

**Untersuchungen zur Rolle von Fox-2 in den Spinozerebellären  
Ataxien Typ 2 und Typ 1**

**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

**Franziska Welzel**

Berlin



**Juli 2011**



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2006 bis Juli 2011

am **Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik**

unter der Leitung von **Prof. Dr. Hans Lehrach** angefertigt.

**1. Gutachter**

**Prof. Dr. Hans Lehrach**

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

Ihnestrasse 63-73, 14195 Berlin

Tel. +030 8413 1220

E-Mail: [Lehrach@molgen.mpg.de](mailto:Lehrach@molgen.mpg.de)

**2. Gutachter**

**Prof. Dr. Rupert Mutzel**

Institut für Biologie

Freie Universität Berlin

Königin-Luise-Straße 12-16, 14195 Berlin

Tel. +030 838 53116

E-Mail: [rmutzel@zedat.fu-berlin.de](mailto:rmutzel@zedat.fu-berlin.de)

**Disputation am: 26.10.2011**



### **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 29. Juli 2011

---

Franziska Welzel



*für meine Familie.....*





<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Polyglutamin-Erkrankungen</b>	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Funktion der Polyglutamin-Proteine und zelluläre Prozesse, die zur Pathogenese beitragen</b>	<b>15</b>
1.2.1	Aggregate	15
1.2.2	Transkriptionelle Deregulation	17
1.2.3	Kalziumhomöostase	19
1.2.4	Spleißen von prä-mRNA	20
<b>1.3</b>	<b>Spinozerebelläre Ataxie Typ 2</b>	<b>20</b>
<b>1.4</b>	<b>Das SCA2-Genprodukt Ataxin-2</b>	<b>22</b>
<b>1.5</b>	<b>Biologische Funktion von Ataxin-2 und seinen Homologen</b>	<b>25</b>
1.5.1	Rolle von Ataxin-2 im RNA-Metabolismus	25
1.5.2	Ataxin-2 und Membranen	28
1.5.3	Rolle von Ataxin-2 in der transkriptionellen Regulation	29
1.5.4	Rolle von Ataxin-2 in der Apoptose	29
1.5.5	Rolle von Ataxin-2 im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	30
1.5.6	Rolle von Ataxin-2 in der zellulären Kalziumhomöostase	30
<b>1.6</b>	<b>Ataxin-2-Tiermodelle</b>	<b>30</b>
<b>1.7</b>	<b>Ataxin-2 ist ein Modulator neurodegenerativer Erkrankungen</b>	<b>31</b>
<b>1.8</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Material und Geräte</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>35</b>
<b>2.3</b>	<b>Lösungen und Puffer</b>	<b>38</b>
<b>2.4</b>	<b>Protein- und DNA-Marker</b>	<b>40</b>
<b>2.5</b>	<b>Medien</b>	<b>41</b>
<b>2.6</b>	<b>Bakterien- und Hefestämme</b>	<b>42</b>
<b>2.7</b>	<b>Humane Zelllinien</b>	<b>42</b>
<b>2.8</b>	<b>Enzyme</b>	<b>43</b>
<b>2.9</b>	<b>Antikörper</b>	<b>43</b>
<b>2.10</b>	<b>siRNA-Moleküle</b>	<b>44</b>

<b>2.11 Oligonukleotide</b>	<b>45</b>
<b>2.12 Plasmide</b>	<b>46</b>
2.12.1 Yeast-Two-Hybrid-Plasmide (Y2H-Plasmide)	46
2.12.2 Säugerexpressionsvektoren	48
<b>3 Methoden</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Polymerasekettenreaktion</b>	<b>50</b>
3.1.1 Herstellung der Fox-2 Variante 1	50
3.1.2 Herstellung des Plasmids pACT4-1b-ATXN1-NT Q82	51
3.1.3 PCR zur Expressionsanalyse	51
3.1.4 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)	51
<b>3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten</b>	<b>52</b>
<b>3.3 Ligation</b>	<b>52</b>
<b>3.4 Transformation von <i>E. coli</i></b>	<b>52</b>
<b>3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i></b>	<b>53</b>
<b>3.6 Bestimmung von DNA-und RNA-Konzentrationen</b>	<b>53</b>
<b>3.7 Agarosegelelektrophorese</b>	<b>53</b>
<b>3.8 Restriktionsverdau</b>	<b>54</b>
<b>3.9 Sequenzierung</b>	<b>54</b>
<b>3.10 Transformation von <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>54</b>
<b>3.11 Yeast-Two-Hybrid (Y2H)-System</b>	<b>54</b>
<b>3.12 Lagerung von kryokonservierten Säugerzellen</b>	<b>55</b>
<b>3.13 Auftauen von kryokonservierten Zellen</b>	<b>56</b>
<b>3.14 Kultivierung von humanen Zelllinien</b>	<b>56</b>
<b>3.15 Lyse von Säugerzellen</b>	<b>56</b>
<b>3.16 Koimmunopräzipitation</b>	<b>57</b>
<b>3.17 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</b>	<b>57</b>
<b>3.18 Western-Blot</b>	<b>58</b>
<b>3.19 Transfektion von Säugerzellen</b>	<b>59</b>
3.19.1 Transfektion mit Plasmid-DNA	59
3.19.2 Transfektion mit siRNA	60

