabodies.

(A) Die ZBRK1-Intrabodybibliothek wurde mittels Phagen-Display und ELISA-Test angereichert, anschließend (B) in den Hefestamm L40ccuA/ade, welcher die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA- ATXN2(Q22)₁₋₃₉₆ exprimierte, transformiert und auf SDIII-Platten inkubiert. Die Transformation einer nicht angereicherten Intrabodybibliothek diente als Kontrolle. 3x 384 Transformanten wurden, wie in (C) beispielhaft dargestellt, auf SDIII- und SDV-Festmedium überführt, für weitere 3 Tage inkubiert und anschließend das Wachstum analysiert. Die Expression eines interferierenden Intrabodys zeichnete sich durch fehlendes Wachstum auf SDV-Medium aus.

Wie in Abbildung 17 beispielhaft dargestellt, wurden Transformanten, welche kein bzw. ein schwaches Wachstum auf SDV-Festmedium und somit keine Aktivität der Reporter gene aufwiesen, selektiert. Aufgrund der fehlenden Reporter genaktivität ließ

sich auf die Expression eines Intrabodys schließen, welcher die Interaktion von ZBRK1 und ATXN2 beeinträchtigt. Der dafür durchgeführte *in vivo*-Screen führte zur Isolierung von 13 Hefetransformanten, die kein oder nur schwaches Wachstum auf SDV-Platten aufwiesen. Diese wurden anschließend in Flüssigkultur überführt, durch Herstellung von Spheroblasten lysiert und die isolierten Intrabody-Plasmide für die weiterführende Validierung im Hefesystem in *E.coli* transformiert.

Diese weitergehende Analyse, welche von Silke Wehrmeyer in der Arbeitsgruppe von Dr. Sylvia Krobtsch durchgeführt wurde, resultierte in der Isolierung von drei potentiellen Kandidaten, welche als IB-ZBRK1-NT22-5/1, IB-ZBRK1-NT22-6/1 und IB-ZBRK1-NT22-7/1 bezeichnet wurden. Zur abschließenden Validierung im Hefesystem wurde der Hefestamm L40ccuA/ade, welcher das Fusionsprotein AD-ZBRK1-CT in Kombination mit LexA-ATXN2(Q22)₁₋₃₉₆, LexA-ATXN2(Q79)₁₋₃₉₆ und LexA-ATXN2₂₅₄₋₄₇₅ exprimierte, mit den Intrabody-Plasmiden IB-ZBRK1-NT22-5/1, IB-ZBRK1-NT22-6/1 oder IB-ZBRK1-NT22-7/1 bzw. mit einem Kontrollplasmid transformiert. Als zusätzliche Kontrolle dienten Hefezellen, welche die Fusionsproteine AD-PABC1 und LexA-ATXN2₈₁₆₋₁₃₁₂ exprimierten [51]. Nach der Transformation wurden Hefeklonen isoliert, auf Selektionsmedium gestempelt und für drei Tage bei 30 °C inkubiert.

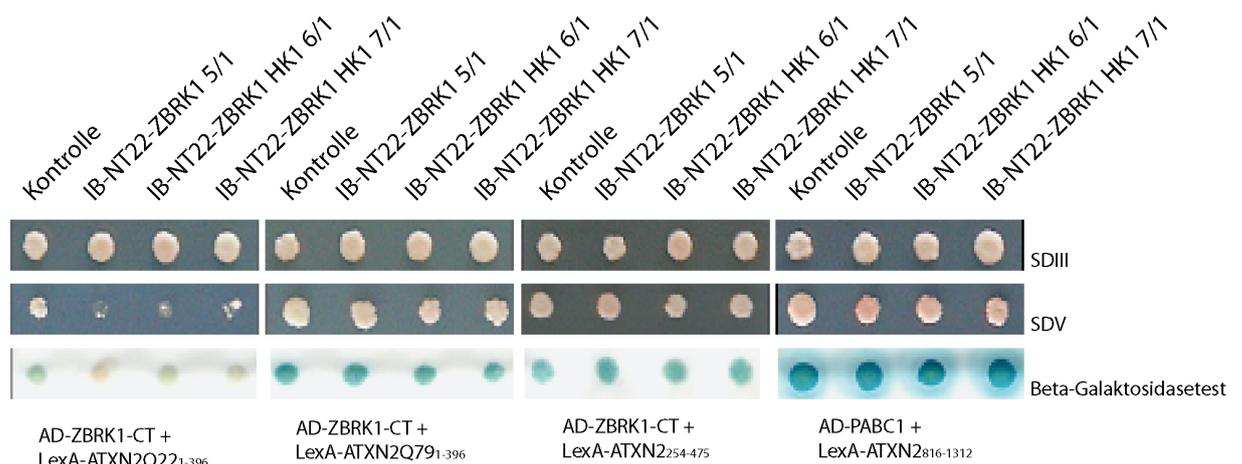


Abbildung 18: Validierung der Intrabodies IB-ZBRK1-NT22-5/1, IB-ZBRK1-NT22-6/1 und IB-ZBRK1-NT22-7/1 im Y2H System. Hefezellen (L40ccuA/ade), welche die Kombinationen der angegebenen bait- und prey-Plasmide enthielten, wurden mit den Plasmiden IB-NT22-ZBRK1-5/1, IB-NT22-ZBRK1-6/1 und IB-NT22-ZBRK1-7/1 transformiert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische

Intrabody-Bibliothek transformiert. Transformanten wurden auf SDIII-, SDV-Festmedium und einer SDIII-Membran für drei Tage kultiviert und das Wachstum anschließend analysiert.

Diese Analyse ergab, dass Hefezellen, welche die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA-ATXN2(Q22)₁₋₃₉₆ exprimierten, bei Expression der Intrabodies IB-ZBRK1-NT22-5/1, IB-ZBRK1-NT22-6/1 und IB-ZBRK1-NT22-7/1, im Vergleich zur Expression eines Kontroll-Intrabodys kein Wachstum auf SDV-Festmedium sowie keine Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test aufwiesen (siehe Abbildung 18). Weitere Transformanten, welche die Fusionsproteine AD-ZBRK1-CT und LexA-ATXN2(Q79)₁₋₃₉₆ bzw. LexA-ATXN2₂₅₄₋₄₇₅ oder AD-PABC1 und LexA-ATXN2₈₁₆₋₁₃₁₂ exprimierten, zeigten sowohl Wachstum auf SDV-Platten als auch eine Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test. Somit konnte kein Einfluss auf die relative Reporteraktivität bei zusätzlicher Expression der Intrabodies IB-ZBRK1-NT22-5/1, IB-ZBRK1-NT22-6/1 und IB-ZBRK1-NT22-7/1 beobachtet werden. Demzufolge konnte gezeigt werden, dass die Intrabodies IB-ZBRK1-NT22-5/1, IB-ZBRK1-NT22-6/1 und IB-ZBRK1-NT22-7/1 spezifisch interferierende Eigenschaften für die Interaktion zwischen AD-ZBRK1 und LexA-ATXN2(Q22)₁₋₃₉₆ im Y2H-System aufweisen.

3.4.1 Validierung der Intrabodies IB-ZBRK1-NT22-5/1, IB-ZBRK1-NT22-6/1 und IB-ZBRK1-NT22-7/1 im humanen System

In einem nächsten Schritt sollte nun die Funktionalität der Intrabodies IB-ZBRK1-NT22-5/1, IB-ZBRK1-NT22-6/1 und IB-ZBRK1-NT22-7/1 im Säugersystem analysiert werden. Demzufolge wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Zoltán Konthur (MPIMG, Berlin) die Intrabody-Sequenzen mittels PCR und den entsprechenden Primern wie in Material und Methoden beschrieben amplifiziert und in den Säugerexpressionsvektor pFlagCMV5a-ccdB kloniert.

Zunächst wurde die Expression der Intrabodies in Säugerzellen untersucht. Dazu wurden Hek293T-Zellen wie in 2.2.17 beschrieben mit den Plasmiden FLAG-IB-ATXN2NT22-ZBRK1-5/1 (FLAG-IB-5/1), FLAG-IB-ATXN2NT22-ZBRK1-6/1 (FLAG-IB-6/1) und FLAG-IB-ATXN2NT22-ZBRK1-7/1 (FLAG-IB-7/1) transfiziert. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Zellen lysiert, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und die Expression der

Intrabodies mittels anti-FLAG-Antikörpern visualisiert. Diese Immunoblot-Analyse ergab, dass die Intrabodies FLAG-IB-6/1 und FLAG-IB-7/1 in Säugerzellen exprimiert wurden. Für den Intrabody FLAG-IB-5/1 hingegen konnte keine Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19A).

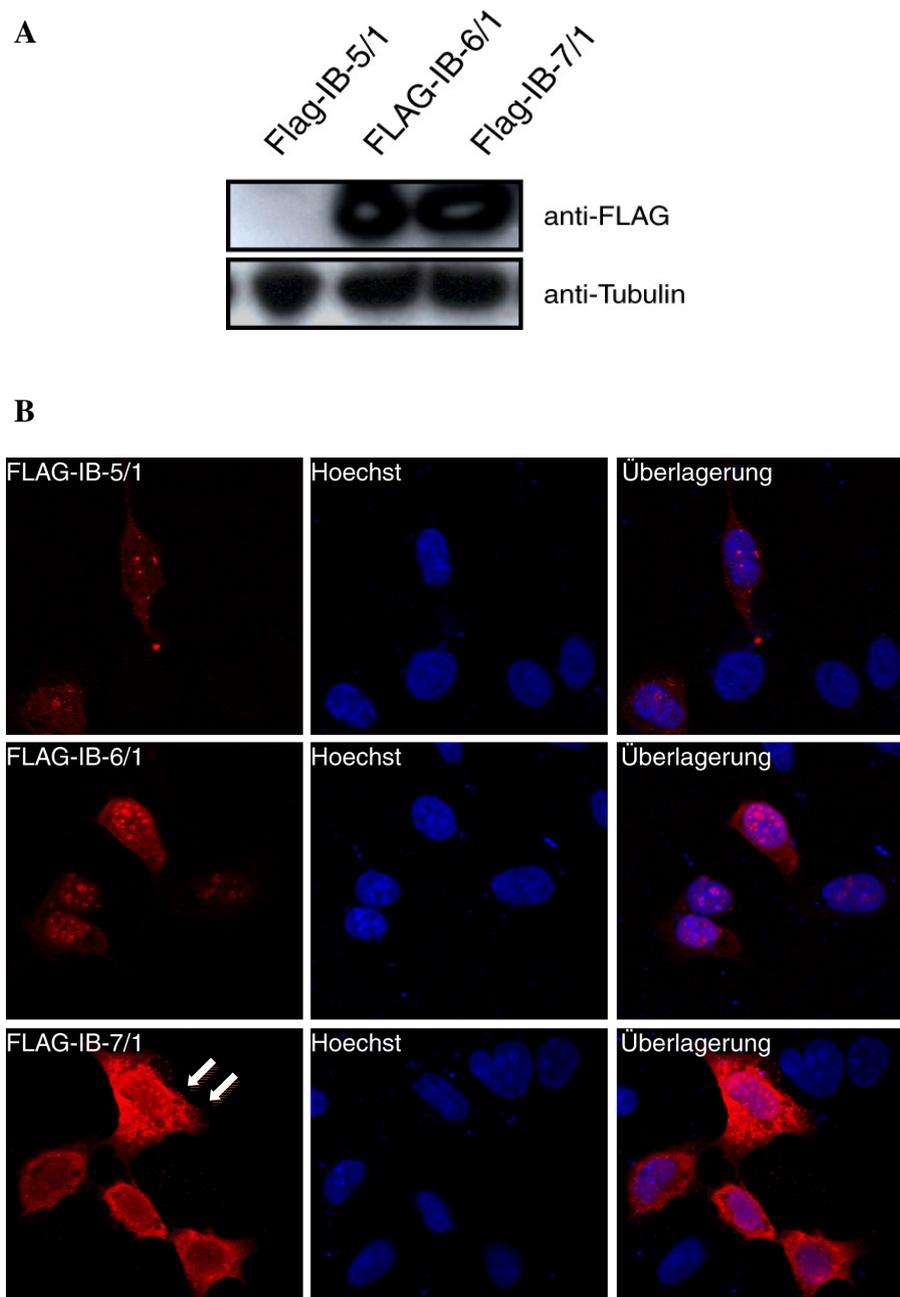


Abbildung 19: Expression der Intrabodies FLAG-IB-5/1, FLAG-IB-6/1 und FLAG-IB-7/1 in humanen Zellen. (A) HeK293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pFlagCMV5a-IB-5/1, pFlagCMV5a-IB-6/1 oder pFlagCMV5a-IB-7/1 transfiziert, für 48 h inkubiert und lysiert. Die Proteine aus 7 µg Gesamtlisat wurden elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit anti-FLAG-Antikörpern nachgewiesen.

Tubulin diente zur Überprüfung einer gleichmäßigen Proteinkonzentration. (B) HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Intrabodies mit anti-FLAG-Antikörpern visualisiert.

Desweiteren wurden mikroskopische Analysen zur Untersuchung der Intrabody-Lokalisation durchgeführt. Die hierfür verwendeten HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, wie zuvor beschrieben mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und die Intrabodies mit einem anti-FLAG-Antikörper visualisiert.

Wie anhand der Abbildung 19B ersichtlich lokalisiert der Intrabody FLAG-IB-5/1 in nukleären Foci, welche in Zellen, die das Fusionsprotein HA-ZBRK1 exprimieren, beobachtet wurden (siehe Abbildung 7). Diese Resultate lassen vermuten, dass der gegen ZBRK1-gerichtete Intrabody FLAG-IB-5/1 endogenes ZBRK1-Protein erkennt. Im Vergleich dazu zeigten Zellen, die die Intrabodies FLAG-IB-6/1 oder FLAG-IB-7/1 exprimierten, neben einer Lokalisierung in nukleären Foci, auch eine gleichmäßige Verteilung im Kern. Zusätzlich konnte für beide Intrabodies auch eine zytoplasmatische Lokalisierung beobachtet werden. Diese könnte allerdings auch durch die starke Expression im Vergleich zu FLAG-IB-5/1 hervorgerufen werden und so potentiell ein Effekt der Überexpression darstellen. Dennoch deutet diese Analyse an, dass die Intrabodies FLAG-IB-6/1 und FLAG-IB-7/1 endogenes ZBRK1-Protein erkennen.

Aufgrund der Tatsache, dass sich die Expression von FLAG-IB-5/1 in der Western-Blot-Analyse nicht detektieren ließ, sollte in einem folgenden Schritt untersucht werden, ob die Intrabodies FLAG-IB-6/1 und FLAG-IB-7/1 ZBRK1-Protein binden.

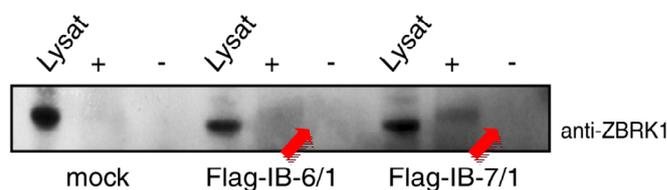


Abbildung 20: Die Intrabodies FLAG-IB-6/1 und FLAG-IB-7/1 präzipitieren endogenes ZBRK1. Hek293T-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche nur mit dem Transfektionsreagenz (mock) behandelt wurden. Nach einer 48 -stündigen Inkubation wurden die Zellen lysiert und jeweils 250 µg Zellysat mit 3 µl anti-FLAG Antikörper inkubiert. Ein identischer Ansatz ohne Primärantikörper diente als Kontrolle.

Die mit den Plasmiden pFlagCMV5a-IB-6/1 und pFlagCMV5a-IB-7/1 transfizierten Hek293T-Zellen wurden lysiert und die Proteine mit einem gegen die FLAG-Region gerichteten Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Präzipitierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Um eine unspezifische Bindung von ZBRK1 an die Dynabeads auszuschließen, wurde ein Ansatz ohne Primärantikörper inkubiert. Als weitere Kontrolle diente ein Ansatz, der nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurde.

Diese Untersuchung mittels Ko-IP ergab, dass beide Intrabodies zu einer Präzipitation des ZBRK1-Proteins führten, wobei der Intrabody FLAG-IB-7/1 im Vergleich zu FLAG-IB-6/1 eine etwas höhere Konzentration des Präzipitates aufwies (siehe Abbildung 20). In den Kontrollansätze hingegen konnte kein Präzipitat nachgewiesen werden. Demzufolge konnte gezeigt werden, dass sowohl FLAG-IB-6/1 als auch FLAG-IB-7/1 an das ZBRK1-Protein binden.