<b>3.20 Induktion von oxidativem Stress in Säugerzellen</b>	<b>60</b>
<b>3.21 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen</b>	<b>60</b>
<b>3.22 Herstellung einzelsträngiger DNA</b>	<b>61</b>
<b>3.23 Fluoreszenz-Mikroskopie</b>	<b>61</b>
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Untersuchungen zu Fox-2</b>	<b>62</b>
4.1.1 Endogene Lokalisation von Fox-2	62
4.1.2 Zelluläre Fox-2-Lokalisation unter oxidativen Stress-Bedingungen	65
4.1.3 Untersuchungen von nukleären und cytoplasmatischen Fox-2-Varianten unter Stress-Bedingungen	69
4.1.3.1 Klonierung und Expressionanalysen der Fox-2-Varianten Fox-2Cyt und Fox-2V1	69
4.1.3.2 Zelluläre Lokalisation der Fox-2-Varianten unter oxidativen Stress-Bedingungen	72
<b>4.2 Untersuchungen zur Interaktion von Fox-2 und Ataxin-2</b>	<b>75</b>
<b>4.3 Untersuchungen zum Einfluss erhöhter Ataxin-2-Konzentrationen auf Fox-2</b>	<b>78</b>
4.3.1 Einfluss einer erhöhten Ataxin-2-Konzentration auf die FOX-2-Genexpression	78
4.3.2 Einfluss einer erhöhten Ataxin-2-Konzentration auf die Fox-2-Lokalisation	79
<b>4.4 Untersuchungen zum Einfluss von Fox-2 auf die SCA2-Genexpression</b>	<b>80</b>
4.4.1 Optimierung der siRNA-vermittelten Fox-2-Reduktion	80
4.4.2 Einfluss einer reduzierten Fox-2-Konzentration auf die SCA2- Expression	82
<b>4.5 ATXN2-prä-mRNA besitzt Fox-2-Bindemotive</b>	<b>82</b>
4.5.1 Nachweis des ATXN2 $\Delta$ E18-Transkripts	83
4.5.2 Fox-2-abhängiges Spleißen der ATXN2-prä-mRNA	84
4.5.3 Untersuchungen zur Stabilität des ATXN2 $\Delta$ E18-Transkripts	86
<b>4.6 Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der Fox-2-ATXN1-Interaktion</b>	<b>88</b>
4.6.1 Untersuchungen zur Interaktion von Fox-2 und Ataxin-1	88
4.6.2 Endogene Lokalisation von Ataxin-1 in HeLa-Zellen	91
4.6.3 Fox-2 ist Bestandteil der Ataxin-1-Inklusionen	92
4.6.4 Untersuchungen zum Einfluss einer ATXN1-Überexpression auf die Aktivität von Fox-2	96
4.6.4.1 Einfluss einer Ataxin-1-Überexpression auf die FOX-2-Genexpression	96
4.6.4.2 Einfluss einer Ataxin-1-Überexpression auf die Aktivität des Spleiß-Regulators Fox-2	97
<b>5 Diskussion</b>	<b>101</b>
<b>5.1 Die Fox-Proteine</b>	<b>101</b>
<b>5.2 Zelluläre Lokalisation von Fox-2</b>	<b>102</b>
<b>5.3 Fox-2 ist eine Komponente von „Stress Granules“ und interagiert mit Ataxin-2</b>	<b>104</b>
<b>5.4 Untersuchungen zum Einfluss einer erhöhten Ataxin-2-Menge auf Fox-2</b>	<b>106</b>

<b>5.5 ATXN2-prä-mRNA besitzt Fox-2-Bindemotive</b>	<b>107</b>
5.5.1 ATXN2Δ Exon 18 wird nicht über den NMD abgebaut	110
<b>5.6 Untersuchungen zur Interaktion von Fox-2 und Ataxin-1</b>	<b>111</b>
5.6.1 Fox-2 interagiert mit Ataxin-1	111
5.6.2 Fox-2 akkumuliert in den nukleären Ataxin-1-Inklusionen	112
<b>5.7 Spleiß-Defekte in Spinozerebellären Ataxien</b>	<b>114</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>117</b>
<b>7 Summary</b>	<b>118</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>
<b>9 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>130</b>
<b>10 Lebenslauf</b>	<b>133</b> <i>Fehler! Textmarke nicht definiert.</i>
<b>11 Publikationen</b>	<b>135</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Polyglutamin-Erkrankungen

Die Polyglutamin-Erkrankungen sind vererbare neurodegenerative Erkrankungen, die viele gemeinsame Merkmale in ihrer klinischen Manifestation aufweisen und nach zehn bis zwanzig Jahren zum Tod führen. Die ersten Symptome treten typischerweise im mittleren Alter der Patienten auf und sind charakterisiert durch ein breites Spektrum an neurologischen und psychiatrischen Störungen, deren Ursache eine progressive Dysfunktion und Degeneration krankheitsspezifischer Neuronenpopulationen im zentralen Nervensystem (ZNS) ist [1-2]. Die gemeinsame genetische Grundlage der Polyglutamin-Erkrankungen ist eine intragenische Expansion des Trinukleotides CAG in den kodierenden Bereichen der krankheitsspezifischen Gene, wodurch es zu einem verlängerten Polyglutamin-Bereich in den entsprechenden Proteinen kommt. Aufgrund dieser Expansion werden die Krankheiten auch zu den Trinukleotid-Erkrankungen gezählt, zu denen ebenfalls eine Gruppe an Erkrankungen gehört, in denen die Expansion in nichtkodierenden Bereichen vorliegt. Zu dieser Familie gehören z.B. die Myotone Dystrophie und das fragile X-Syndrom [2-4].

Zur Familie der Polyglutamin-Erkrankungen werden bis *dato* neun Krankheiten gezählt, die Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA), die Dentato-rubrale Pallido-Luysische Atrophie (DRPLA), die Huntington-Erkrankung (HD) und die Spinozerebellären Ataxien (SCA) Typ 1, 2, 3, 6, 7 und 17 (Tabelle 1). Dabei handelt es sich um dominant vererbte Erkrankungen, wobei die SBMA als einzige innerhalb dieser Familie X-chromosomal rezessiv vererbt wird [5].

Wie aus Tabelle 1 deutlich wird, ist die Anzahl an CAG-Wiederholungen in den jeweiligen krankheitsverursachenden Genen in der gesunden Bevölkerung zu einem gewissen Grad polymorph. Ab einer bestimmten Anzahl von CAG-Wiederholungen kommt es zum Ausbruch der Erkrankung. Dabei gibt es jedoch eine reduzierte Penetranz bei intermediären „Repeat“-Zahlen, d.h. nicht alle Patienten zeigen klinische Symptome und erkranken [2]. Ein typisches Merkmal dieser Erkrankungen ist die Tatsache, dass die Länge der Expansion invers mit dem Beginn der Erkrankungen korreliert, d.h. je länger die Expansion, desto früher und mit einer ausgeprägteren Symptomatik beginnen diese [2]. Im Gegensatz zu den normalen Allelen weisen expandierte Allele, sowohl in somatischen als auch in Keimbahn-Zellen, eine Instabilität der CAG-Region in der Vererbung auf, so dass es zu einer veränderten Anzahl an CAG-Wiederholungen bei den Nachkommen kommen kann. Diese Instabilität wird bei expandierten Allelen interessanterweise mit einer Frequenz von fast 100% beobachtet, bei normalen Allelen hingegen ist sie sehr selten [2]. Zudem expandiert der pathogene CAG-Bereich während der Vererbung mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als das er sich verkürzt, was dazu führt, dass die betroffenen Nachkommen oft eine größere Anzahl an CAG-Wiederholungen aufweisen. Daher zeigen diese oft einen früheren Krankheitsbeginn und einen schwereren Verlauf, ein Phänomen

das als Antizipation bezeichnet wird [2]. Interessanterweise unterscheidet sich die spinocerebelläre Ataxie Typ 6 in diesem Aspekt von den anderen Polyglutamin-Erkrankungen, da es bei der SCA6 nicht zur Antizipation kommt.

**Tabelle 1: Familie der Polyglutamin-Erkrankungen [1].**

Erkrankung	Protein	Normale CAG-Anzahl	Pathogene CAG-Anzahl	betroffene ZNS-Areale
HD	Huntingtin	6-35	>36	Neostriatum, zerebraler Kortex
DRPLA	Atrophin-1	3-38	>49	Globus Pallidus, Nucleus subthalamicus, Nucleus dentatus, zerebrale und zerebelläre weiße Substanz
SBMA	Androgen-Rezeptor	6-36	>38	Spinales Vorderhorn, Nucleus nervi facialis, Nucleus nervi hypoglossus, zerebelläre Purkinje-Zellen, Hirnstamm, Rückenmark, Globus Pallidus
SCA1	Ataxin-1	6-39	>39	zerebelläre Purkinje-Zellen und Körnerzellen, Hirnstamm, Substantia Nigra, Rückenmark und Thalamus, Nucleus olivaris inferior
SCA2	Ataxin-2	14-32	>36	Nucleus dentatus, Zerebellum, Substantia Nigra, Hirnstamm, Globus Pallidus, Thalamus und Rückenmark
SCA3	Ataxin-3	12-40	>62	zerebelläre Purkinjezellen und Nucleus dentatus, Nucleus olivaris inferior
SCA6	CACNA1A	4-18	>21	zerebelläre Purkinjezellen und Nucleus dentatus, Nucleus olivaris inferior, Rückenmark, Retina, Hirnstamm
SCA7	Ataxin-7	7-18	>38	zerebraler Kortex und Zerebellum
SCA17	TBP	25-43	>45	

Die weltweit häufigsten Polyglutamin-Erkrankungen sind die Huntington-Erkrankung und die spinocerebelläre Ataxie Typ 3, wobei es generell bei allen Mitgliedern dieser Familie regional starke Schwankungen der Prävalenz einzelner Erkrankungen gibt, da hier "Founder"-Effekte innerhalb bestimmter Populationen eine Rolle spielen [6].

Die von der Degeneration betroffenen Neuronen unterscheiden sich zum Teil in den entsprechenden Erkrankungen, was zu charakteristischen Symptomen führt. In Tabelle 1 sind die von der jeweiligen Krankheit, betroffenen Hirnbereiche verzeichnet. Bei der Huntington-Erkrankung kommt es z.B. hauptsächlich zu einer Atrophie des Neostriatums, eines Bestandteils

der Basal-Ganglien des Großhirns. Die SBMA zeichnet sich insbesondere durch eine Degenerationen der Motoneuronen im Rückenmark und den bulbären Regionen aus [5]. DRPLA-Patienten zeigen hingegen einen massiven Zellverlust im zerebralen und zerebellären Kortex, im Nucleus dentatus, im Globus pallidus und im Striatum. Prävalent bei den Spinozerebellären Ataxien ist eine Atrophie des Zerebellums und hier speziell eine Degeneration der Purkinje-Zellen und des Nucleus dentatus, wobei je nach Erkrankung weitere Hirnbereiche betroffen sind [3, 7]. Eine Ausnahme stellt auch hier die SCA6 dar, die ausschließlich eine zerebelläre Erkrankung ist und damit hauptsächlich durch eine Ataxie gekennzeichnet ist [8]. Bei juvenilen Formen der Polyglutamin-Erkrankungen, die verursacht werden durch sehr lange Expansionen, kommt es interessanterweise schon früh in der Pathogenese zu einem globalen neuronalen Zellverlust und damit einhergehend zu einem Verlust der krankheitstypischen Zell-Spezifität [2, 6].