3.5 Die Expression von Intrabody FLAG-IB-7/1 beeinflusst die SCA2-Genexpression

Wie bereits erwähnt lässt sich aufgrund der bisherigen Ergebnisse vermuten, dass ein Komplex, bestehend aus ZBRK1 und ATXN2, an der Aktivierung des SCA2-Gens beteiligt ist. Demzufolge stellte sich die Frage, ob eine beeinträchtigte ZBRK1/ATXN2-Komplexbildung, erzielt durch Expression des Intrabodies, zu einer geringeren Expression des SCA2-Genproduktes führen würde. Da die vorherigen Experimente zeigten, dass der Intrabody FLAG-IB-7/1 im Gegensatz zu FLAG-IB-6/1 sich besser für eine ZBRK1-Protein Präzipitation eignet, wurden folglich die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit mit dem Intrabody FLAG-IB-7/1 durchgeführt.

Dafür wurden Hek293T-Zellen mit dem Plasmid FLAG-IB-7/1 transfiziert und für 48h inkubiert. Als Kontrolle diente ein Intrabody gegen das GPS2-Protein, FLAG-IB-GPS2. Die Proteinlysate wurden wie zuvor beschrieben behandelt und die nachzuweisenden Proteine mit den entsprechenden Antikörpern in einer Immunoblot-Analyse detektiert.

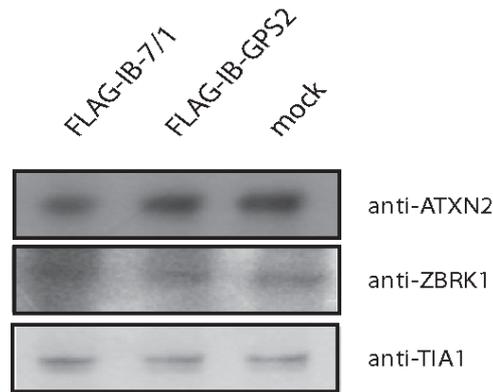


Abbildung 21: Die Expression des Intrabodys FLAG-IB 7/1 führt zu einer Abnahme des SCA2-Gen-Produktes. Hek293T-Zellen wurden mit dem Plasmid FLAG-IB-7/1 oder FLAG-IB-GPS2 transfiziert und für 48 h inkubiert. Die Expression des Intrabodys FLAG-IB-GPS2 sowie die alleinige Behandlung mit dem Transfektionsreagenz (mock) dienten als Kontrolle. Jeweils 14 µg Gesamt-Lysat wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern immunologisch nachgewiesen. Der Nachweis des Proteins TIA-1 diente zur Überprüfung einer gleichmäßigen Proteinkonzentration zwischen den einzelnen Lysaten.

Die Analyse zeigte bei Hek293T-Zellen, welche FLAG-IB-7/1 exprimierten, einen geringeren ATXN2-Level, wohingegen die Expression des Intrabodys FLAG-GPS2 bzw. die alleinige Behandlung mit dem Transfektionsreagenz keine Änderung der ATXN2-Konzentration verursachte (siehe Abbildung 21). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die FLAG-IB-7/1-Expression *per se* keinen Einfluss auf die zelluläre Konzentration von ZBRK1 ausübt. Demzufolge lässt sich vermuten, dass die Komplexbildung zwischen ZBRK1 und ATXN2 durch die Expression des Intrabodys FLAG-IB-7/1 funktionell beeinträchtigt wird.

Diese Ergebnisse sind ein weiterer Beleg dafür, dass die Bildung des ZBRK1/ATXN2-Komplexes für die SCA2-Genexpression von entscheidender Bedeutung ist. Demzufolge sollte nun im Rahmen dieser Arbeit die funktionelle Rolle des ZBRK1/ ATXN2 Komplexes weitergehend untersucht werden.

3.6 Identifizierung von Zielgenen des ZBRK1/ATXN2-Komplexes

Um die biologische Signifikanz des ZBRK1/ ATXN2 Komplexes weitergehend zu untersuchen, wurde im folgenden eine genomweite Analyse mit dem IUPAC-Bindemotiv GGGnnnCAGnnnTTT von Dr. Holger Klein (MPIMG, Abteilung Prof. Dr. Martin Vingron) durchgeführt, welche in 517 putativen Kandidaten resultierte. Diese

wurden anschließend mit signifikant veränderten Genen einer Genexpressionsanalyse von defizienten ATXN2-Zellen verglichen, welche vorab durch Dr. Ute Nonhoff (AG Dr. Krobtsch; MPIMG) und Dr. Ilaria Piccini (AG Dr. Yaspo; MPIMG) durchgeführt wurde. Die vergleichende Analyse resultierte in der Identifizierung von sieben Kandidatengen, welche im jeweiligen Promotor potentielle ZBRK1-Bindemotive besitzen sowie im ATXN2-RNAi-Experiment einen signifikant reduzierten Expressionslevel aufwiesen.

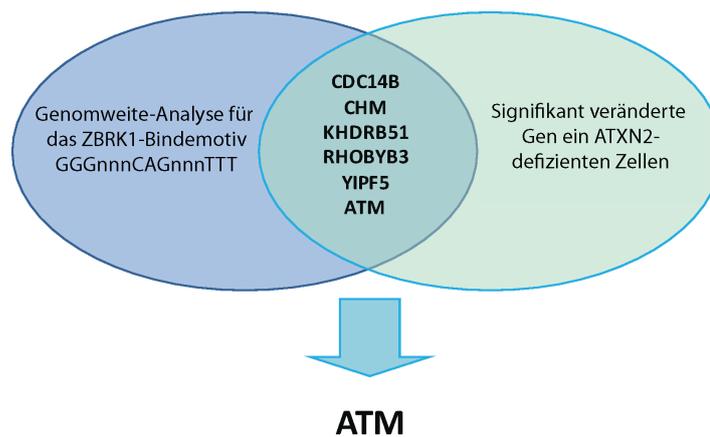


Abbildung 22: ATM ist ein potentieller Kandidat des regulatorischen Komplexes ZBRK1/ ATXN2.
 (A) Kandidaten der genomweiten Analyse für das ZBRK1-Bindemotiv GGGnnnCAGnnnTTT wurden mit signifikant veränderten Genen einer Genexpressionsanalyse von ATXN2-defizienten-Säugerzellen verglichen.

Bei den identifizierten Kandidaten handelt es sich um Gene, welche an unterschiedlichen zellulären Mechanismen beteiligt sind (siehe Abbildung 22). Zum Beispiel das *CHM*-Gen (*Choroideremia*), welches für die Komponente A der RAB-Geranylgeranyltransferase kodiert und an der Geranylierung von Rab-GTPasen beteiligt ist; dem *KHDRBS1*-Gen (*KH domain-containing, RNA binding, signal-transduction-associated protein 1*), einem RNA-bindenden Protein welches am Spleißen von Genen involviert ist; dem *RHOBTB3*- (*Rho-related BTB domain-containing protein 3*), *YIPF5*- (*YIP1 family member 5*) und dem *ARFGEF1*-Gen (*ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1*), welche alle am Vesikeltransport zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat beteiligt sind sowie dem *CDC14B*-Gen (*cell division cycle 14 homolog B*), einer Protein-Tyrosinphosphatase die an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt ist. Desweiteren des *ATM*-Gens (*Ataxia telangiectasia mutated*), welches für eine Serine-Threonin-Kinase kodiert.

ATM wird der Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen zugeordnet und ist an der Phosphorylierung zahlreicher Substrate beteiligt. Durch Phosphorylierung von Proteinen, welche DNA-Doppelstrangbrüche binden, übernimmt *ATM* eine wichtige Funktion in der DNA-Reparaturmaschinerie. Desweiteren ist *ATM* durch die Aktivierung spezifischer Zielgene wie *p53* auch an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt [127]. Interessanterweise resultiert eine Mutation im *ATM*-Gen im Louis-Barr-Syndrom, einer neurodegenerativen Erkrankung, welche aufgrund ihrer Symptomatik den Heredoataxien zugeordnet wird. Zudem weisen Patienten, die am Louis-Barr-Syndrom erkranken, eine erhöhte Prädisposition zur Erkrankung an Krebs auf, welche prozentual häufig mit einer fehlerhaften DNA-Reparaturmaschinerie assoziiert ist [128]. Demzufolge sollte im folgenden Teil dieser Arbeit der Fokus auf *ATM* gelegt werden.

3.7 Validierung der putativen *ZBRK1*-Bindestellen im *ATM*-Promotor

Im Folgenden sollten zwei mittels bioinformatischer Analyse identifizierte *ZBRK1*-Bindestellen (ZBS) in der Promotorregion des *ATM*-Gens (500 bp stromaufwärts und 300 bp stromabwärts des Transkriptionsstarts (TSS)), welche als ZBS1 und ZBS2 bezeichnet wurden, experimentell untersucht werden.

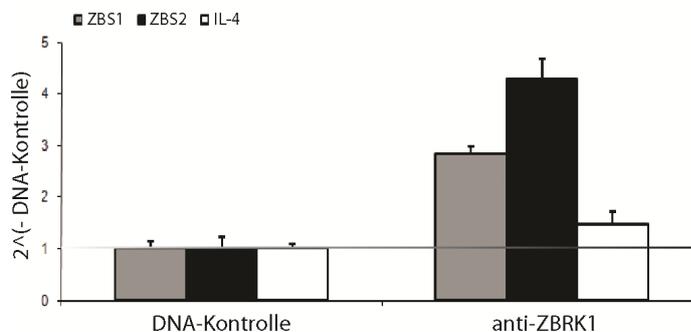


Abbildung 23: Validierung der potentiellen *ZBRK1*-Bindestellen im *ATM*-Promotor. MCF-7-Zellen wurden auf 15-mm Zellkulturplatten ausgesät, bis zu einer Konfluenz von 80-90 % inkubiert, lysiert und sonifiziert. Die geschärte Chromatin-DNA wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen *ZBRK1* präzipitiert und aufgereinigt. Die angereicherte DNA wurde mittels qPCR und spezifischen Primern für die Bindestellen ZBS1 und ZBS2 analysiert. Die Region 132037145-132037263 auf Chromosom 5 diente als Kontrolle (IL-4). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

Demzufolge wurden MCF-7-Zellen mit Formaldehyd behandelt und die Zellkerne anschließend in drei aufeinanderfolgenden Lyseschritten isoliert und sonifiziert. Die dabei entstandenen 800-1200 bp langen Chromatin-DNA-Fragmente wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen ZBRK1 inkubiert, und die präzipitierten Proben wie zuvor beschrieben (2.2.24) behandelt und mittels qPCR analysiert. Als Negativkontrolle diente ebenfalls ein Primerpaar für einen genomischen Abschnitt im *IL-4*-Gen.

Diese ChIP-Analyse ergab, dass Chromatin-DNA-Fragmente, welche das Bindemotiv ZBS1 bzw. ZBS2 beinhalten, präzipitiert und um das 1,8- bzw. 3,2-fache im Vergleich zum Kontrollansatz angereichert werden konnten (siehe Abbildung 23). Bei der Negativkontrolle *IL-4* kam es im Vergleich zum Kontrollansatz nur zu einer minimalen Anreicherung. Somit kann gefolgert werden, dass ZBRK1 über die Bindemotive ZBS1 und ZBS2 an den *ATM*-Promotor bindet und somit an der Regulierung des *ATM*-Gens beteiligt sein könnte.

3.8 Ein ZBRK1/ATXN2-Komplex führt zur Aktivierung des ATM-Promotors

Weitergehend sollte nun der Einfluss der ZBRK1-Expression auf die Aktivität des *ATM*-Promotors mittels Promotoranalysen untersucht werden. Zudem stellte sich die Frage, ob ATXN2 ebenfalls einen Einfluss auf die Regulierung des *ATM*-Promotors ausübt. Dafür wurde mittels homologer Rekombination (siehe 2.2.30) das Promotorkonstrukt pGL3-*ATM* generiert, welches beide Bindemotive ZBS1 und -2 beinhaltet (siehe Anhang). Dieses wurde zur Transfektion von Hek293T-Zellen eingesetzt welche zusätzlich mit dem Plasmid pCMV-HA-ZBRK1 bzw. pCMV-MYC-ATXN2-Q22 transfiziert wurden. Ein identischer Ansatz, welcher mit der pGL3-*Firefly*-Luziferase und dem Kontrollplasmid pCMV-HA oder pCMV-MYC transfiziert wurde, diente als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Reporterogenaktivität gemessen und in Relation zur Expression der *Renilla*-Luziferase gesetzt.

Es zeigte sich, dass im Vergleich zu den Kontrollansätzen eine Überexpression von ZBRK1 als auch von ATXN2 zu einer Aktivierung des *ATM*-Promotors führte (siehe Abbildung 24). Entsprechend liess sich eine Luziferaseaktivität von 800 bzw. 100

beobachten. Somit ergaben diese Ergebnisse, dass ein Komplex, bestehend aus ZBRK1 und ATXN2, zur transkriptionellen Aktivierung des *ATM*-Gens führen könnte.

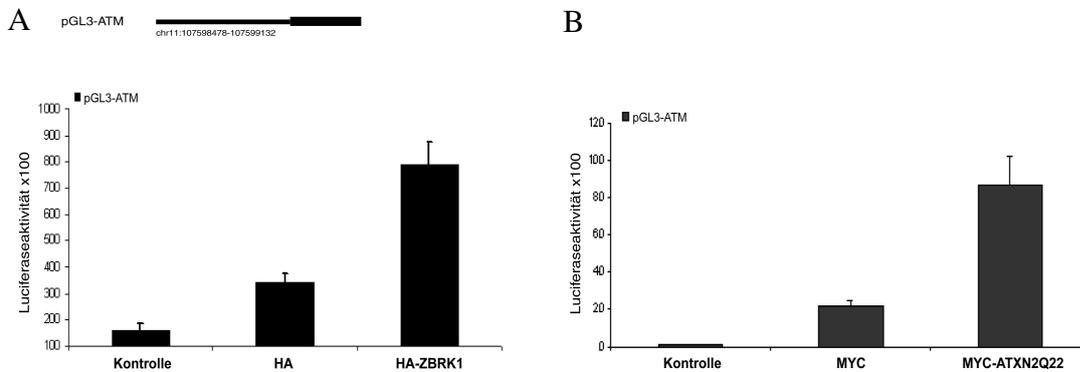


Abbildung 24: Eine Überexpression von ZBRK1 und ATXN2 resultiert in der Aktivierung des *ATM*-Promotors. Hek293T-Zellen wurden in 96-Kammer-Zellkulturplatten ausgesät und mit den Plasmiden pRL-TK-*Renilla* und pGL3-*ATM* transfiziert. Zusätzlich wurden die Ansätze entweder mit dem Plasmid pCMV-HA-ZBRK1 oder pCMV-MYC-ATXN2-Q22 behandelt. Die Expression der pGL3-*Firefly*-Luziferase sowie dem Plasmid pCMV-HA bzw. pCMV-MYC diente als Kontrolle. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert, die Reporteraktivität gemessen und in Relation zur Expression der *Renilla*-Luziferase berechnet. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

3.9 ZBRK1- bzw. ATXN2-Defizienz resultiert in einer reduzierten *ATM*-Expression

Desweiteren sollte mittels RNAi-Experimenten untersucht werden, ob reduzierte ZBRK1- oder ATXN2-Konzentrationen zu einer verringerten Transkription des *ATM*-Gens führen. Hierfür wurden Hek293T-Zellen mit ZBRK1-, ATXN2- oder einer Kombination aus beiden siRNA-Molekülen transfiziert (siehe 2.2.26). Als Kontrolle dienten Zellen, welche nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden (mock). Anschließend wurde die Gesamt-RNA wie in Material und Methoden beschrieben isoliert, in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert.

Wie der Abbildung 25 zu entnehmen ist, wiesen Zellen, welche mit ATXN2- oder ZBRK1-siRNA behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle eine 40 %- bzw. 30 %ige Reduzierung der *ATM*-Expression auf. Auch führte die Kombination beider siRNA-Molekülen lediglich zu einer 35 % geringeren Transkription des *ATM*-Gens. Allerdings lag die knockdown-Effizienz von ATXN2 und ZBRK1 im Vergleich zur

Kontrolle nur bei 82 %- bzw. 60 %. Auch die Kombination beider siRNA-Moleküle resultierte lediglich in einer 70 %igen ATXN2- und ZBRK1-Defizienz. Demzufolge lässt sich vermuten, dass eine bessere knockdown-Effizienz beider Gene in einer stärkeren Reduzierung der *ATM*-Transkription resultieren würde.

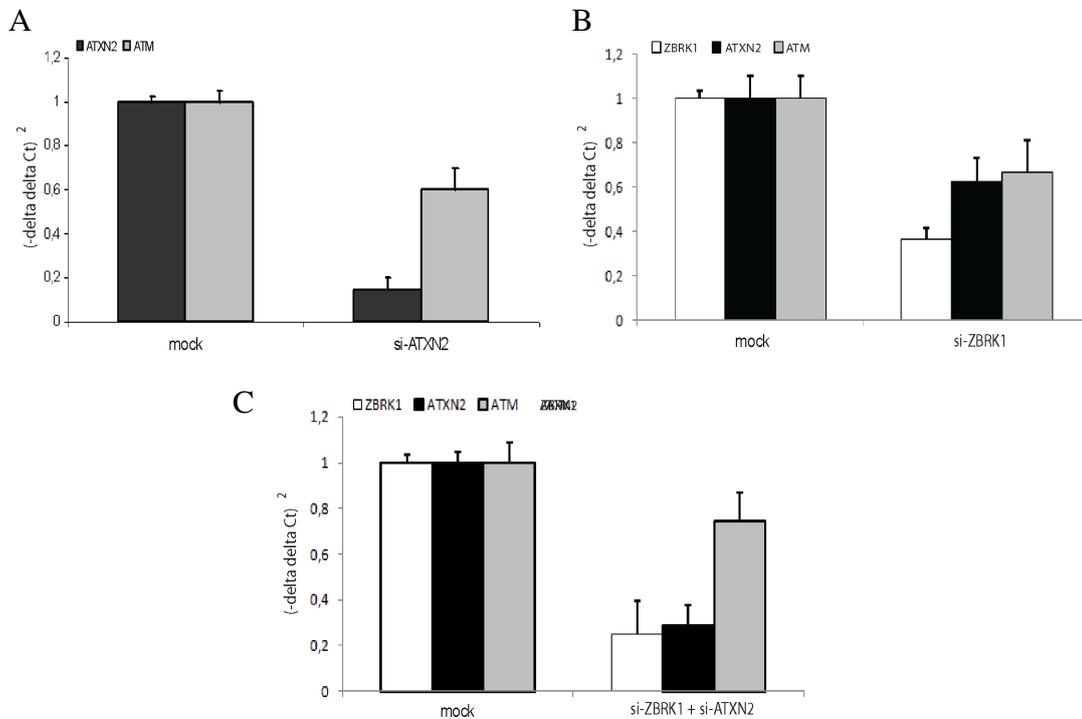


Abbildung 25: ATXN2- und ZBRK1-Defizienz führt zu einem geringeren *ATM*-Transkriptionslevel. Hek293T-Zellen wurden in 12-Kammer-Zellkulturplatten ausgesät und für 96 h mit (A) si-ATXN2, (B) si-ZBRK1 oder (C) einer Kombination aus beiden inkubiert. Als Kontrollen dienen Zellen, welche nur mit dem Transfektionsreagenz (mock) behandelt wurden. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, mittels qPCR analysiert und nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode ausgewertet. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

Somit konnte bestätigt werden, dass eine Reduzierung des ATXN2-Levels als auch des ZBRK1-Levels in einer geringeren Transkription des *ATM*-Gens resultiert. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Beleg dafür, dass die transkriptionelle Aktivierung von *ATM* durch den ZBRK1/ATXN2-Komplex erfolgt.

3.10 Reduzierte SCA2- und ATM-Expressionslevel in Dickdarmkarzinoma-Patienten mit geringer ZBRK1-Konzentration

Eine Vielzahl von Studien ergaben, dass diverse humane Krebsarten eine veränderte Expression von ZBRK1 aufweisen. So konnte eine Studie nachweisen, dass in primärem Brustkrebsgewebe in 45,9 % der Proben ein erhöhter sowie in 29,5 % der Proben ein reduzierter ZBRK1-Transkript-Level vorliegt [129]. Im Vergleich dazu zeigte sich bei Untersuchungen von Dickdarmkarzinoma, dass eine reduzierte ZBRK1-Konzentration mit einem geringeren Expressionslevel des ZBRK1-Ko-Repressors BRCA1 korrelierte [130-131].

Demzufolge stellte sich die Frage, ob sich die vorherigen Beobachtungen zwischen ZBRK1, ATXN2 und ATM in Tumorgewebeproben von Dickdarmkarzinoma auf Transkriptebene bestätigen lassen. Die dafür isolierte Gesamt-RNA von Tumorgewebe und Kontrollgewebe (Normalgewebe) aus fünf Patienten erfolgte durch Christina Röhr in der Arbeitsgruppe von Dr. Michal Schweiger (MPIMG, Berlin). Die isolierten RNA-Proben wurden im folgenden Schritt in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern für *ZBRK1*, *ATXN2* und *ATM* mittels qPCR analysiert.

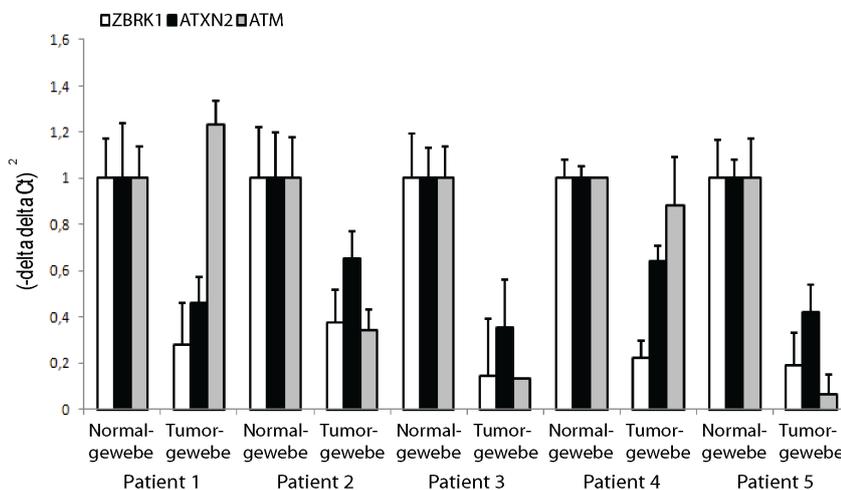


Abbildung 26: Korrelation von ZBRK1-, ATXN2- und ATM-Transkription in Dickdarmkarzinoma.

Die isolierte RNA aus Normal- und Tumorgewebe von fünf unterschiedlichen Dickdarmkarzinomapatien wurde in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, mittels qPCR analysiert und nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet. Als interne Kontrolle diente das Haushaltsgen HPRT, welches die höchste Konstanz in Dickdarmkarzinomaproben aufwies [132]. Die jeweiligen Normalgewebeproben wurden nach der Normalisierung zu HPRT auf 1 festgelegt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

Es zeigte sich, dass im Vergleich zum Normalgewebe alle Tumorgewebeproben den erwarteten signifikant geringeren *ZBRK1*-Transkriptionslevel aufwiesen (siehe Abbildung 26). Interessanterweise korrelierte dieser in allen Patientenproben mit einer reduzierten *ATXN2*-Transkription. Eine Abnahme des *ATM*-Transkriptionslevel, welche aufgrund der bisherigen Untersuchungen vermutet wurde, ließ sich in vier der fünf Tumorgewebeproben nachweisen. Patient 1 hingegen zeigte trotz signifikanter Reduzierung der *ZBRK1*- und *ATXN2*-Transkription einen Anstieg der *ATM*-Genexpression.

Dennoch lassen sich anhand dieser Ergebnisse die zuvorigen Beobachtungen der Zellkulturexperimente belegen, und somit eine deutliche Korrelation zwischen dem reduzierten Transkriptionslevel von *ZBRK1* und seinem Ko-Aktivator *ATXN2* in Dickdarmkarzinomgewebe demonstrieren. Zusätzlich konnte auch die Korrelation zwischen dem Aktivator-Komplex *ZBRK1/ATXN2* und seinem Zielgen *ATM* bestätigt werden. Zudem führen diese Ergebnisse zu der Annahme, dass der *ZBRK1/ATXN2*-Aktivator-Komplex funktionell an der Tumorgenese von Dickdarmkarzinoma beteiligt sein könnte, was weitergehend funktionell untersucht werden müsste.

3.11 Transkriptionelle Dysregulation in SCA2?

Da *ATXN2* vorwiegend mit der neurodegenerativen Erkrankung *SCA2* in Verbindung gebracht wird, sollte in den nächsten Schritten die Auswirkung der pathogenen Form des *ATXN2*-Proteins, *ATXN2Q79*, auf die regulatorische Funktion des *ZBRK1/ATXN2* Komplex untersucht werden. Erste Hinweise aus der Y2H-Analyse deuteten darauf hin, dass die Interaktion von *ZBRK1* und *ATXN2* durch eine verlängerte Polyglutamindomäne abgeschwächt wird (siehe Abbildung 3). Somit sollte im Anschluss der mögliche Einfluss des verlängerten Polyglutaminregion auf die Komplexbildung zwischen *ZBRK1* und *ATXN2* sowie die Auswirkungen auf die *SCA2*- und *ATM*-Transkription im Säugersystem untersucht werden.

3.11.1 *ZBRK1* interagiert mit der pathogenen Form von *ATXN2*

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob eine Interaktion zwischen *ZBRK1* und der pathogenen Form von *ATXN2*, *ATXN2Q79*, im Säugersystem stattfindet.

sowie ATXN2 anschließend über die HA- bzw. MYC-Region mit den entsprechenden Antikörpern visualisiert.

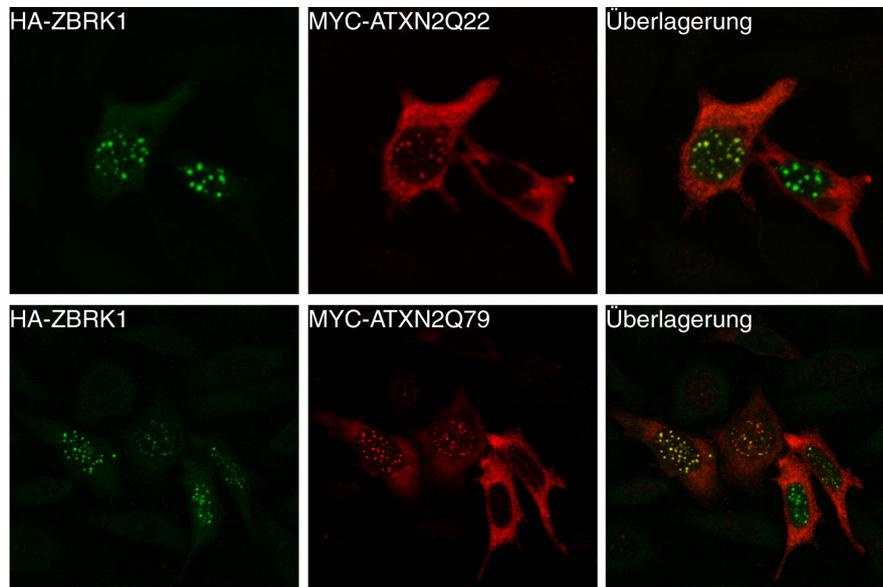


Abbildung 28: ZBRK1 assoziiert mit pathogenem ATXN2 im Zellkern. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert und für 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt.

Die mikroskopischen Analysen zeigten zum einen die erwartete nukleäre Ko-Lokalisierung von ZBRK1-Foci und ATXN2Q22. Auch zeigte sich eine Ko-Lokalisierung von ZBRK1 und ATXN2Q79 im Zellkern (siehe Abbildung 28). Interessanterweise ließ sich bei ATXN2Q79-Expression im Vergleich zu ATXN2Q22 eine erhöhte Anzahl von ZBRK1-Foci beobachten, welche zudem eine geringere Größe aufwiesen. Außerdem konnte in diesen Zellen eine geringere zytoplasmatische ATXN2-Immunreaktivität beobachtet werden. Bemerkenswerterweise wurde diese Beobachtung nicht in Zellen gemacht, die keine nukleäre Ko-Lokalisierung zwischen ZBRK1 und ATXN2Q79 aufwiesen. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass ATXN2Q79 mit ZBRK1 im Zellkern assoziiert, wobei es zur Beobachtung veränderter ZBRK1-Foci-Strukturen kam.

3.12 Pathogenes ATXN2 beeinträchtigt die Aktivierung des SCA2- und des ATM-Promotors

Aufgrund erster Hinweise aus der Y2H-Analyse, welche auf eine schwächere Interaktion von ZBRK1 und ATXN2Q79 hindeuteten (siehe Abbildung 3), sollte im folgenden untersucht werden, ob die Expression von ATXN2Q79 zu einer veränderten SCA2- und ATM-Promotoraktivität führen könnte.

Hierfür verwendete Hek293T-Zellen wurden mit den entsprechenden SCA2- oder ATM-Luziferase-Promotorkonstrukten sowie MYC-ATXN2Q22, MYC-ATXN2Q79 bzw. MYC als Kontrolle transfiziert. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen lysiert, die Reporterogenaktivität der *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase gemessen und in Relation zueinander berechnet.

Wie bereits zuvor beobachtet (Abbildung 16B), zeigte sich bei Expression des Fusionsproteins MYC-ATXN2Q22 ein Anstieg der SCA2-Promotoraktivität. Interessanterweise liess sich bei Expression von MYC-ATXN2Q79 lediglich eine Luziferaseaktivität von 20 beobachten. Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression des Fusionsproteins MYC-ATXN2-Q79 zu einer geringeren SCA2-Promotoraktivität führt.

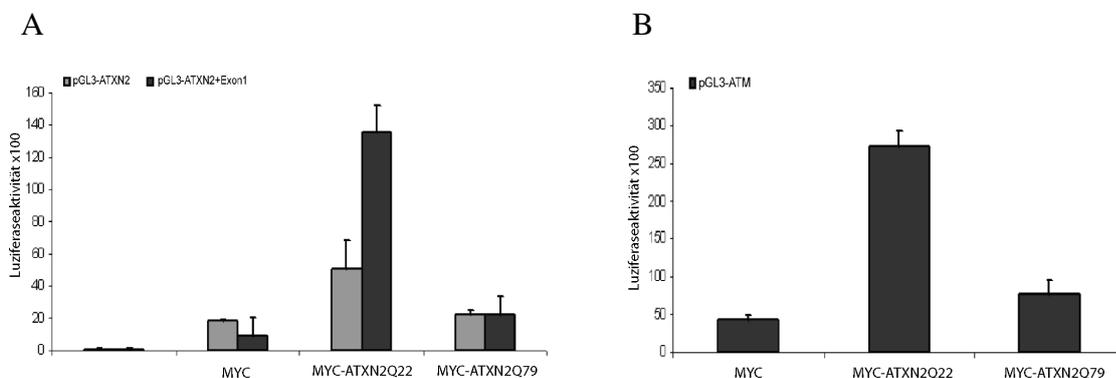


Abbildung 29: Pathogenes ATXN2Q79 führt zur schwächeren Aktivierung der SCA2- und der ATM-Promotoraktivität. Hek293T-Zellen wurden in 96-Kammer-Zellkulturplatten ausgesät und mit den Plasmiden pRL-TK-*Renilla*, pGL3-ATXN2, pGL3-ATXN2-Exon1 oder pGL3-ATM transfiziert. Zusätzlich wurden die Ansätze entweder mit dem Plasmid pCMV-MYC-ATXN2-Q22 oder pCMV-MYC-ATXN2-Q79 behandelt. Die Expression der pGL3-*Firefly*-Luziferase sowie des Plasmids pCMV-MYC diente als Kontrolle. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert, die Reporteraktivität gemessen und in Relation zur Expression der *Renilla*-Luziferase berechnet. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

Wie bereits vorab gezeigt werden konnte ergaben die Expression des Fusionsproteins MYC-ATXN2Q22, im Vergleich zur Kontrolle eine vermehrte Aktivierung des *ATM*-Promotors. So konnte durch transiente Expression von MYC-ATXN2Q22 eine Luziferaseaktivität von 270 beobachtet werden, welche interessanterweise durch die Expression von ATXN2Q79 auf das Kontrolllevel sank (siehe Abbildung 29). Demzufolge kann angenommen werden, dass eine beeinträchtigte Assoziierung von ZBRK1 und ATXN2 durch die verlängerte Polyglutaminregion ebenfalls in einer geringeren transkriptionellen Aktivierung des *ATM*-Gens resultiert.

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass ATXN2Q79 durch den expandierte Polyglutaminbereich einen schwächeren Ko-Aktivator darstellen könnte, welcher demzufolge in einer geringeren Aktivierung des *SCA2*- und *ATM*-Gens resultiert.

3.13 Beeinflusst pathogenes ATXN2 die Phosphorylierung der ATM-Substrate?

Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, welche Rolle eine geringere *ATM*-Expression in der Pathogenese von *SCA2* einnimmt. Wie bereits zuvor erwähnt, ist *ATM* an der Phosphorylierung und somit an der direkten oder indirekten Aktivierung seiner spezifischen Substrate beteiligt. Eines dieser Substrate ist H2AX, welches unter genotoxischen Stressbedingungen phosphoryliert wird und DNA-Doppelstrangbrüche bindet. Untersuchungen mit immortalisierten neuronalen Stammzellen, welche mit γ -Strahlung behandelt wurden, zeigten, dass diese durch eine *ATM*-Defizienz im Vergleich zu Kontrollzellen eine geringere Aktivierung von *ATM* und demzufolge eine verminderte Phosphorylierung von H2AX aufwiesen [133]. Demzufolge scheint eine geringere Expression von *ATM* die Phosphorylierung spezifischer Substrate zu beeinträchtigen.