## ***1.2 Funktion der Polyglutamin-Proteine und zelluläre Prozesse, die zur Pathogenese beitragen***

Ein interessanter Aspekt dieser Familie an Erkrankungen ist die Tatsache, dass sie gemeinsame Merkmale in ihrer Pathogenese aufweisen. So führen beispielsweise, wie bereits erwähnt, stark verlängerte CAG-Expansionen zu schwereren Verläufen der Erkrankungen. Außerdem sind in allen Polyglutamin-Erkrankungen spezifische Neuronen-Populationen von der Degeneration betroffen, obwohl die entsprechenden Proteine in vielen Geweben und Zell-Typen exprimiert werden [1, 9]. Bemerkenswerterweise weisen die ursächlichen Proteine (Tabelle 1) aber, mit Ausnahme des Polyglutamin-Bereiches, keine Homologie zueinander auf [6]. Daher wurde ein gemeinsamer intrinsischer, toxischer Effekt im Zusammenhang mit der Polyglutamin-Domäne diskutiert. Für diese These spricht auch, dass Untersuchungen mit Maus-Modellen gezeigt haben, dass ein expandierter Polyglutamin-Bereich *per se* toxisch für Zellen ist [6, 10]. Die zellspezifische Toxizität wird dabei aber offenbar von der umgebenden Aminosäuresequenz und von proteinspezifischen Interaktionen vermittelt [3].

In Tabelle 1 sind die entsprechenden krankheitsverursachenden Proteine aufgelistet, von denen die zellulären Funktionen noch nicht vollständig verstanden sind. Interessanterweise scheint es aber gewisse Überschneidungen in den Prozessen zu geben, in denen diese Proteine eine Rolle spielen und die somit in der Pathogenese involviert sind [6]. Auf diese wird im Folgenden eingegangen.

### ***1.2.1 Aggregate***

Ein Hauptmerkmal der Polyglutamin-Erkrankungen ist die Akkumulierung der entsprechenden krankheitsverursachenden Proteine in nukleären bzw. cytoplasmatischen Aggregaten [1, 11-13]. Der Einfluss dieser Polyglutamin-Aggregate auf die Pathogenese der jeweiligen Erkrankungen ist bis heute noch nicht ganz geklärt, da in einigen Erkrankungen eine

Diskrepanz zwischen dem Vorhandensein dieser Aggregate und der neuronalen Degeneration besteht [14-15].

Man geht aber davon aus, dass abnorme, fehlgefaltete Proteine normalerweise mit Hilfe zellulärer Chaperone in die richtige Konformation gebracht oder über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut werden, da diese sonst dazu tendieren zu aggregieren. Steigt die Konzentration an fehlgefalteten Protein stark an oder ist der Abbau der entsprechenden Proteine eingeschränkt, so kann es zur Bildung von intrazellulären, unlöslichen Aggregaten kommen, wie es in einigen der Polyglutamin-Erkrankungen zu beobachten ist [13, 16].

Da ein Fehlen der Polyglutamin-Proteine in Tiermodellen meist nicht zu einem degenerativen Phänotyp führt, scheint somit der Funktionsverlust dieser Proteinen durch die Akkumulierung in den Aggregaten, nicht der entscheidende Faktor für die Toxizität zu sein. Dagegen ruft die Expression der expandierten bzw. eine Überexpression der nichtexpandierten Proteine oft degenerative Effekte hervor [17-25]. Aus diesem Grund nimmt man an, dass eher toxische Veränderungen der Protein-Aktivität eine Rolle in der Pathogenese spielen. Da die Polyglutamin-Aggregate zusätzlich noch andere zelluläre Komponenten wie z.B. Ubiquitin, Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Abbauweges (UPS), Caspasen, Chaperone und Transkriptionsfaktoren beinhalten, dürfte eine beeinträchtigte Funktion dieser Komponenten ebenfalls zur Pathogenese beitragen [26-35]. Aus diesem Grund wird prinzipiell angenommen, dass es durch die Ablagerung dieser ubiquitinierten missgefalteten Proteine in cytoplasmatischen und nukleären Aggregaten, zu einer gestörten Proteinhomöostase in den betroffenen Zellen kommt, welche in Folge zu einer neuronalen Dysfunktion und Apoptose führen kann. Offenbar hat das Vorhandensein der Aggregate selber aber auch einen Einfluss auf die Aktivierung von Caspasen, da ihr Vorhandensein zu einer Aktivierung der Initiatorcaspase 9 und der Effektorcaspase 3 führt, wodurch apoptotische Wege über Proteine der Bcl2-Familie aktiviert werden [9]. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass das Vorhandensein der Aggregate die zelluläre Zytotoxizität der Polyglutamin-Proteine vermitteln könnte [13]. Dafür spricht, dass Untersuchungen in Fliegenmodellen der SCA3 und der Huntington-Erkrankung zeigen, dass Polypeptide, welche die Aggregation der expandierten Proteine verhindern, deren Toxizität abschwächen [36-37]. Zudem führte die Überexpression von Hitzeschockproteinen in HD-Mausmodellen zu einer verminderten Aggregation und damit einhergehend zu einer reduzierten Toxizität [14].