Zudem ergaben Untersuchungen in *SCA2*-Fibroblasten, dass diese durch Behandlung mit oxidativem Stress im Vergleich zu Kontrollzellen eine veränderte Aktivierung der *ATM*/*ATR*-Substrate sowie eine beeinflusste Immunreaktivität von phosphoryliertem H2AX aufwiesen [134]. Interessanterweise wird eine gesteigerte

Konzentration an reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS), welche unter anderem durch oxidativen Stress induziert werden, mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-, der Parkinson- oder der HD-Erkrankung in Zusammenhang gebracht [135].

Demzufolge sollte in einem abschließenden Schritt untersucht werden, ob Zellen, die pathogenes ATXN2Q79 exprimierten bei H₂O₂-Behandlung eine Beeinträchtigung in der Phosphorylierung von ATM-Substraten aufwiesen. Hierfür verwendete HeLa-Zellen, welche die Fusionsproteine MYC-ATXN2Q22 oder MYC-ATXN2Q79 exprimierten, wurden für 1 h mit H₂O₂ behandelt und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 sowie gegen phosphorylierte Serin/Threonin-Gruppen von ATM-Substraten behandelt.

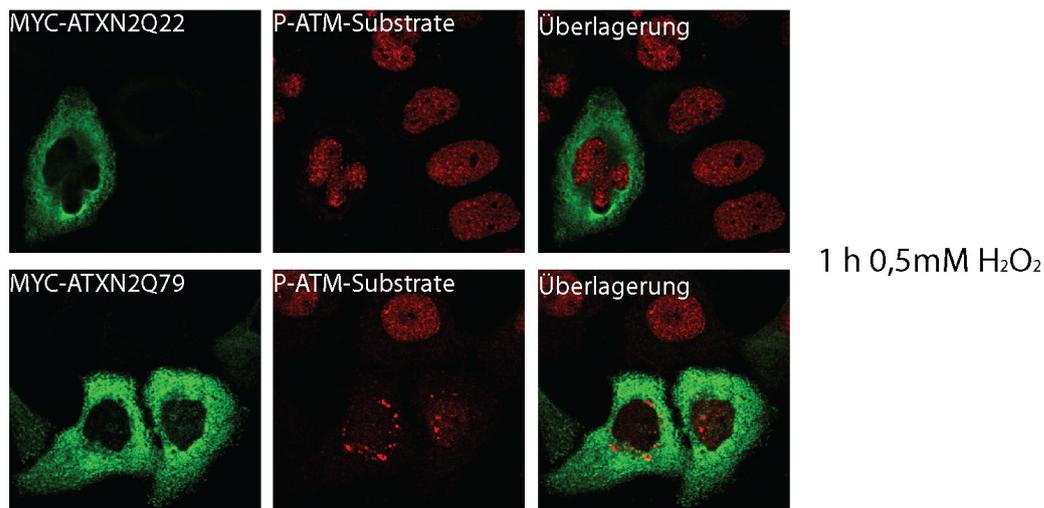


Abbildung 30: Pathogenes ATXN2 führt zu einer veränderten Phosphorylierung der ATM-Substrate. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert und für 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit 0,5 mM H₂O₂ inkubiert, fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt.

Erste mikroskopische Analysen ergaben, dass eine Behandlung mit H₂O₂ zu einer Phosphorylierung von ATM-Substraten führte und dementsprechend in ihrer Aktivierung resultierte. Bemerkenswerterweise zeigten Zellen, welche ATXN2Q79 exprimierten ein verändertes Phosphorylierungsmuster der ATM-Substrate, im Vergleich zu Zellen, die ATXN2Q22 oder endogenes ATXN2 exprimierten (siehe Abbildung 30). So führte die Expression des Fusionsproteins MYC-ATXN2Q79 zu

einer Akkumulierung von phosphorylierten ATM-Substraten, welche im Zellkern oder an der Kernmembran lokalisierten.

Demzufolge konnten erste Analysen demonstrieren, dass die Expression von ATXN2Q79 unter oxidativen Stressbedingungen zu einer veränderten Phosphorylierung von ATM-Substraten führte.

Diese Resultate lassen vermuten, dass eine geringere ATM-Transkription, welche aller Wahrscheinlichkeit nach durch die beeinträchtigte Komplexbildung von ZBRK1 und pathogenem ATXN2Q79 hervorgerufen wird, zu einer Änderung der ATM-gesteuerten Phosphorylierung in der SCA2-Pathogenese führen könnte. Somit wäre es von großer Bedeutung, den potentiellen Zusammenhang zwischen transkriptioneller Dysregulation durch den ZBRK1/ATXN2-Komplex sowie einer, möglicherweise dadurch beeinträchtigten Phosphorylierung von ATM-Substraten in der Pathogenese von SCA2 anhand von Patientenmaterial zu analysieren.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von ATXN2 an der transkriptionellen Regulation sowie der Einfluss eines verlängerten Polyglutaminbereichs und die daraus resultierende Pathogenese von SCA2 untersucht.

Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf der funktionellen Charakterisierung der Interaktion zwischen ATXN2 und dem transkriptionellen Regulator ZBRK1. Dieser wurde ursprünglich mittels Y2H-Analyse als potentieller Interaktionspartner des Brustkrebs-assoziierten-Proteins 1 (BRCA1) identifiziert.

4.1 Interaktion zwischen ATXN2 und dem transkriptionellen Regulator ZBRK1

KRAB-Zink-Finger Proteine wurden erstmals 1991 von Bellefroid *et al.* identifiziert [136]. Sie zeichnen sich durch das Vorhandensein einer Krüppel-assoziierten-Box-Domäne (KRAB) aus und stellen, mit etwa einem Drittel aller humanen Zink-Finger Proteine, die größte Einzelfamilie von transkriptionellen Regulatoren in Säugetieren dar. Charakteristisch für KRAB-Zink-Finger Proteine sind zum einen, die bis zu 34 aufeinanderfolgenden C2H2-Krüppelmotive, zum anderen eine terminal lokalisierte KRAB-Domäne, welche sich aus den Domänen KRAB-A und/oder KRAB-B zusammensetzt [137].

Ein Mitglied der KRAB-Zink-Finger Proteinfamilie ist der transkriptionelle Regulator ZBRK1, auch bekannt als Zink-Finger Protein 350. Wie bereits zuvor erwähnt, wurde dieser ursprünglich in einer Y2H-Analyse als Interaktionspartner von BRCA1 identifiziert. ZBRK1 ist ein nukleäres Protein mit einer molekularen Masse von 60 kDA und wird ubiquitär exprimiert. Wie für diese Proteinfamilie charakteristisch, besitzt das ZBRK1-Protein eine N-terminale KRAB-Domäne, welche in die Teil-Domänen KRAB-A und KRAB-B unterteilt wird (siehe Abbildung 31). Es wird vermutet, dass Ko-Repressoren, welche an der Reprimierung von KRAB-Zink-Finger Proteinen beteiligt sind, an die KRAB-A Domäne binden, wo hingegen die KRAB-B Domäne die Reprimierung durch den Komplex unterstützt. Allerdings ist der genaue Mechanismus der transkriptionellen Reprimierung durch KRAB-Zink-Finger Proteine bis heute noch nicht geklärt [137]. Neben der KRAB-Domäne besitzt ZBRK1 acht

Krüppel-C₂H₂-Zink-Finger-Motive, welche sich, im Gegensatz zu den meisten KRAB-Zink-Finger Proteinen, nicht in der C-terminalen, sondern in der zentralen Aminosäuresequenz befinden. Aufgrund ihrer strukturellen Formierung sind diese Motive in der Lage drei Nukleotide zu binden und dienen somit der Anlagerung von ZBRK1 an die DNA [138]. Zusätzlich beinhaltet ZBRK1 eine ZBRK1-spezifische C-terminale transkriptionelle Repressor Domäne (CTRD), welche bisher in keinem weiteren KRAB-Zink-Finger Protein beobachtet werden konnte und demzufolge für ZBRK1 charakteristisch ist [123, 137]

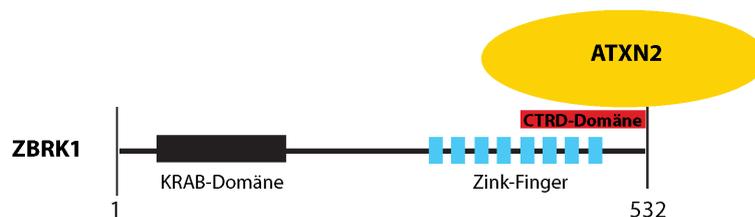


Abbildung 31: Schematische Darstellung von ZBRK1 und der CTRD-vermittelten Assoziierung mit ATXN2. Die einzelnen Regionen sind wie folgt dargestellt: (1) die N-terminale KRAB-Domäne in schwarz, (2) die Krüppel-C₂H₂-Zink-Finger-Motive in hellblau und (3) die CTRD-Domäne in rot.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass ZBRK1 über die CTRD-Domäne oligomerisiert und zur DNA-Bindung Tetramere ausbildet, welche die ZBRK1-induzierte Reprimierung unterstützen [123]. Weitere Untersuchungen führten zu der Annahme, dass die regulatorischen Eigenschaften von ZBRK1 nicht ausschließlich auf die Protein-DNA-Bindung, sondern zusätzlich auf CTRD-vermittelte Protein-Protein Interaktionen zurückzuführen sind. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von BRCA1 an die CTRD-Domäne von ZBRK1 für die BRCA1-abhängige transkriptionelle Reprimierung von DNA-Reparatur-Genen notwendig ist [139]. Es wird weiterhin vermutet, dass weitere Ko-Regulatoren mit ZBRK1 assoziieren und an der Reprimierung von Genen involviert sind. So deuten erste Y2H-Analysen auf eine Assoziierung zwischen der CTRD-Domäne von ZBRK1 und dem Aktivierenden-Transkriptionsfaktor-1 (ATF-1) bzw. dem Serum-Antwort-Faktor (SRF) hin, welche allerdings funktionell noch weitergehend untersucht werden müssen [139].

Interessanterweise ergaben die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen, dass die Interaktion zwischen ZBRK1 und ATXN2 über die CTRD-Domäne von ZBRK1 sowie

den Polyglutaminbereich von ATXN2 erfolgt. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass ATXN2 möglicherweise einen regulatorischen Komplex mit ZBRK1 bildet und somit erstmalig mit transkriptioneller Regulation in Verbindung gebracht werden könnte (siehe Abbildung 3). In humanen Zellen, die das Fusionsprotein FLAG-ZBRK1 exprimierten, ließ sich die Interaktion zwischen ZBRK1 und endogenem ATXN2 mittels Ko-IP-Experimenten bestätigen (siehe Abbildung 5). Anschließende Ko-Lokalisierungstudien beider Proteine in humanen Zellen festigten diese Hypothese (siehe Abbildung 10).

4.2 Kernlokalisierung von ZBRK1 und ATXN2

Bisherige Studien schreiben ATXN2 eine vorwiegende zytoplasmatische Lokalisierung zu. Dennoch konnte gezeigt werden, dass ATXN2 zusätzlich mit dem Golgi-Apparat, Vesikelkörperchen und der Plasmamembran assoziiert ist. Weitergehend ergaben die Analysen, dass die LSM-Domäne eine entscheidende Rolle an der Assoziierung mit dem Golgi-Apparat übernimmt und ein Fehlen dieser zu einer erhöhten Toxizität führt [82, 140]. Bemerkenswerterweise wurden neben einer eindeutigen zytoplasmatischen Lokalisierung in postmortalen Gewebeproben von zwei unterschiedlichen SCA2-Patienten zusätzlich nukleäre Inklusionskörperchen beobachtet. Diese wurden allerdings in Neuronen des Pons nachgewiesen und nicht in den Purkinje-Zellen, der Neuronen-Population, die in SCA2 vorwiegend von der Degeneration betroffen sind [126]. Erste Zellkulturexperimente mit einem pathogenen ATXN2-Fusionsprotein, welches 104 Glutamine beinhaltet, führten ebenfalls zur vereinzelt Bildung nukleärer Inklusionskörperchen, was eine eventuelle Kernlokalisierung von ATXN2 vermuten lässt [82]. Weitere Beobachtungen im SCA1-Drosophila-Modell und bei SCA1-postmortalen Neuronen zeigten eine Akkumulierung von dATXN2 bzw. humanem ATXN2 in die SCA1-charakteristischen nukleären Inklusionskörperchen [62]. Interessanterweise ergaben mikroskopische Analysen dieser Arbeit neben der zytoplasmatischen Lokalisierung von ATXN2, auch eine eindeutig nachweisbare Immunreaktivität im Zellkern von HeLa-Zellen. Diese konnte zusätzlich mittels Western-Blot Analyse in fraktionierten HeLa-Kernlysaten bestätigt werden (siehe Abbildung 9). Somit konnte gezeigt werden, dass ATXN2 neben der überwiegend zytoplasmatischen Lokalisierung auch im Zellkern vorhanden ist.

Im Vergleich dazu ergaben bisherige Expressionsanalysen mit einem GFP-ZBRK1-Fusionsprotein eine gleichmäßige Lokalisierung des exprimierten Fusionsproteins im Zellkern [123]. Diese Beobachtung ließ sich im Rahmen dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen ZBRK1-Fusionsproteinen bestätigen (siehe Abbildung 7). Interessanterweise konnte neben der bisher beschriebenen Expression beobachtet werden, dass 70 % der transfizierten Zellen spezifische nukleäre ZBRK1-Foci aufwiesen.

Interessanterweise ergaben die mikroskopischen Ko-Lokalisierungsstudien, dass Zellen, welche transient das Fusionsprotein ZBRK1 exprimierten, eine nukleäre Assoziierung von ATXN2 und ZBRK1 in den zuvor beobachteten ZBRK1-Foci (siehe Abbildung 10) aufwiesen. Demzufolge wurden diese im Rahmen der Arbeit weitergehend charakterisiert.

Bisher wurden verschiedene Kernstrukturen, wie Kajalkörperchen, nukleäre *speckles*, *paraspeckles* oder PML-Nuklearkörperchen (PML-NB) in der Literatur beschrieben. Interessanterweise konnte eine Assoziierung von Polyglutaminproteinen und PML-NBs beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um Kernstrukturen, die mehr als 40 Proteine umfassen, welche an zellulären Prozessen, wie Apoptose, DNA-Schädigung, DNA-Reparaturmechanismen und der transkriptionellen Regulation beteiligt sind. [141]. So führte eine Expression von pathogenem ATXN1 in COS-1 Zellen zur Umstrukturierung der PML-NBs sowie zu einer Zunahme in deren Größe [142]. Desweiteren ließ sich in Nervenzellen eine Assoziierung zwischen PML und der pathogenen Form von ATXN7 mit expandiertem Polyglutaminbereich beobachten [143]. Zusätzlich konnte auch eine Rekrutierung von Huntingtin in gesunden Menschen und HD-Patienten in PML-NBs beobachtet werden, welche somit zur Veränderung der Matrix-gebundenen Nuklearkörperchen führt und eine transkriptionelle Reprimierung verursachen könnte [144].

Zur Identifizierung der ZBRK1-Foci wurden mikroskopische Ko-Lokalisierungsstudien von ZBRK1 und dem PML-NB-spezifischem PML-Protein, welches sich aufgrund von Untersuchungen mit PML knockout-Mäusen und -Zellen als essentielle Komponente der PML-NBs darstellte, durchgeführt [141]. Interessanterweise ergaben diese Analysen eine Assoziierung der ZBRK1-Foci mit PML, was andeutet, dass ZBRK1 eine weitere Komponente der PML-NBs darstellt. Diese Resultate werden dadurch gestützt, dass zahlreiche Ko-Repressoren, wie mSin3A (*Sin3A-assoziiertes Protein*), N-CoR (*Nukleärer-Rezeptor-Ko-Rezeptor*) und Histon-Deacetylasen, sowie

transkriptionellen Regulatoren wie p53 und CBP ebenfalls in PML-NBs rekrutiert werden [141].

4.3 ZBRK1 und ATXN2 sind an der Aktivierung von SCA2 beteiligt

Bemerkenswerterweise deuteten die mikroskopischen Analysen an, dass eine stärkere Immunreaktivität des endogenen ATXN2-Proteins bei Überexpression von ZBRK1 zu verzeichnen war. Aufgrund dessen ließ sich spekulieren, dass eine erhöhte ZBRK1-Expression zu einem Anstieg von ATXN2 führen könnte. Diese Vermutung konnte mittels Immunoblot-Analysen, welche eine Korrelation zwischen erhöhtem ZBRK1-Proteinlevel und endogenen ATXN2-Protein-Konzentration aufwiesen, belegt werden (Abbildung 12). Entsprechend ergaben RNAi-Experimente, dass eine Reduzierung von ZBRK1 sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptebene ebenfalls in einer Abnahme von ATXN2 resultierte (Abbildung 13).