Generell wird aber diskutiert, inwiefern die Aggregate *per se* toxisch für die Zellen sind, oder aber eher intermediäre oligomere Strukturen die Zytotoxizität vermitteln [13, 38-39]. In diesem Fall könnte die regulierte Aggregation einen protektiven Mechanismus der Zellen darstellen, um diese intermediären oligomeren Strukturen zu entfernen [12, 29, 39-43]. Sánchez *et al.* untersuchten in ihren Studien, inwiefern eine Störung der Oligomerisierung und damit einhergehend eine Auflösung der Aggregate einen positiven Effekt auf Polyglutamin-



exprimierende Zellen besitzt. Sie konnten dabei demonstrieren, dass eine Inhibierung der Polyglutamin-Oligomerisierung dazu führt, dass die Zellen nicht apoptotisch werden, da die entsprechenden Proteine wieder über den Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden konnten [44].

Im Kontrast dazu konnte in einem SCA1-Mausmodell von Klement *et al.* gezeigt werden, dass Ataxin-1, dem die Domäne zur Selbst-Assoziation fehlt, toxisch ist ohne Aggregate auszubilden [45]. Auch geht man inzwischen davon aus, dass eher die Translokation einiger Polyglutamin-Proteine in den Nukleus, als die Oligomerisierung und Bildung der Aggregate an sich, kritisch für die Zellen ist. Im Falle von Ataxin-1 und Huntingtin scheint eine nukleäre Lokalisation der Proteine für die Pathogenese der Erkrankungen eine wichtige Rolle einzunehmen. [39, 45]. So wurde in einem transgenen SCA1-Mausmodell demonstriert, dass expandiertes Ataxin-1, dem das nukleäre Lokalisations-Signal (NLS) fehlt, keine Purkinje-Zell-Pathologie mehr auslöste, so dass davon ausgegangen werden kann, dass hier eine nukleäre Funktion des Proteins für die Pathogenese essentiell ist [45-46]. In einem Zellkulturmodell konnte von Martindale *et al.* bestätigt werden, dass prozessierte Huntingtin-Fragmente cytoplasmatische und nukleäre Aggregate ausbilden, dabei aber vermehrt dazu tendieren im Nukleus zu lokalisieren [47]. Die Integration eines nukleären Export-Signals (NES) verhinderte diese Akkumulierung im Nukleus, so dass dort keine Aggregate mehr aufzufinden waren. Trotz weiterhin vorhandener cytoplasmatischer Aggregate führte diese verhinderte nukleäre Lokalisation zu einer verminderten Toxizität [47].

### ***1.2.2 Transkriptionelle Deregulation***

Eine weitere wichtige Rolle in der Pathogenese der Polyglutamin-Erkrankungen scheint die transkriptionelle Deregulation zu spielen [48]. Die transkriptionellen Regulatoren CBP [CREB (cAMP-response-element-binding-protein)-binding protein] und SP1 (specificity protein 1) konnten als zwei Hauptfaktoren der polyglutaminvermittelten transkriptionellen Deregulation identifiziert werden, da ihre Interaktion mit vielen Polyglutamin-Proteinen, wie z.B. dem „TATA box binding protein (TBP), Huntingtin (Htt) und Ataxin-3 (ATXN3) nachgewiesen wurde [27, 31, 33, 49-52]. Dabei spielt speziell CBP in Neuronen eine wichtige Rolle als Koaktivator der Transkription [14].

Beim „TATA-Box binding protein“ (TBP) und dem Androgen-Rezeptor (AR) handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die die Erkrankungen SCA17 und SBMA auslösen. Eine veränderte Aktivität dieser Proteine, ausgelöst durch die Expansion, führt damit zwangsläufig zu einer veränderten Genexpression. So ist die Bindungsaffinität des TBPs für DNA herabgesetzt, wenn die Polyglutamin-Domäne expandiert ist, was zu einer gestörten Initiation der Transkription und damit zu einer transkriptionellen Deregulation führt [49, 53-54]. Weiterhin weist expandiertes TBP verstärkte Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren TFIIB (general transcription factor

IIB) und SP1 auf [49, 54-55]. Konsistent mit diesen Ergebnissen wurde eine generelle transkriptionelle Deregulation in einem SCA17-Fliegenmodell beobachtet [18]. In *in vitro*-Studien konnte ebenso eine veränderte transkriptionelle Aktivität des expandierten Androgen-Rezeptors, einem nukleären Hormon-Rezeptor, nachgewiesen werden. In diesem Fall wird spekuliert, dass der expandierte Polyglutamin-Bereich die Struktur der AF1- (activation function 1) Domäne des Androgen-Rezeptors destabilisiert, wodurch bestimmte Interaktionen mit Koregulatoren des ARs unterbunden werden [56-60].

Für weitere Polyglutamin-Proteine, wie z. B. Huntingtin (Htt), Atrophin-1 (ATN1), Ataxin-2 (ATXN2), Ataxin-3 (ATXN3) und Ataxin-7 (ATXN7) sind Funktionen als transkriptionelle Koregulatoren beschrieben worden, so dass aberrante Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren und Transkriptions-Regulatoren eine Rolle in der Pathogenese der entsprechenden Erkrankungen spielen können [16]. Für das Huntingtin-Protein, einem „Scaffold“-Protein, welches vermutlich diverse zelluläre Prozesse koordiniert [61], konnten z.B. veränderte Interaktionen mit vielen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CBP, SP1 und REST/NRSF beobachtet werden [27, 32, 50, 62-63]. Diese abberanten Interaktionen resultieren in einer veränderten Genexpression [14, 64].