Schlussletztendlich konnte durch die Generierung eines interferierenden Intrabodies, diese beobachtete Korrelation bestätigt werden. Die Herstellung eines Intrabody, welcher spezifisch mit der Interaktion zwischen der CTRD-Domäne von ZBRK1 und der Polyglutaminregion von ATXN2 interferiert, erfolgte mittels einer Kombination aus Phagen-Display und reversem Y2H. Interessanterweise zeigten Zellen die den spezifischen Intrabody FLAG-IB-7/1 exprimierten, im Vergleich zu Zellen, die einen Kontroll-Intrabody exprimierten oder nur mit Transfektionsreagenz behandelt wurden, einen reduzierten ATXN2-Proteinlevel (Abbildung 21). Die Proteinkonzentration von ZBRK1 wurde durch die Expression des Intrabodys FLAG-IB-7/1 nicht beeinflusst. Folglich resultierte eine beeinträchtigte Assoziierung beider Proteine in einem geringeren Level von endogenem ATXN2. Daher lässt sich vermuten, dass die Interaktion zwischen ATXN2 und der CTRD-Domäne von ZBRK1 für die transkriptionelle Regulierung des *SCA2*-Genproduktes entscheidend ist. Dennoch scheinen weitere Proteine an diesem Komplex mitzuwirken, da sowohl ein knockdown von ZBRK1 sowie eine gestörte Interaktion zwischen beiden Proteinen nur in einer geringen Abnahme der *SCA2*-Aktivität resultierte. Allerdings könnte die geringe Abnahme der *SCA2*-Aktivität auch durch die geringe RNAi-Effizienz bedingt sein, so dass eine höhere Effizienz möglicherweise in einer stärkeren Abnahme resultieren würde.

Ein weiterer wichtiger Befund dieser Arbeit war die Identifizierung von sieben potentiellen ZBRK1-Bindemotiven im Promotor von *SCA2* (Abbildung 14). Mittels ChIP-Analysen konnten vier von sieben potentiellen Bindemotiven mit einem spezifischen ZBRK1-Antikörper validiert werden (Abbildung 15). Desweiteren zeigte sich, dass ATXN2 mit ZBRK1 einen regulatorischen Komplex eingeht und an der Regulierung des *SCA2*-Gens beteiligt ist, da die identifizierten Bindemotive zusätzlich mit einem spezifischen ATXN2-Antikörper präzipitiert werden konnten. Interessanterweise ließen sich mit dem anti-ZBRK1-Antikörper zwei, mit dem anti-ATXN2-Antikörper alle vier Bindemotive validieren. Da ZBRK1 über seine C₂H₂-Krüppel-Zink-Finger mit der Chromatin-DNA assoziieren kann, würde eine Präzipitation aller vier Bindemotive mittels eines spezifischen ZBRK1-Antikörper erwartet werden. Diese Diskrepanz ist möglicherweise auf die unterschiedliche Effizienz der ZBRK1- und ATXN2-Antikörper zurückzuführen, welche für ChIP-Analysen ausschlaggebend sind. Demzufolge würde eventuell ein anderer ZBRK1-Antikörper in einer höheren Präzipitation resultieren. Folglich ist anzunehmen, dass ATXN2 über die CTRD-Domäne mit ZBRK1 assoziiert, dieser Komplex über die ZBRK1-Bindemotive an den *SCA2*-Promotor bindet und somit an der Regulation der Transkription von *SCA2* beteiligt ist.

Diese Ergebnisse ließen sich durch weiterführende *SCA2*-Promotoranalysen untermauern. So ließ sich eine erhöhte Aktivität des *SCA2*-Promotors in Zellen, die einen der jeweiligen *SCA2*-Promotor-Reporterkonstrukte sowie das Fusionsprotein ZBRK1 transient exprimierten, beobachten (siehe Abbildung 16A). Diese Resultate sind unter dem weiteren Aspekt interessant, dass bei Vorhandensein des ZBRK1-Bindemotivs ZBS4, welches in Exon 1 lokalisiert, eine höhere Aktivität des *SCA2*-Promotors nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise handelt es sich hierbei um das Bindemotiv, welches sowohl mit dem ZBRK1- als auch mit dem ATXN2-Antikörper validiert werden konnte. Gleiche Beobachtungen wurden erzielt, wenn Zellen neben den entsprechenden *SCA2*-Promotor-Reporterkonstrukten ATXN2Q22 transient exprimierten (siehe Abbildung 16B). Folglich demonstrieren diese Ergebnisse, dass ZBRK1, welcher bisher ausschließlich als transkriptioneller Repressor beschrieben wurde, auch als transkriptioneller Aktivator fungieren kann. Außerdem ergaben die bisherigen Analysen, dass das ATXN2-Protein, welches bisher noch nicht mit transkriptioneller Regulation in Zusammenhang gebracht wurde, den ersten Ko-

Aktivator von ZBRK1 darstellt. Demzufolge belegen diese Resultate, dass ein Komplex bestehend aus ZBRK1 und dem Ko-Aktivator ATXN2 an der Aktivierung des *SCA2*-Gens beteiligt ist (siehe Abbildung 32).



Abbildung 32: Schematische Zusammenfassung der transkriptionellen Aktivierung von *SCA2* durch den ZBRK1/ATXN2-Komplex.

Auch wenn ZBRK1 und andere Proteine der Familie der KRAB-Zink-Finger Proteine vorwiegend als Repressoren beschrieben werden, deuten experimentelle Untersuchungen auf eine duale Funktion dieser transkriptionellen Regulatoren hin. So zeigte eine globale Genexpressionsanalyse mittels HeLa- und U2OS-Zellen, welche transient das Fusionsprotein GFP-ZBRK1 exprimierten, eine Aktivierung zahlreicher Gene [131]. In einer weiteren Studie konnte belegt werden, dass eine Reduzierung des KRAB-Zink-Finger Proteins ZNF263 sowohl an der transkriptionellen Aktivierung als auch an der transkriptionellen Reprimierung zahlreicher Zielgene beteiligt ist [145]. Somit sollte die Möglichkeit nicht außer Acht gelassen werden, dass ZBRK1, wie auch weitere transkriptionelle Proteine, die eine KRAB-Domäne besitzen, neben einer reprimierenden Funktion auch an der transkriptionellen Aktivierung von Genen beteiligt sein könnte.

Um die funktionelle Rolle des Ko-Aktivators ATXN2 für die transkriptionelle Regulierung als auch innerhalb des Komplexes zu charakterisieren, müssten weitere Analysen mit *ATXN2*^{-/-}-defizienten Zellen durchgeführt werden. Zusätzlich kann angenommen werden, dass weitere, für die transkriptionelle Aktivierung wichtige Interaktionspartner mit ATXN2 assoziieren, welche identifiziert und analysiert werden sollten.

Dementsprechend konnte für die ZBRK1/BRCA1-abhängige Reprimierung von *ANG1* bzw. *HMGA2* gezeigt werden, dass diese zusätzlich durch CtIP reguliert wird. Sowohl eine Reduzierung von ZBRK1, BRCA1 oder CtIP führten zu einer Aktivierung des *ANG1*-, bzw. *HMGA2*-Promotors [146-147]. Bemerkenswerterweise scheint

BRCA1, obwohl es nicht direkt an den jeweiligen Promotor bindet, die stärkste Rolle im reprimierenden ZBRK1-Komplex zu übernehmen. Untersuchungen ergaben, dass ZBRK1 auch ohne den Ko-Repressor BRCA1 an den Promotor von *ANG1* binden kann. Allerdings resultierte dies in keinerlei transkriptioneller Reprimierung von *ANG1*, was die Vermutung stärkt, dass die CTRD-vermittelte Interaktion zwischen ZBRK1 und BRCA1 die Bindung an den Promotor stabilisiert und folglich die Promotoraktivität reprimiert. Zellkulturexperimente mit Gliomzellen, welche transient *ANG1* exprimierten, wiesen die gleichen Phänomene wie *BRCA1*^{-/-}/*p53*^{-/-} defiziente Mäuse auf. Dies untermauert die Hypothese, dass BRCA1 die entscheidende Rolle in der Reprimierung von *ANG1* übernimmt [147].

4.4 Der Aktivator Komplex ZBRK1/ ATXN2 reguliert ATM

Zur Identifizierung weiterer Zielgene, die durch ZBRK1 und ATXN2 reguliert werden, wurde ebenfalls mit dem annotierten ZBRK1 Bindemotiv GGGnnnCAGnnnTTT eine genomweite Analyse durchgeführt. Die identifizierten potentiellen Kandidaten wurden mit signifikant veränderten Genen aus einer ATXN2-Defizienz-Genexpressionsanalyse verglichen und resultierten schlussletztendlich in sieben putativen Zielgenen (Abbildung 22).

Interessanterweise stellte eines dieser sieben Kandidaten das *ATM*-Gen (Ataxia-telangiectasia mutated) dar, welches durch Mutation in der Erkrankung Ataxia-telangiectasia bzw. dem Louis-Barr-Syndrom resultiert [128]. Hierbei handelt es sich um eine autosomal rezessive Erkrankung, welche eine erhöhte Prädisposition zu Krebserkrankungen aufweist und in einer frühen progressiven zerebellären Ataxie resultiert. Zusätzlich konnten weitere Anomalien, wie zum Beispiel Immundefizienz, Insulin-resistente Diabetes oder chromosomale Instabilität mit der Krankheit in Verbindung gebracht werden [148].

Das krankheitsauslösende Protein ATM ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche der Familie der Phosphatidylinositol-3 Kinase abhängigen Protein-Kinasen zugeordnet wird. Zahlreiche Substrate werden von ATM phosphoryliert, wie zum Beispiel p53 und BRCA1, welche an der Kontrollfunktion des G1-S-, bzw. G2-M-Kontrollpunktes und somit an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind [149]. Andere Substrate wiederum sind an der Beseitigung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) beteiligt.

Kommt es durch radioaktive Strahlung zu DSB wird ATM über den sogenannten MRN-Komplex‘, bestehend aus MRE11, RAD50 und NBS1, an die DSB rekrutiert [150-151]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass diese Lokalisierung von ATM zur Aktivierung und somit für die Phosphorylierung seiner Substrate notwendig ist [152]. Somit wird ATM eine wichtige Rolle in der Reparaturmaschinerie von DNA-Schäden zugeschrieben, welche von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität ist. Durch Mutationen im *ATM*-Gen können diese Funktionen nicht mehr gewährleistet werden, wodurch es vermehrt zum fehlerhaften Ablauf des Zellzyklus‘ sowie zu einer steigenden Anzahl an nicht reparierten DNA-Schäden kommen kann [127]. Es wird vermutet, dass die daraus resultierende steigende Zellproliferation sowie Toxizität für die Entwicklung von Krebs- und neurodegenerativen Prozessen verantwortlich sein könnte [153].

Im Anschluss sollte der Einfluss des ZBRK1/ATXN2-Komplex‘ auf die Expression von *ATM* untersucht werden. Mittels CHIP-Analyse konnten zwei potentielle ZBRK1-Bindemotive, welche im Promotor von *ATM* identifiziert wurden, mit anti-ZBRK1-Antikörpern nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23). Weiterführende Promotoranalysen mit Reporterkonstrukten, welche die ZBRK1-Bindemotive ZBS1 und ZBS2 beinhalteten, resultierten bei ZBRK1-Expression in einer Aktivierung der *ATM*-Promotoraktivität (siehe Abbildung 24A). Entsprechend führte eine Überexpression des Fusionsproteins MYC-ATXN2Q22 auch zu einer erhöhten *ATM*-Promotoraktivität (siehe Abbildung 24B). Somit konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivierung des *ATM*-Gens durch die CTRD-vermittelte Interaktion zwischen ZBRK1 und ATXN2 reguliert wird. Weitere Untersuchungen mittels RNA-Interferenz zeigten eine geringere mRNA-Konzentration von *ATM* bei reduzierten endogenen *ZBRK1* und/oder *ATXN2* Transkriptlevel (Abbildung 25). Dies könnte möglicherweise ebenfalls, wie bereits erwähnt, auf die geringe Effizienz der RNAi-Moleküle zurückzuführen sein. Auf der anderen Seite könnte dies erneut die Hypothese stärken, dass, neben ZBRK1 und ATXN2, weitere Ko-Regulatoren mit dem Aktivator-Komplex assoziiert und an der Regulierung des *SCA2*- und *ATM*-Gens beteiligt sind.

Interessanterweise konnte ZBRK1 bereits mit der Regulierung von Genen, welche am DNA-Reparaturmechanismus beteiligt sind, in Zusammenhang gebracht werden. So zeigte sich, dass ZBRK1 an der BRCA1-abhängigen Reprimierung des *GADD45α*-Gens beteiligt ist, indem es das ZBRK1-Bindemotiv GGGnnnCAGnnnTTT,

welches im dritten Intron des *GADD45α*-Gens lokalisiert ist, bindet [154]. Durch Behandlung mit UV-Strahlung oder dem DNA-schädigenden Reagenz Methyl-Methanesulfonate zeigten humane Zellen einen Ubiquitin-Proteasom vermittelten Abbau von ZBRK1 und die daraus resultierende Aktivierung der *GADD45α*-Transkription. Zusätzlich führte eine transiente Expression des Fusionsproteins GFP-ZBRK1 zu einer Transkript- und Protein-Abnahme von *GADD45α* [154]. Aufgrund der Tatsache, dass weitere Zielgene von BRCA1 ZBRK1-Bindemotive beinhalten, ist anzunehmen, dass ZBRK1 an der transkriptionellen Regulation weiterer Gene, die am DNA-Reparaturmechanismus beteiligt sind, involviert ist.

4.5 Reduzierte Expression von ZBRK1, ATXN2 und ATM in Kolonkarzinoma

Weitere Untersuchungen ordnen ZBRK1 eine Rolle in der Tumorgenese zu. Es konnte, wie bereits erwähnt, ein Repressorkomplex bestehend aus ZBRK1, BRCA1 und dem CtBP-interagierenden Protein (CtIP), am Promotor von Angiopoietin-1 (ANG1) und HMGA2 (*high mobility group AT-hook 2*) identifiziert werden. In beiden Fällen konnte nachgewiesen werden, dass der reprimierende Komplex mittels ZBRK1 an die annotierten ZBRK1-Bindemotive und somit an den jeweiligen Promotor gebunden vorliegt. Eine unvollständige Komplexbildung führte zur transkriptionellen Aktivierung des *ANG1*- und *HMGA2*-Gens. Somit resultierte die erhöhte Expression von ANG-1 in einer vermehrten Vaskularisierung sowie einer erhöhten Quervernetzung der Kapillar-Blutgefäße [146-147]. Die steigende HMGA2-Expression hingegen führte zu einer zunehmenden Zellzahl mit anormaler aszinöser Größe und einem vermehrten Wachstum von Tumor-Brustgewebe [146]. Zusätzlich ließ sich bereits in unterschiedlichen Krebsarten eine veränderte ZBRK1-Expression nachweisen. So konnte in Brust- und Dickdarmkrebsgewebe eine veränderte ZBRK1-Expression beobachtet werden, welche in den meisten Fällen die Tendenz einer Abnahme zeigte [129-130]. Auch Zellkulturexperimente mit Tumorzellen aus dem Gebärmutterhalskrebs ergaben eine reduzierte Expression des *ZBRK1*-Gens [131]. Interessanterweise führte hier, die Expression eines ZBRK1-Fusionsproteins zur Inhibierung von bösartigem Zellwachstum und Zellinvasion. Zudem konnte eine Reduzierung der Metastasenbildung beobachtet werden, was ZBRK1 wiederum eine

mögliche Funktion in der Supprimierung von Metastasen zuschreiben könnte. Bemerkenswerterweise ließ sich im Rahmen dieser Arbeit eine Assoziation zwischen ZBRK1, ATXN2, ATM und Krebs beobachten.

So zeigten Dickdarmkrebs-Gewebeproben von fünf unterschiedlichen Patienten, welche alle mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht wurden, im Vergleich zum Kontrollgewebe, eine reduzierte Expression von ZBRK1. Einhergehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, konnte auch hier eine Korrelation zwischen der ZBRK1-Expression und der mRNA-Konzentration von ATXN2 beobachtet werden (Abbildung 25). Somit resultierte die ZBRK1-Transkriptions-Abnahme in allen Patienten in einer signifikanten Reduzierung der SCA2-Transkription.

Erstaunlicherweise weisen bereits vorherige Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen ATXN2 und Krebs auf. So konnte ATXN2, welches vorwiegend mit der neurodegenerativen Erkrankung SCA2 assoziiert wird, mit Neuroblastoma-Tumoren in Verbindung gebracht werden. Hierbei handelt es sich um einen aggressiven neuronalen Tumor, der vorwiegend bei jungen Kindern auftritt. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression pro-apoptotischer Gene mit einer guten Prognose korreliert. Im Gegensatz dazu, führen Neuroblastoma-Zellen, die das Onkogen *MYCN* exprimieren, meist zur Bildung aggressiver Tumore, welche dementsprechend oft eine Resistenz gegenüber Therapien aufweisen. Wiedemeyer *et al.* zeigten, dass prä-apoptische Neuroblastoma-Zellen sowie Neuroblastoma-Tumore, die nicht das Onkogen *MYCN* exprimierten, eine erhöhte Expression von ATXN2 aufwiesen. Hingegen ließ sich eine geringere ATXN2-Konzentration in Neuroblastoma-Tumoren nachweisen, welche *MYCN* exprimierten [104]. Demzufolge sowie aufgrund der Resultate, welche geringere ATXN2-mRNA-Konzentrationen in Kolonkarzinoma mit schlechter Prognose aufweisen (Abbildung 26) kann spekuliert werden, dass die Expression von ATXN2 eine funktionelle Rolle in der Entwicklung der Tumorgenese bestimmter Karzinoma ausüben könnte.