Atrophin-1, welches für die Ausprägung der DRPLA verantwortlich ist, besitzt eine Funktion als transkriptioneller Korepressor von nukleären Rezeptoren [65]. Im Zusammenhang mit einer transkriptionellen Deregulation konnte z.B. in einem Mausmodell der DRPLA-Erkrankung eine Hypoacetylierung von Histon H3 festgestellt werden, was zu einer Deregulation transkriptioneller Prozesse führt [53, 65]. Dabei konnte für die expandierte Form von Atrophin-1 auch eine verstärkte Interaktion mit TAF<sub>II</sub>130 (Untereinheit des Transkriptionsfaktors II) beobachtet werden, wodurch die CREB-abhängige Aktivierung der Transkription supprimiert wurde. Von Nucifora *et al.* wurde zudem demonstriert, dass expandiertes Atrophin-1 die CBP-vermittelte Transkription inhibiert [31, 65]. Auch für Ataxin-2 ist eine Beteiligung an der transkriptionellen Regulation bestätigt worden, da es als Koaktivator des ZBRK1-Proteins (Zinc finger and BRCA1-interacting protein with a KRAB domain 1) fungiert [66].

Die spinocerebelläre Ataxie Typ 3 wird durch eine Expansion des Polyglutamin-Bereiches im Ataxin-3-Protein ausgelöst. Dabei handelt es sich um ein Histon-Bindeprotein, welches mit einigen Schlüsselregulatoren der Transkription, wie z.B. CBP, p300 und PCAF (P300/CBP-associated factor) interagiert [33]. Im Einklang damit konnte in einem SCA3-Mausmodell eine gestörte Expression bestimmter Gene beobachtet werden [17]. Ataxin-7 (SCA7) ist eine Untereinheit des STAGA/TFTC-Komplexes, ein Histonacetyl-Transferase-Komplex, der beteiligt ist an der transkriptionellen Regulation [67]. Das Protein scheint innerhalb dieses Komplexes für die Rekrutierung der Histon-Acetylasen verantwortlich zu sein. Dabei führt der Einbau von expandierten Ataxin-7 in diesen Komplex offensichtlich zu einer verminderten Acetylierung von Histonen, so dass die Transkription reprimiert wird [53, 67]. Auch konnte in

einem murinen SCA7-Modell eine generelle transkriptionelle Deregulation mittels Micro-Array- und RT-PCR-Analysen nachgewiesen werden [68].

Bisherige Analysen bezüglich der zellulären Funktion von Ataxin-1, verantwortlich für die spinocerebelläre Ataxie Typ 1, weisen dem Protein ebenfalls eine Rolle in der transkriptionellen Regulation sowie dem Spleißen von prä-mRNA zu [51, 69-70]. Ataxin-1 weist Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Koregulatoren, wie z.B. LANP (leucine-rich acidic nuclear protein), PQBP1 (polyglutamine binding protein 1), SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor), HDAC3 (Histon-Deacetylase 3), BOAT (brother of ataxin-1), Capicua, Gfi-1 (growth factor independent protein 1) und SP1 auf [9, 51, 71]. Eine transkriptionelle Repression bestimmter neuronaler Gene und eine generelle Deregulation der Transkription konnte als eine der ersten pathologischen Veränderungen in murinen SCA1-Modellen von Lin *et al.* und Serra *et al.* beschrieben und teilweise auch post mortem in humanem SCA1-Gewebe validiert werden [72-73].

### **1.2.3 Kalziumhomöostase**

Ein weiteres gemeinsames Merkmal in der Pathogenese der Polyglutamin-Erkrankungen scheint eine gestörte Kalziumhomöostase zu sein. Dabei ist das Polyglutamin-Protein CACNA1A ( $\alpha_1$ a voltage-dependent calcium channel subunit) selbst eine porenformende  $\alpha_1$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalziumkanals  $Ca_v2.1$ , der im gesamten Gehirn und im Rückenmark exprimiert wird. Eine Expansion des Polyglutamin-Bereiches innerhalb dieses Kanals führt zur Ausprägung der spinocerebellären Ataxie Typ 6. Der Kanal vermittelt die Aufnahme von  $Ca^{2+}$ -Ionen in erregbaren Zellen in Folge einer Depolarisierung und reguliert dabei intrazelluläre Prozesse wie z.B. Kontraktion, Sekretion, Neurotransmission und Genexpression. Für die expandierten Varianten von Ataxin-2, Ataxin-3 und Huntingtin konnte eine Interaktion mit dem Kalziumkanal  $InsP_3R1$  (1 Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptor), welcher besonders stark in den Purkinjezellen exprimiert wird, nachgewiesen werden. Dabei führt die Interaktion mit den expandierten Proteinen zu einer verstärkten Aktivierung von  $InsP_3R1$  durch seinen Liganden [74-75]. Zusätzlich konnte in einem SCA1-Mausmodell eine verringerte Expression dieses Kalziumkanals, auch speziell in den Purkinjezellen, beobachtet werden [72]. Diese Untersuchungen sprechen dafür, dass eine gestörte kalziumabhängige Signaltransduktion in der Pathogenese dieser Polyglutamin-Erkrankungen eine Rolle spielt.