Zusätzlich konnte in den Kolonkarzinomproben von vier Patienten eine weitere Korrelation zwischen der reduzierten Genexpression von ZBRK1 bzw. ATXN2 und einer signifikanten Abnahme der *ATM*-mRNA-Konzentration beobachtet werden. Wie bereits zuvor erwähnt, weisen Patienten, welche am Louis-Barr-Syndrom erkranken, eine erhöhte Prädisposition für Krebserkrankungen, auf [148]. So ergaben Epidemiologische Studien, dass heterozygote Menschen einem zweifach höheren Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, ausgesetzt sind [155-158]. Zusätzlich steigt sowohl

bei heterozygoten als auch bei homozygoten Allelträgern das Risiko, ein Non-Hodgkin's-Lymphoma zu entwickeln [159]. Desweiteren ergaben diese Studien eine 15 %ige Wahrscheinlichkeit einer Assoziation zwischen einer Deletion des *ATM*-Gens und der Entwicklung eines Non-Hodgkin's-Lymphoma oder einer B-Zell-chronischen Lymphozytischen Leukämie [160]. Unabhängig davon, zeigten zusätzliche Beobachtungen, dass Krebserkrankungen welche durch mutiertes *ATM* prädisponiert sind, häufig auf eine fehlerhafte DNA-Reparaturmaschinerie zurückzuführen sind [128]. Da eine veränderte Expression des *ATM*-Gens in der Entstehung von Krebsgewebe beteiligt sein kann und *ZBRK1* sowie *ATXN2* an der Aktivierung der *ATM*-Genexpression beteiligt sind, lässt sich vermuten, dass der Aktivator-Komplex *ZBRK1/ATXN2* eine funktionelle Rolle in der Tumorgenese ausüben könnte (siehe Abbildung 33). Definitiv sind weitere Untersuchungen von Nöten, um die genaue funktionelle Aufgabe von *ATXN2* sowie *ZBRK1/ATXN2* in der Karzinogenese verstehen zu können.

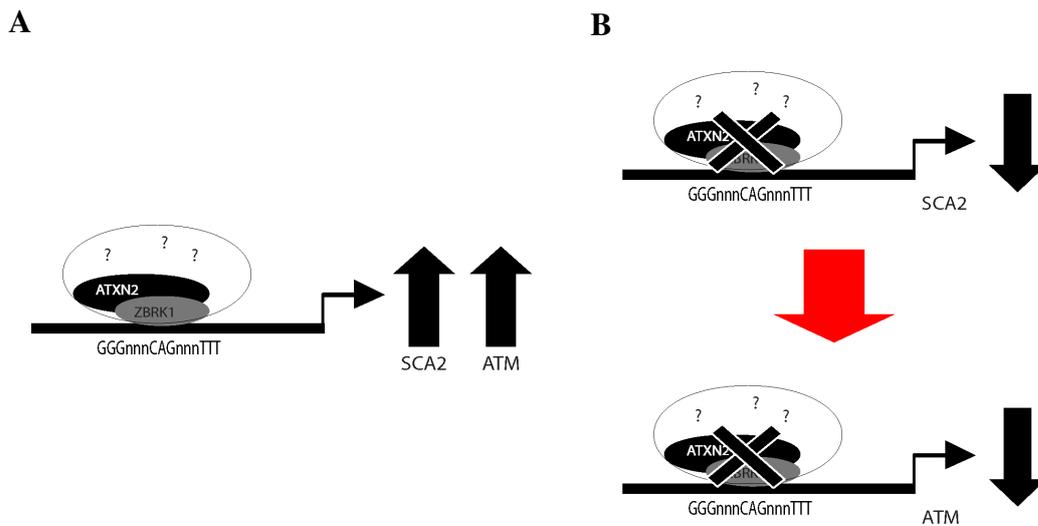


Abbildung 33: Schematische Zusammenfassung der transkriptionellen Regulation von *ATM* durch den *ZBRK1/ATXN2*-Komplex. (A) *SCA2* und *ATM* werden durch den *ZBRK1/ATXN2*-Komplex aktiviert. (B) Die Beeinträchtigung des Aktivatorkomplex' führt zur transkriptionellen Abnahme von *SCA2* und *ATM*.

4.6 Transkriptionelle Dysregulation in der Pathogenese von *SCA2*?

Interessanterweise ergaben die durchgeführten Y2H-Analysen, dass die Interaktion zwischen dem C-terminalen Bereich von *ZBRK1* und dem N-terminalen Bereich von

ATXN2Q79 zu einer Abnahme der relativen Reporteraktivität führte und demzufolge, im Vergleich zur Interaktion mit dem N-terminalen Bereich von ATXN2Q22, abgeschwächt ist (Abbildung 3). Diese Resultate führten zu der Annahme, dass eine expandierte Polyglutaminregion in einer Beeinträchtigung der Assoziierung von ZBRK1 und ATXN2 resultieren könnte. Weiterführende Ko-IP-Studien in humanen Zellen ergaben, dass ZBRK1 mit der pathogenen Form von ATXN2 interagiert (siehe Abbildung 27). Allerdings konnte die Frage einer möglichen Beeinflussung der Interaktion durch einen verlängerten Polyglutaminbereich mittels Ko-IP nicht abschließend beantwortet werden. Die mikroskopischen Ko-Lokalisierungs-Studien zeigen, dass ZBRK1 ebenfalls mit der pathogenen Form von ATXN2, dem Fusionsprotein ATXN2Q79, in nukleären ZBRK1-Foci assoziiert (Abbildung 28). Wie bereits zuvor erwähnt, konnten diese als PML-NBs charakterisiert werden. Untersuchungen an postmortalen Gehirnproben von SCA2-Patienten ergaben eine Ko-Lokalisierung von pathogenem ATXN2 und PML. Diese Beobachtungen sind interessant, da zusätzlich in weiteren Untersuchungen mit postmortalen Gehirnproben von SCA1-, SCA3-, SCA7-, DRPLA- und SCA17-Patienten ebenfalls eine Assoziierungen zwischen PML und dem entsprechenden krankheitsauslösenden Protein aufgezeigt werden konnte [161]. Zudem wurde bei Ko-Lokalisierung der ZBRK1 und ATXN2Q79-Foci eine geringere zytoplasmatische ATXN2-Immunreaktivität beobachtet. Desweiteren konnte in diesen Zellen eine Veränderung in Größe und Zahl der einzelnen Foci beobachtet werden (Abbildung 28). Diese Beobachtungen können durch Untersuchungen von Patientenmaterial untermauert werden, welche ebenfalls Veränderungen in Größe und Zahl von PML-Strukturen aufwiesen. Heutzutage wird vermutet, dass PML, aufgrund seiner RING-Finger Domäne eine funktionelle Rolle am Abbau der Polyglutaminproteine ausüben könnte [161].

Im folgenden wurde der Einfluss der expandierten Polyglutaminregion auf die Funktionalität des Aktivator-Komplex 'ZBRK1/ATXN2 untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression des ATXN2Q79-Fusionsproteins im Vergleich zur Expression von ATXN2Q22 zu einer geringeren Aktivierung des SCA2-Promotors führte (siehe Abbildung 34).

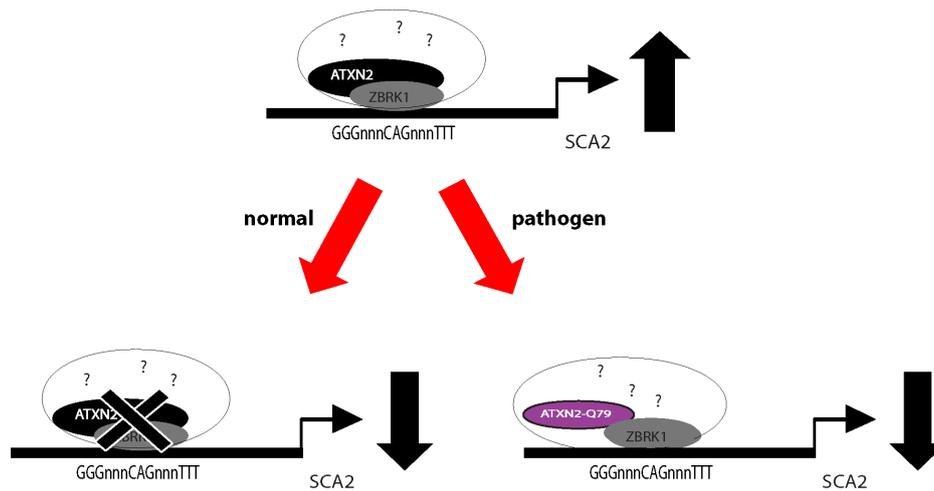


Abbildung 34: Einfluss der verlängerten Polyglutaminregion auf die transkriptionelle Regulation des SCA2-Gens in der Pathogenese von SCA2.

Darüber hinaus konnte auch ein Einfluss von pathogenem ATXN2 auf die *ATM*-Expression beobachtet werden. So zeigten Zellen die ATXN2Q79 exprimierten eine eindeutige geringere Aktivierung des *ATM*-Promotors (Abbildung 29B). Die transiente Expression von ATXN2Q22 hingegen resultierte, wie bereits zuvor beschrieben, in einer stark erhöhten *ATM*-Promotoraktivität. Demzufolge deuten auch diese Resultate darauf hin, dass die Regulierung von *ATM* ebenfalls durch die Expression von ATXN2 mit expandierter Polyglutaminregion beeinflusst werden könnte und entsprechend in einer geringeren Transkription resultieren könnte. Erstaunlicherweise ergaben erste mikroskopische Analysen mit Zellen, welche ATXN2Q79 exprimierten und zudem mit oxidativem Stress behandelt wurden, eine eindeutig veränderte Immunreaktivität der phosphorylierten *ATM*-Substrate (Abbildung 30).

Interessanterweise konnte mittels einer Genexpressionsanalyse mit *ATM*-defizienten-Zellen gezeigt werden, dass eine reduzierte Expression von *ATM* in einer geringeren mRNA-Konzentration der *ATM*-Substrate resultieren kann. So konnte zum Beispiel eine geringere p53-Konzentration beobachtet werden [162]. Entsprechend resultiert eine *ATM*-Defizienz unter genotoxischen Bedingungen in einer beeinträchtigten Phosphorylierung und somit in einer schlechteren Aktivierung der *ATM*-Substrate. So ergaben Untersuchungen mit *ATM*-defizienten neuronalen Stammzellen, welche unter physiologischen Bedingungen eine normale Stressantwort ausüben, eine verminderte Aktivierung von H2AX bei Behandlung mit genotoxischem

Stress [133]. Dies führt zur Annahme, dass eine verminderte ATM-Konzentration in einer beeinträchtigten Phosphorylierung der ATM-Substrate führen könnte.

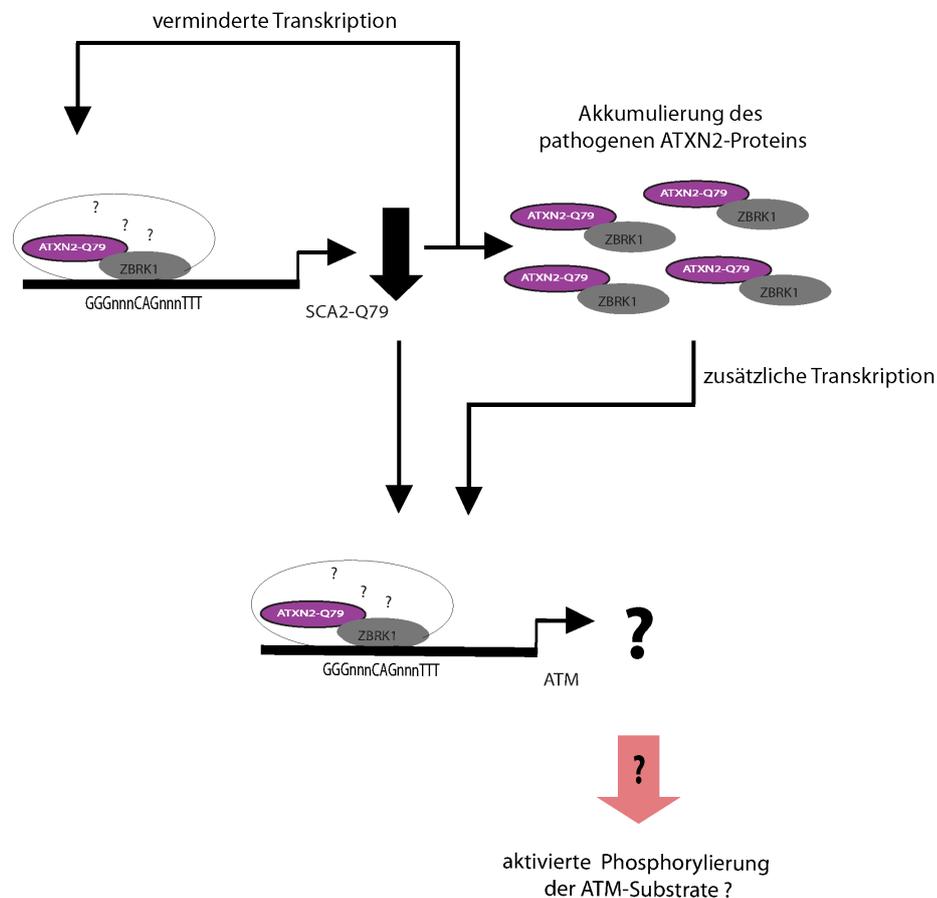


Abbildung 35: Zusammenfassung der veränderten transkriptionellen Regulation von ATM durch die Expression von pathogenem ATXN2.

Interessanterweise konnte ein Zusammenhang zwischen SCA2 und phosphorylierten ATM-Substraten beobachtet werden. So zeigten SCA2-Fibroblasten, welche oxidativem Stress ausgesetzt waren, eine vermehrte Aktivierung der phosphorylierten ATM/ATR-Substrate sowie eine stärkere Immunreaktivität von phosphoryliertem H2AX [134]. Zusätzlich konnte in Zellen, welche pathogenes Huntingtin-Protein exprimierten, vermehrte DNA-Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche beobachtet werden, welche in der Bildung von Huntingtin-Aggregaten resultierten. Desweiteren konnte sowohl eine erhöhte Schädigung der DNA als auch eine daraus resultierende Aktivierung von H2AX in transgenen HD-Mäusen beobachtet werden. Demzufolge kann angenommen werden,

dass die Schädigung von DNA sowie die damit vermittelte Signalantwort mit Neurodegeneration in Zusammenhang gebracht werden kann [135].

Diese Beobachtungen stehen scheinbar im Kontrast zu den Ergebnissen meiner Arbeiten, welche keine erhöhte Expression von ATM nachweisen konnte. Dennoch sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass im Laufe der Krankheit eine Akkumulierung von pathogenem ATXN2 durch einen verminderten Abbau vermutet wird [43]. So könnte angenommen werden, dass die transkriptionelle Aktivität des ZBRK1/ATXN2-Komplexes beeinträchtigt ist, der beobachtete Effekt allerdings durch den verminderten Abbau von pathogenem ATXN2 überdeckt würde und folglich in einer gesteigerten ATM-Expression und erhöhten Phosphorylierung der ATM-Substrate resultieren könnte. Demzufolge lässt sich annehmen, dass ATM eine funktionelle Rolle in der Pathogenese von SCA2 ausüben könnte (siehe Abbildung 35).

Interessanterweise ergaben kürzlich weitere Untersuchungen eine zytoplasmatische Lokalisierung des ATM-Proteins, welche ausschließlich auf neuronales Gewebe begrenzt wird. Lin *et al* postulierten einen Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer Lokalisierung und einer weiteren Funktionalität von ATM. So konnte gezeigt werden, dass hier durch DNA-Schädigung, im Vergleich zu nukleärem ATM, keine Phosphorylierung der Aminosäure S1981 und demzufolge keine Aktivierung der Kinaseaktivität von zytoplasmatischem ATM beobachtet werden konnte. Desweiteren konnte eine Assoziierung von nicht-nukleärem ATM und den Vesikelproteinen VAMP2 und Synapsin-1 nachgewiesen werden. Untersuchungen zur ATM-Defizienz in Nervenzellen resultierten in einem dysregulierten synaptischen Vesikelzyklus sowie in einer dysregulierten Langzeitpotenzierung im Hippocampus [163]. Dies führte zu der Vermutung, dass neurologische Symptome im Louis-Barr-Syndrom eventuell auf die funktionelle Beeinträchtigung von nicht-nukleärem ATM zurückzuführen sind.