### 1.2.4 Spleißen von prä-mRNA

Defekte im alternativen Spleißen werden für eine Reihe an neurologischen Erkrankungen diskutiert. So konnten z.B. die Amyotrophe Lateral-Sklerose (ALS), die spinale Muskel-Atrophie (SMA) oder auch das Louis-Bar-Syndrom mit abberanten Spleiß-Prozessen in Verbindung gebracht werden [76]. Auch unter den Polyglutamin-Erkrankungen gibt es Hinweise, dass dieser RNA-Prozessierungsweg in der Pathogenese eine Rolle spielen könnte. In diesem Kontext ist die Interaktion von Huntingtin mit dem „Huntingtin yeast partner A“ (HYPA) von Interesse. HYPA ist eine der konstitutiven Komponenten des U1-Komplexes des „Spliceosoms“. Die Arbeiten von Jiang *et al.* zeigten eine verstärkte Interaktion von expandierten Htt mit HYPA, welche in einem verminderten prä-mRNA-Spleißen resultierte [77]. Im Falle von Ataxin-1 konnte eine polyglutaminabhängige Interaktion mit dem RNA-Bindeprotein „RNA binding motif protein 17“ (RBM17) festgestellt werden. Eine Expansion der Polyglutamin-Domäne hat dabei einen Einfluss auf diese Interaktion, so dass eine gestörte Aktivität des Spleiß-Regulators in der Erkrankung zu vermuten ist [78-80]. Zudem beinhaltet Ataxin-1 ein UHM (U2AF-homology motif)-Liganden-Motif (ULM), welches in Regulatoren des Spleißens identifiziert werden konnte [81]. Dieses Motiv vermittelt Interaktionen mit UHM-Domänen, „RNA recognition motif“- (RRM) ähnlichen Domänen, die ausschließlich in Regulatoren des Spleißens vorkommen [82]. Interessanterweise wurde festgestellt, dass Ataxin-1 über diese Domäne in der Lage ist mit dem Spleiß-Regulator U2AF65 zu interagieren, der diese UHM-Domäne besitzt [82]. Dabei hat die Überexpression von Wildtyp-Ataxin-1 einen Einfluss auf das U2AF65-vermittelte Spleißen. Dieser Effekt konnte für expandiertes Ataxin-1 nicht nachgewiesen werden [82]. Somit besteht die Möglichkeit, dass aberrantes Spleißen von prä-mRNAs einen Einfluss auf die Pathogenese der SCA1 besitzt.

### 1.3 Spinozerebelläre Ataxie Typ 2

Die Polyglutamin-Erkrankungen SCA1, 2, 3, 6, 7, 17 und die DRPLA werden auch zur Familie der Spinozerebellären Ataxien (SCA) gezählt. Die SCAs sind eine Gruppe klinisch und genetisch verschiedener neurologischer Erkrankungen, die aufgrund einer Degeneration des Zerebellums und seiner afferenten und efferenten Bahnen zu einer progressiven Ataxie führen, wobei je nach Erkrankung zusätzliche Symptome, wie z.B. Dysarthrie und Demenz, auftreten [83-85]. Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2) ist weltweit die zweithäufigste SCA, wobei die höchste Prävalenz in der Holguin-Provinz in Kuba vorliegt [6]. In Deutschland sind ca. 14% aller autosomalen dominanten SCAs eine SCA2 [86]. Im Süden Italiens, in Indien und in England beträgt der Anteil der SCA2 unter den Spinozerebellären Ataxien ca. 45% [86-88].

Die SCA2 beginnt normalerweise im Erwachsenenalter und weist in über 80% der Transmissionen eine genetische Antizipation auf [89]. Der Verlauf der Erkrankung erstreckt sich über 15-20 Jahre, wobei die Haupttodesursache bei SCA2-Patienten mit 63% die bronchiale Pneumonie, gefolgt von bronchialer Aspiration und kardiovaskulären Erkrankungen, ist [89].

Klinisch ist die SCA2 charakterisiert durch eine progressive zerebelläre Ataxie und Dysarthrie. Über 90% der Erkrankten weisen zudem verlangsamte Blicksakkaden auf. Weitere Symptome dieser Erkrankung sind eine periphere Neuropathie, Hyporeflexie, Tremor, Nystagmus, kognitive Störungen und Schlafstörungen [89-91]. Interessanterweise konnte bei geringerer Expansion (<39 CAG) des CAG-Bereiches im *SCA2*-Gen auch ein Levodopa-sensitiver Parkinson-Phänotyp beobachtet werden, bei dem der Parkinsonismus das hauptsächliche klinische Symptom darstellt, und die Patienten meist keine zerebellären Symptome aufweisen [92-93].

Die Symptome der SCA2 beruhen auf einer signifikanten Atrophie des Zerebellums, des Hirnstamms, der Frontallappen, der Substantia Nigra, der Motorneuronen im Rückenmark sowie einer Reduktion der zerebralen und zerebellären weißen Substanz. In späteren Erkrankungsstadien kommt es zusätzlich zu neuronalen Degenerationen im Thalamus und im Striatum.

Im Zerebellum sind besonders die Purkinje-Zellen von der Degeneration betroffen, wobei im weiteren Verlauf auch die Körnerzellen und die Parallelfasern reduziert sind. Im Hirnstamm sind vor allem die Neuronen des Nucleus olivaris inferior betroffen [89, 94-95]. In den degenerierenden Hirn-Arealen konnte ein Anstieg an Astrozyten und Mikroglia beobachtet werden [95]. Die spinalen Verbindungen sind, wie schon erwähnt, bei der SCA2 ebenso betroffen. So kommt es hier zu einer deutlichen Demyelinisierung bestimmter axonaler Verbindungen (z.B. der zerebellären weißen Substanz) [95].