Diese Ergebnisse sind interessant, da bereits ein Zusammenhang zwischen ATXN2 und Endozytose bzw. der daraus resultierenden Vesikelbildung beobachtet werden konnte. So konnte gezeigt werden, dass ATXN2 mit den Endophilinen-A1 und -A3 assoziiert, welche an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt sind [58]. Bemerkenswerterweise ließ sich ein Zusammenhang zwischen der ATXN2-Konzentration und der Initialisierung des aktivierten Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) beobachten. Hierbei handelt es sich um eine Tyrosinrezeptorkinase, welche durch Bindung von EGF (Epidermaler-Wachstumsfaktor) zur Aktivierung von

Signalkaskaden führt und unter anderem in der Reorganisation der Aktinfilamente resultiert. So ergaben experimentelle Untersuchungen, dass eine erhöhte Expression von ATXN2 in einer geringeren Initialisierung und der damit verbundenen Vesikelbildung von EGFR resultierte. Hingegen zeigten ATXN2-defiziente-Mäuse eine verringerte EGFR-Expression, was vermuten lässt, dass ATXN2 an der Initialisierung des EGF-gebundenen EGF-Rezepts beteiligt ist [164].

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass transkriptionelle Dysregulation ein potentieller Mechanismus in der Pathogenese von SCA2 darstellen könnte. Ob und wie ATM funktionell an der Pathogenese von SCA2 beteiligt ist, muss anhand weiterer Analysen im SCA2-Modell sowie in SCA2-Fibroblasten untersucht werden. Desweiteren wäre es von großem Interesse, anhand von Patientenproben, den Einfluss auf Transkriptions- und Proteinebene in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung sowie der Länge der expandierten Polyglutaminregion genauer zu untersuchen. Auch sollte ein Fokus auf einen putativen Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen ATM-Expression in Neuronen und der ATXN2-beteiligten Vesikelbildung gelegt werden, um weitere Einblicke in dem bisher nur schwach verstandenen Pathomechanismus von SCA2 zu erlangen.

5. Zusammenfassung

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 2 ist eine neurodegenerative Erkrankung, welche autosomal dominant vererbt und durch eine expandierte CAG-Wiederholung im *SCA2*-Gen ausgelöst wird. Die genaue Funktion des *SCA2*-Genprodukts Ataxin-2 (ATXN2) ist noch nicht ganz verstanden. Aufgrund struktureller Eigenschaften sowie experimentellen Beobachtungen wird ATXN2 eine Rolle im RNA-Metabolismus, bei der Endozytose und bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts zugeschrieben.

Erste Yeast-two-Hybrid-(Y2H)-Analysen mit ATXN2 resultierten in der Identifizierung des transkriptionellen Regulators ZBRK1 (*BRCA1-interacting protein with a KRAB domain 1*) als potentiellen Interaktionspartner von ATXN2, welcher an der Reprimierung von Genen beteiligt ist. Weitergehende Analysen konnten die Assoziation beider Proteine mittels Y2H- und Ko-Immunopräzipitations-Experimenten bestätigen. Mikroskopische Analysen zeigten eine Ko-Lokalisierung beider Proteine im Zellkern. Interessanterweise konnte eine Korrelation zwischen erhöhter sowie reduzierter ZBRK1- und ATXN2-Expression beobachtet werden, was die Bildung eines regulatorischen Komplexes bestehend aus ZBRK1 und ATXN2 vermuten ließ. Bioinformatische Analysen mit dem bekannten ZBRK1-Bindemotiv führten zur Identifizierung potentieller ZBRK1-Bindemotive im *SCA2*-Promotor, welche durch Chromatin-Immunopräzipitation(ChIP)-, Promotoranalysen sowie durch Generierung eines spezifischen Intrabodys mit ZBRK1/ATXN2-interferierenden Eigenschaften charakterisiert wurden. Bemerkenswerterweise konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ATXN2 als Ko-Regulator von ZBRK1 an der Aktivierung der eigenen *SCA2*-Transkription beteiligt ist, und somit den ersten Ko-Aktivator von ZBRK1 darstellt. Durch kombinierte bioinformatische Analysen und ATXN2-Defizienz-Experimente, konnte ein neues Zielgen des Komplexes, die Serine/Threonine-Kinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), identifiziert- sowie eine Aktivierung der *ATM*-Transkription durch den ZBRK1/ATXN2-Komplex mittels ChIP- bzw. Promotoranalysen bestätigt werden. Erste Hinweise aus Y2H-Analysen ließen eine Abnahme der ZBRK1/ATXN2-Interaktion mit zunehmender Polyglutaminlänge im ATXN2-Protein (ATXN2Q79) vermuten, welche wiederum anhand einer geringeren *SCA2*- bzw. *ATM*-Promotoraktivität durch die Expression von ATXN2Q79 bestätigt werden konnte. Abschließend konnte in Zellen, welche ATXN2Q79 exprimierten und mit oxidativem Stress behandelt wurden, eine veränderte Phosphorylierung der ATM-Substrate beobachtet werden, welche eine mögliche Konsequenz der beeinträchtigten

ZBRK1/ATXN2Q79-Aktivierung von *ATM* sein könnte. Zusammenfassend konnte zum ersten Mal eine Beteiligung von ATXN2 in der transkriptionellen Aktivierung von Genen gezeigt werden. Interessanterweise beeinträchtigt die pathogene Polyglutaminexpansion diese Aktivierung des *ATM*-Promotors. Demzufolge könnte eine Kombination aus transkriptioneller Dysregulation und einer veränderten Phosphorylierung der *ATM*- Substrate einen potentiellen Mechanismus in der Pathogenese von SCA2 darstellen.

6. Summary

Spinocerebellar ataxia type 2 is an autosomal dominant inherited neurodegenerative disease, which is caused by an expanded CAG-repeat in the *SCA2* gene. The cellular function of the *SCA2* gene product Ataxin-2 (ATXN2) is not yet entirely understood. Protein function prediction and experimental studies have involved ATXN2 in RNA metabolism, endocytosis and in the organisation of the actin-cytoskeleton.

Yeast-to-hybrid (Y2H) and co-immunoprecipitation assays have shown that ATXN2 interacts with ZBRK1 (*BRCA1-interacting protein with a KRAB domain 1*) and, microscopic analyses have shown co-localisation of both proteins in the nucleus. Over-expression and Knock-down experiments exhibited a correlation between ZBRK1 and ATXN2 transcripts levels, suggesting that a complex comprising ZBRK1 and ataxin-2 might regulate *SCA2* gene transcription. Furthermore, bioinformatic analysis using the known ZBRK1 consensus DNA-binding motif revealed ZBRK1 binding sites in the *SCA2* promoter. These predicted sites were experimentally validated by chromatin-immunoprecipitation, promoter-reporter assays and, disruption of ZBRK1/ATXN2 interaction by intrabody over-expression. Our results confirm that ataxin-2 acts as a co-regulator of ZBRK1 activating its own transcription. This work shows evidence for the first ZBRK1 co-activator described in the literature.

Thereafter a combination of bioinformatic analysis and perturbation experiments resulted in the identification of a new target: the serin/threonin kinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*). Predicted ZBRK1-binding sites in the ATM promoter were confirmed by chromatin-immunoprecipitation experiments. Promoter-reporter analyses showed an elevated ATM-promoter-activity when ZBRK1 and ATXN2 were over-expressed, illustrating a transcriptional activation of ATM through the ZBRK1/ATXN2 complex.

Interestingly, ATXN2Q79 over-expression reduced the levels of both *SCA2* and ATM promoter activity and caused a modified phosphorylation pattern on ATM substrates under oxidative stress conditions. Consequently, transcriptional deregulation and impaired phosphorylation of ATM substrates might constitute a potential mechanism in the pathogenesis of *SCA2*.

7. Literaturverzeichnis

1. Lessing, D. and N.M. Bonini, *Polyglutamine genes interact to modulate the severity and progression of neurodegeneration in Drosophila*. PLoS Biol, 2008. **6**(2): p. e29.
2. Butler, R. and G.P. Bates, *Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(10): p. 784-96.
3. Cummings, C.J. and H.Y. Zoghbi, *Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. **1**: p. 281-328.
4. Truant, R., et al., *Canadian Association of Neurosciences Review: polyglutamine expansion neurodegenerative diseases*. Can J Neurol Sci, 2006. **33**(3): p. 278-91.
5. Reddy, P.S. and D.E. Housman, *The complex pathology of trinucleotide repeats*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(3): p. 364-72.
6. Schols, L., et al., *Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis*. Lancet Neurol, 2004. **3**(5): p. 291-304.
7. Bauer, P.O. and N. Nukina, *The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies*. J Neurochem, 2009. **110**(6): p. 1737-65.
8. Caviston, J.P. and E.L. Holzbaur, *Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(4): p. 147-55.
9. DiFiglia, M., et al., *Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons*. Neuron, 1995. **14**(5): p. 1075-81.
10. Hoffner, G., P. Kahlem, and P. Djian, *Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 5): p. 941-8.
11. Pal, A., et al., *Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease*. J Cell Biol, 2006. **172**(4): p. 605-18.
12. Chen, S., et al., *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, 2004. **13**(1): p. 53-67.
13. Helmlinger, D., et al., *Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(12): p. 1257-65.

14. Shimohata, T., et al., *Expanded polyglutamine stretches interact with TAFIII30, interfering with CREB-dependent transcription*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 29-36.
15. Brinkmann, A.O. and J. Trapman, *Androgen receptor mutants that affect normal growth and development*. Cancer Surv, 1992. **14**: p. 95-111.
16. Matilla, A., et al., *The cerebellar leucine-rich acidic nuclear protein interacts with ataxin-1*. Nature, 1997. **389**(6654): p. 974-8.
17. Matilla, A. and M. Radrizzani, *The Anp32 family of proteins containing leucine-rich repeats*. Cerebellum, 2005. **4**(1): p. 7-18.
18. Irwin, S., et al., *RNA association and nucleocytoplasmic shuttling by ataxin-1*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 1): p. 233-42.
19. Tsai, C.C., et al., *Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4047-52.
20. Yue, S., et al., *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, 2001. **10**(1): p. 25-30.
21. Li, F., et al., *Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45004-12.
22. Zhang, S., et al., *Drosophila atrophin homolog functions as a transcriptional corepressor in multiple developmental processes*. Cell, 2002. **108**(1): p. 45-56.
23. Burnett, B.G. and R.N. Pittman, *The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4330-5.
24. Zhuchenko, O., et al., *Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 62-9.
25. Filla, A., et al., *Spinocerebellar ataxia type 2 in southern Italy: a clinical and molecular study of 30 families*. J Neurol, 1999. **246**(6): p. 467-71.
26. Moseley, M.L., et al., *Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families*. Neurology, 1998. **51**(6): p. 1666-71.
27. Pang, J., et al., *A common disease haplotype segregating in spinocerebellar ataxia 2 (SCA2) pedigrees of diverse ethnic origin*. Eur J Hum Genet, 1999. **7**(7): p. 841-5.

28. Riess, O., et al., *SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients*. Neurogenetics, 1997. **1**(1): p. 59-64.
29. Koeppen, A.H., *The pathogenesis of spinocerebellar ataxia*. Cerebellum, 2005. **4**(1): p. 62-73.
30. Lastres-Becker, I., U. Rub, and G. Auburger, *Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2)*. Cerebellum, 2008. **7**(2): p. 115-24.
31. Wadia, N.H. and R.K. Swami, *A new form of heredo-familial spinocerebellar degeneration with slow eye movements (nine families)*. Brain, 1971. **94**(2): p. 359-74.
32. Koeppen, A.H., *The Purkinje cell and its afferents in human hereditary ataxia*. J Neuropathol Exp Neurol, 1991. **50**(4): p. 505-14.
33. Estrada, R., et al., *Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2): morphometric analyses in 11 autopsies*. Acta Neuropathol, 1999. **97**(3): p. 306-10.
34. Gierga, K., et al., *Involvement of the cranial nerves and their nuclei in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2)*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(6): p. 617-31.
35. Rub, U., et al., *Extended pathoanatomical studies point to a consistent affection of the thalamus in spinocerebellar ataxia type 2*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2005. **31**(2): p. 127-40.
36. Rub, U., et al., *Spinocerebellar ataxias types 2 and 3: degeneration of the pre-cerebellar nuclei isolates the three phylogenetically defined regions of the cerebellum*. J Neural Transm, 2005. **112**(11): p. 1523-45.
37. Imbert, G., et al., *Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats*. Nat Genet, 1996. **14**(3): p. 285-91.
38. Pulst, S.M., et al., *Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2*. Nat Genet, 1996. **14**(3): p. 269-76.
39. Sanpei, K., et al., *Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT*. Nat Genet, 1996. **14**(3): p. 277-84.
40. Sahba, S., et al., *Genomic structure of the human gene for spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) on chromosome 12q24.1*. Genomics, 1998. **47**(3): p. 359-64.

41. Choudhry, S., et al., *CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(21): p. 2437-46.
42. Nechiporuk, T., et al., *The mouse SCA2 gene: cDNA sequence, alternative splicing and protein expression*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(8): p. 1301-9.
43. Huynh, D.P., et al., *Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2*. Ann Neurol, 1999. **45**(2): p. 232-41.
44. Kiehl, T.R., et al., *Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p. 17-24.
45. Albrecht, M., et al., *Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3*. Eur J Biochem, 2004. **271**(15): p. 3155-70.
46. Waldherr, M., et al., *A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast*. Curr Genet, 1993. **24**(4): p. 301-6.
47. Beggs, J.D., *Lsm proteins and RNA processing*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 3): p. 433-8.
48. He, W. and R. Parker, *Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(3): p. 346-50.
49. Shibata, H., D.P. Huynh, and S.M. Pulst, *A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(9): p. 1303-13.
50. Ciosk, R., M. DePalma, and J.R. Priess, *ATX-2, the C. elegans ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline*. Development, 2004. **131**(19): p. 4831-41.
51. Ralser, M., et al., *An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2*. J Mol Biol, 2005. **346**(1): p. 203-14.
52. Satterfield, T.F. and L.J. Pallanck, *Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(16): p. 2523-32.
53. Nonhoff, U., et al., *Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(4): p. 1385-96.
54. Andrei, M.A., et al., *A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies*. RNA, 2005. **11**(5): p. 717-27.

55. Cougot, N., S. Babajko, and B. Seraphin, *Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells*. J Cell Biol, 2004. **165**(1): p. 31-40.
56. van Dijk, E., et al., *Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures*. EMBO J, 2002. **21**(24): p. 6915-24.
57. Kedersha, N. and P. Anderson, *Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(Pt 6): p. 963-9.
58. Ralser, M., et al., *Ataxin-2 and huntingtin interact with endophilin-A complexes to function in plastin-associated pathways*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(19): p. 2893-909.
59. Reutens, A.T. and C.G. Begley, *Endophilin-1: a multifunctional protein*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(10): p. 1173-7.
60. Delanote, V., J. Vandekerckhove, and J. Gettemans, *Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(7): p. 769-79.
61. Lim, J., et al., *A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration*. Cell, 2006. **125**(4): p. 801-14.
62. Al-Ramahi, I., et al., *dAtaxin-2 mediates expanded Ataxin-1-induced neurodegeneration in a Drosophila model of SCA1*. PLoS Genet, 2007. **3**(12): p. e234.
63. Mangus, D.A., N. Amrani, and A. Jacobson, *Pbp1p, a factor interacting with Saccharomyces cerevisiae poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7383-96.
64. Collier, J.M., et al., *The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes*. RNA, 2001. **7**(12): p. 1717-27.
65. Fischer, N. and K. Weis, *The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1*. EMBO J, 2002. **21**(11): p. 2788-97.
66. Mazzoni, C., et al., *A truncated form of KILsm4p and the absence of factors involved in mRNA decapping trigger apoptosis in yeast*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(2): p. 721-9.

67. Swisher, K.D. and R. Parker, *Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10006.
68. Mangus, D.A., et al., *Identification of factors regulating poly(A) tail synthesis and maturation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4196-206.
69. Maine, E.M., et al., *Caenorhabditis elegans atx-2 promotes germline proliferation and the oocyte fate*. Genetics, 2004. **168**(2): p. 817-30.
70. Satterfield, T.F., S.M. Jackson, and L.J. Pallanck, *A Drosophila homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation*. Genetics, 2002. **162**(4): p. 1687-702.
71. Saudou, F., et al., *Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions*. Cell, 1998. **95**(1): p. 55-66.
72. Lunkes, A. and J.L. Mandel, *A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(9): p. 1355-61.
73. Lunkes, A., et al., *Properties of polyglutamine expansion in vitro and in a cellular model for Huntington's disease*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1999. **354**(1386): p. 1013-9.
74. Aronin, N., et al., *Are there multiple pathways in the pathogenesis of Huntington's disease?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1999. **354**(1386): p. 995-1003.
75. Reddy, P.H., et al., *Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 198-202.
76. Brooks, B.P. and K.H. Fischbeck, *Spinal and bulbar muscular atrophy: a trinucleotide-repeat expansion neurodegenerative disease*. Trends Neurosci, 1995. **18**(10): p. 459-61.
77. Katsuno, M., et al., *Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy*. Neuron, 2002. **35**(5): p. 843-54.
78. Li, M., et al., *Nonneural nuclear inclusions of androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy*. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 695-701.

79. Koyano, S., et al., *Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study*. Neurosci Lett, 1999. **273**(2): p. 117-20.
80. Huynh, D.P., et al., *Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 44-50.
81. Aguiar, J., et al., *Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice*. Neurosci Lett, 2006. **392**(3): p. 202-6.
82. Huynh, D.P., et al., *Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(13): p. 1485-96.
83. Chai, Y., et al., *Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(4): p. 673-82.
84. Paulson, H.L., et al., *Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3*. Neuron, 1997. **19**(2): p. 333-44.
85. Stenoien, D.L., et al., *Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(5): p. 731-41.
86. Yvert, G., et al., *Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(17): p. 2491-506.
87. Nakamura, K., et al., *SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(14): p. 1441-8.
88. Davies, J.E., S. Sarkar, and D.C. Rubinsztein, *The ubiquitin proteasome system in Huntington's disease and the spinocerebellar ataxias*. BMC Biochem, 2007. **8 Suppl 1**: p. S2.
89. Huynh, D.P., et al., *Parkin is an E3 ubiquitin-ligase for normal and mutant ataxin-2 and prevents ataxin-2-induced cell death*. Exp Neurol, 2007. **203**(2): p. 531-41.

90. Bercovich, B., et al., *Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9002-10.
91. Schmidt, T., et al., *Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions*. Ann Neurol, 2002. **51**(3): p. 302-10.
92. Zander, C., et al., *Similarities between spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) cell models and human brain: proteins recruited in inclusions and activation of caspase-3*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(22): p. 2569-79.
93. Jana, N.R., et al., *Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(13): p. 2009-18.
94. Kobayashi, Y., et al., *Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8772-8.
95. Muchowski, P.J., et al., *Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7841-6.
96. Warrick, J.M., et al., *Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in Drosophila by the molecular chaperone HSP70*. Nat Genet, 1999. **23**(4): p. 425-8.
97. Cummings, C.J., et al., *Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(14): p. 1511-8.
98. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
99. Li, S.H., et al., *Intranuclear huntingtin increases the expression of caspase-1 and induces apoptosis*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(19): p. 2859-67.
100. Chou, A.H., et al., *Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL*. Neurobiol Dis, 2006. **21**(2): p. 333-45.

101. Tsai, H.F., H.J. Tsai, and M. Hsieh, *Full-length expanded ataxin-3 enhances mitochondrial-mediated cell death and decreases Bcl-2 expression in human neuroblastoma cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **324**(4): p. 1274-82.
102. Wang, H.L., et al., *Polyglutamine-expanded ataxin-7 activates mitochondrial apoptotic pathway of cerebellar neurons by upregulating Bax and downregulating Bcl-x(L)*. *Cell Signal*, 2006. **18**(4): p. 541-52.
103. Young, J.E., et al., *Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk*. *J Neurosci*, 2009. **29**(7): p. 1987-97.
104. Wiedemeyer, R., et al., *Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(3): p. 401-11.
105. Benn, C.L., et al., *Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner*. *J Neurosci*, 2008. **28**(42): p. 10720-33.
106. Zuccato, C., et al., *Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease*. *Science*, 2001. **293**(5529): p. 493-8.
107. Rigamonti, D., et al., *Loss of huntingtin function complemented by small molecules acting as repressor element 1/neuron restrictive silencer element silencer modulators*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(34): p. 24554-62.
108. Hay, D.G., et al., *Progressive decrease in chaperone protein levels in a mouse model of Huntington's disease and induction of stress proteins as a therapeutic approach*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(13): p. 1389-405.
109. Imbriano, C., et al., *HSP-CBF is an NF-Y-dependent coactivator of the heat shock promoters CCAAT boxes*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 26332-9.
110. Merienne, K., et al., *Polyglutamine expansion induces a protein-damaging stress connecting heat shock protein 70 to the JNK pathway*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 16957-67.
111. Yamanaka, T., et al., *Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF-Y transcription factor*. *EMBO J*, 2008. **27**(6): p. 827-39.
112. Bae, B.I., et al., *p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease*. *Neuron*, 2005. **47**(1): p. 29-41.
113. Steffan, J.S., et al., *The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(12): p. 6763-8.

114. Dunah, A.W., et al., *Sp1 and TAFIII30 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease*. Science, 2002. **296**(5576): p. 2238-43.
115. Li, S.H., et al., *Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(5): p. 1277-87.
116. Qiu, Z., et al., *Sp1 is up-regulated in cellular and transgenic models of Huntington disease, and its reduction is neuroprotective*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16672-80.
117. Nucifora, F.C., Jr., et al., *Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2423-8.
118. McCampbell, A., et al., *CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(14): p. 2197-202.
119. Strom, A.L., L. Forsgren, and M. Holmberg, *A role for both wild-type and expanded ataxin-7 in transcriptional regulation*. Neurobiol Dis, 2005. **20**(3): p. 646-55.
120. La Spada, A.R., et al., *Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7*. Neuron, 2001. **31**(6): p. 913-27.
121. Palhan, V.B., et al., *Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8472-7.
122. Sultan, M., et al., *A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome*. Science, 2008. **321**(5891): p. 956-60.
123. Zheng, L., et al., *Sequence-specific transcriptional corepressor function for BRCA1 through a novel zinc finger protein, ZBRK1*. Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 757-68.
124. Turnbull, V.J., et al., *Different ataxin-2 antibodies display different immunoreactive profiles*. Brain Res, 2004. **1027**(1-2): p. 103-16.
125. Luciani, J.J., et al., *PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 12): p. 2518-31.
126. Pang, J.T., et al., *Neuronal intranuclear inclusions in SCA2: a genetic, morphological and immunohistochemical study of two cases*. Brain, 2002. **125**(Pt 3): p. 656-63.

127. Lavin, M.F., *Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(10): p. 759-69.
128. Boder, E., *Ataxia-telangiectasia: an overview*. Kroc Found Ser, 1985. **19**: p. 1-63.
129. Garcia, V., et al., *Altered expression of the ZBRK1 gene in human breast carcinomas*. J Pathol, 2004. **202**(2): p. 224-32.
130. Garcia, V., et al., *The GADD45, ZBRK1 and BRCA1 pathway: quantitative analysis of mRNA expression in colon carcinomas*. J Pathol, 2005. **206**(1): p. 92-9.
131. Lin, L.F., et al., *ZBRK1 acts as a metastatic suppressor by directly regulating MMP9 in cervical cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 192-201.
132. de Kok, J.B., et al., *Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes*. Lab Invest, 2005. **85**(1): p. 154-9.
133. Carlessi, L., et al., *DNA-damage response, survival and differentiation in vitro of a human neural stem cell line in relation to ATM expression*. Cell Death Differ, 2009. **16**(6): p. 795-806.
134. Giuliano, P., et al., *DNA damage induced by polyglutamine-expanded proteins*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(18): p. 2301-9.
135. Illuzzi, J., et al., *DNA breakage and induction of DNA damage response proteins precede the appearance of visible mutant huntingtin aggregates*. J Neurosci Res, 2009. **87**(3): p. 733-47.
136. Bellefroid, E.J., et al., *The human genome contains hundreds of genes coding for finger proteins of the Kruppel type*. DNA, 1989. **8**(6): p. 377-87.
137. Urrutia, R., *KRAB-containing zinc-finger repressor proteins*. Genome Biol, 2003. **4**(10): p. 231.
138. Tadepally, H.D., G. Burger, and M. Aubry, *Evolution of C2H2-zinc finger genes and subfamilies in mammals: species-specific duplication and loss of clusters, genes and effector domains*. BMC Evol Biol, 2008. **8**: p. 176.
139. Tan, W., S. Kim, and T.G. Boyer, *Tetrameric oligomerization mediates transcriptional repression by the BRCA1-dependent Kruppel-associated box-zinc finger protein ZBRK1*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55153-60.

140. Ng, H., S.M. Pulst, and D.P. Huynh, *Ataxin-2 mediated cell death is dependent on domains downstream of the polyQ repeat*. Exp Neurol, 2007. **208**(2): p. 207-15.
141. Shen, T.H., et al., *The mechanisms of PML-nuclear body formation*. Mol Cell, 2006. **24**(3): p. 331-9.
142. Skinner, P.J., et al., *Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures*. Nature, 1997. **389**(6654): p. 971-4.
143. Takahashi, J., et al., *Two populations of neuronal intranuclear inclusions in SCA7 differ in size and promyelocytic leukaemia protein content*. Brain, 2002. **125**(Pt 7): p. 1534-43.
144. Kegel, K.B., et al., *Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7466-76.
145. Frietze, S., et al., *Genomic targets of the KRAB and SCAN domain-containing zinc finger protein 263*. J Biol Chem, 2010. **285**(2): p. 1393-403.
146. Ahmed, K.M., C.Y. Tsai, and W.H. Lee, *Derepression of HMGA2 via removal of ZBRK1/BRCA1/CtIP complex enhances mammary tumorigenesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(7): p. 4464-71.
147. Furuta, S., et al., *Removal of BRCA1/CtIP/ZBRK1 repressor complex on ANGI promoter leads to accelerated mammary tumor growth contributed by prominent vasculature*. Cancer Cell, 2006. **10**(1): p. 13-24.
148. Lavin, M.F. and Y. Shiloh, *The genetic defect in ataxia-telangiectasia*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 177-202.
149. Kurz, E.U., P. Douglas, and S.P. Lees-Miller, *Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53272-81.
150. de Jager, M., et al., *Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 1129-35.
151. van den Bosch, M., R.T. Bree, and N.F. Lowndes, *The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes*. EMBO Rep, 2003. **4**(9): p. 844-9.
152. Berkovich, E., R.J. Monnat, Jr., and M.B. Kastan, *Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 683-90.

153. Jackson, S.P., *DNA damage detection by DNA dependent protein kinase and related enzymes*. *Cancer Surv*, 1996. **28**: p. 261-79.
154. Yun, J. and W.H. Lee, *Degradation of transcription repressor ZBRK1 through the ubiquitin-proteasome pathway relieves repression of Gadd45a upon DNA damage*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(20): p. 7305-14.
155. Gatti, R.A., A. Tward, and P. Concannon, *Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations*. *Mol Genet Metab*, 1999. **68**(4): p. 419-23.
156. Inskip, H.M., et al., *Risk of breast cancer and other cancers in heterozygotes for ataxia-telangiectasia*. *Br J Cancer*, 1999. **79**(7-8): p. 1304-7.
157. Renwick, A., et al., *ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles*. *Nat Genet*, 2006. **38**(8): p. 873-5.
158. Thompson, D., et al., *Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(11): p. 813-22.
159. Morrell, D., E. Cromartie, and M. Swift, *Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia*. *J Natl Cancer Inst*, 1986. **77**(1): p. 89-92.
160. Fegan, C., et al., *Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease*. *Leukemia*, 1995. **9**(12): p. 2003-8.
161. Takahashi, J., et al., *PML nuclear bodies and neuronal intranuclear inclusion in polyglutamine diseases*. *Neurobiol Dis*, 2003. **13**(3): p. 230-7.
162. Elkon, R., et al., *Dissection of a DNA-damage-induced transcriptional network using a combination of microarrays, RNA interference and computational promoter analysis*. *Genome Biol*, 2005. **6**(5): p. R43.
163. Li, J., et al., *Cytoplasmic ATM in neurons modulates synaptic function*. *Curr Biol*, 2009. **19**(24): p. 2091-6.
164. Nonis, D., et al., *Ataxin-2 associates with the endocytosis complex and affects EGF receptor trafficking*. *Cell Signal*, 2008. **20**(10): p. 1725-39.

8. Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AD	Aktivierungsdomäne
ADH	Alkoholdehydrogenase
AP	Alkaline Phosphatase
AS	Aminosäuren
ATF-1	Aktivierenden- Transkriptionsfaktor-1
ATM	Ataxia telangiectasia
ATXN1	Ataxin-1
ATXN2	Ataxin-2
ATXN3	Ataxin-3
ATXN7	Ataxin-7
BDNF	brain-derived neurothrophic factor
bp	Basenpaare
BRCA1	Brustkrebs-assoziierten-Proteins 1
BSA	Rinderserumalbumin
CEB	CREB-Bindeprotein
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	C-Terminus
CTRD	C-Terminale transkriptionelle Repressor Domäne
DDX6	DEAD/H-Box RNA-Helikase 6
DEPC	Diäthylpyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DSB	Doppelstrangbrüche
E.coli	Escherichia coli

Abkürzungen

EGF	Epidermaler-Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptors
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	fötales Rinderserum
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
H2AX	Histon H2
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HD	Huntingtin
HEK	human embryonic kidney
HeLa	Henrietta Lacks
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
Hsp	Hitzeschockprotein
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Koimmunpräzipitation
LB	Luria Bertani
LSM	Laserscanningmikroskop
M	Molar
mA	Milliamper
mg	Milligramm
Min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NF-Y	nukleären Faktor Y
ng	Nanogramm
NGF	Neuronenwachstumsfaktor
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte

PABP	PolyA-Bindeprotein
PBS	Phosphat gepufferte Lösung
PC12	Pheochromocytoma
PCI	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
Pfu	Pyrococcus furiosus
PolyQ	Polyglutaminbereich
qPCR	quantitative real time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktiven Sauerstoffverbindungen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SBMA	spinobulbäre Muskelatrophie
SCA2	Spinozerebelläre Ataxie Typ 2
SCA3	Spinozerebelläre Ataxie Typ 3
SCA7	Spinozerebelläre Ataxie Typ 7
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek	Sekunden
SEM	Standardfehler des Durchschnitts
SG	Stresskörperchen
siRNA	small interfering RNA
SRF	Serum-antwortendem-Faktor
TBP	TATA-Box-bindende Protein
TBS	Tris gepufferte Lösung
TSS	Transkriptionsstart
U	Units
UPS	Ubiquitin- Proteasom-Systems
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
V _H	schwere Kette
V _L	leichte Kette

Abkürzungen

Vol	Volumen
Y2H	Yeast-two-hybrid
ZBRK1	Zink-Finger Protein 350
ZBS	ZBRK1-Bindestellen

9. Publikationen

Linda Hallen, Holger Klein, Carola Stoschek, Silke Wehrmeyer, Ute Nonhoff, Markus Ralser, Jeannine Wild, Christina Röhr, Michal-Ruth Schweiger, Kurt Zatloukal, Martin Vingron, Hans Lehrach, Zoltán Konthur and Sylvia Krobitsch.

The KRAB-containing zinc-finger transcriptional regulator ZBRK1 activates SCA2 gene transcription through direct interaction with its gene product, ataxin-2

Hum Mol Genet. 2010 Oct 26. [Epub ahead of print]

Parkhomchuk D, Borodina T, Amstislavskiy V, Banaru M, **Hallen L**, Krobitsch S, Lehrach H, Soldatov A.

Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA.

Nucleic Acids Res. 2009 Oct;37(18):e123. Epub 2009 Jul 20.

Hallen LC, Burki Y, Ebeling M, Broger C, Siegrist F, Oroszlan-Szovik K, Bohrmann B, Certa U, Foser S.

Antiproliferative activity of the human IFN-alpha-inducible protein IFI44.

J Interferon Cytokine Res. 2007 Aug;27(8):675-80.

10. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Anhang

A1. Identifizierte ZBRK1-Bindemotive im ATM-Promotor

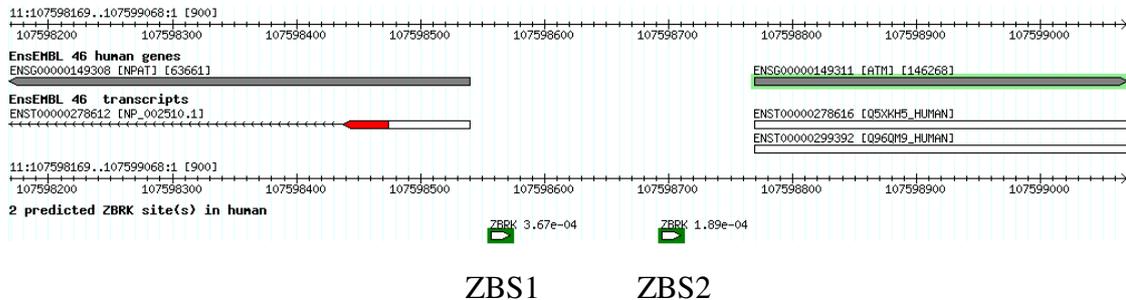


Tabelle A1: genomische Lokalisation der ZBRK1-Bindemotive

ZBRK1-Bindemotiv	genomische Region (nach Genomebrowser hg18_dna)
ZBS1	chr11:107598497-107598631
ZBS2	chr11:107598635-107598769

A2. Genomische Promotorregionen zur Herstellung der Promotorplasmide

Tabelle A2: Promotorbereiche von SCA2 und ATM

Gen	Bezeichnung	Genomische Region
SCA2	pGL3-ATXN2	chr12:110521865-110522918
SCA2	pGL3-ATXN2-Exon1	chr12:110521702-110522911
ATM	pGL3-ATM	chr11:107598478-107599132