Die zugrundeliegende Mutation im *SCA2*-Gen wurde unabhängig voneinander von drei verschiedenen Arbeitsgruppen im Jahr 1996 identifiziert [96-98]. Das *SCA2*-Gen ist auf dem Chromosom 12q23-24.1 lokalisiert [99], wobei normale *SCA2*-Allele 14-32 CAG-Wiederholungen besitzen. Im Gegensatz zu den anderen Polyglutamin-Erkrankungen ist die Anzahl an CAGs innerhalb der Population hier wenig polymorph, da in ca. 80% der Fälle eine CAG-Anzahl von 22 auftritt, gefolgt von ca. 10% mit 23 CAGs [86, 89, 100]. Zudem sind normale Allele unterbrochen von einem bis drei CAA-Codons, welche ebenfalls für Glutamin kodieren, und die zudem wichtig für die Stabilität des CAG-Bereichs zu sein scheinen [89, 97, 100]. Aufgrund der fehlenden CAA-Unterbrechungen sind expandierte Allele wahrscheinlich instabil während der Vererbung, weshalb es im Falle der SCA2 bei 89% der betroffenen Nachkommen zu einer weiteren Expansion und bei 11% zu einer Kontraktion im entsprechenden *SCA2*-Allel kommt [86, 89, 100]. Pathogene *SCA2*-Allele besitzen > 36 CAGs, wobei aber auch juvenile Fälle der SCA2 bekannt sind, in denen sehr große Expansionen (230-500 CAG) identifiziert werden konnten [101-102]. Interessanterweise gibt es eine reduzierte Penetranz bei intermediären „Repeat“-Zahlen (32-36), d.h. nicht alle Patienten zeigen klinische Symptome und erkranken [2, 89].

Die SCA2 zeigt eine hohe Variabilität, bezüglich des Krankheitsbeginns und der Schwere der Erkrankung. Dies resultiert, wie schon erwähnt, zum Teil aus der Länge des CAG-Bereiches.

Zusätzlich scheinen aber auch andere genetische Faktoren einen Einfluss auf das Erkrankungsalter zu besitzen, da die Länge des expandierten CAG-Bereiches nur ca. 66% der Variabilität bezüglich des Alters bei Krankheitsbeginn ausmacht [86, 100, 103]. In einer Studie von Pulst *et al.* wurde überprüft, inwiefern die Länge des Polyglutamin-Bereichs der anderen acht krankheitsverursachenden Polyglutamin-Proteine (Tabelle 1), innerhalb der genetisch sehr homogenen kubanischen SCA2-Population, einen Einfluss auf das Erkrankungsalter hat. Hierbei wurde festgestellt, dass lange nichtpathogene CAG-Bereiche im SCA6-Gen mit einem früheren Beginn der SCA2-Erkrankung assoziiert waren [104]. Weiterhin konnte auch ein modifizierender Einfluss des *RAI1*-Gens, ebenfalls kodierend für ein Polyglutamin-Protein, auf den Krankheitsbeginn der SCA2 identifiziert werden [105]. In einer weiteren Studie wurde eine Assoziation von früherem SCA2-Beginn und einem Polymorphismus im mitochondrialen Komplex 1 (10398G) in der kubanischen Population identifiziert [106].

Das SCA2-Gen wird in unterschiedlichsten, auch nichtneuronalen, Geweben transkribiert, wie z.B. Gehirn, Herz, Skelett-Muskel, Plazenta, Leber, Lunge, Pankreas und anderen Organen [96-98]. Bezogen auf das Gehirn konnte die Transkription des Gens in der Amygdala, dem Nucleus Caudatus, dem Putamen, dem Corpus Callosum, dem Hippocampus, dem Hypothalamus, der Substantia Nigra, dem Nucleus Subthalamus, dem Thalamus, dem Zerebellum und dem zerebellärem Kortex, der Medulla, dem Rückenmark und den Frontal- und Schläfenlappen nachgewiesen werden [96-98]. Das SCA2-Gen besitzt 25 Exons, wobei ein Haupttranskript mit einer Größe von 4,5 kb und einem offenen Leseraster von 3936 bp exprimiert wird. Zusätzlich existieren einige Spleiß-Varianten des SCA2-Transkriptes, auf die später noch näher eingegangen wird [107-108].

#### ***1.4 Das SCA2-Genprodukt Ataxin-2***

Das SCA2-Gen kodiert für das Protein Ataxin-2 (ATXN2), das ein breites Expressionsmuster in neuronalen und nichtneuronalen Geweben aufweist. Generell scheint es sich um ein cytoplasmatisches Protein zu handeln, wie immunocytochemische Untersuchungen und Zellfraktionierungen zeigten. Dabei wurde beobachtet, dass Ataxin-2 mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat assoziiert vorliegt [109-115].

Speziell im Gehirn konnte eine starke Expression von Ataxin-2 in den Neuronen des Zerebellums, der Substantia Nigra und des Trochleariskerns, einem Augenmuskelkern, beobachtet werden. Im Zerebellum weisen die Purkinje-Zellen im Vergleich zu den Neuronen des Nucleus Dentatus eine stärkere Expression von Ataxin-2 auf. Dabei scheint die Expression von Ataxin-2 im humanen Zerebellum mit dem Alter stark zuzunehmen [97, 107, 112, 116].

In den Purkinje-Zellen von neurologisch unauffälligen Patienten weist das Protein eine punktuelle, cytoplasmatische Lokalisation mit einer Aufkonzentrierung um den Nucleus herum auf. Im Gegensatz dazu erschien in den überlebenden Purkinjezellen von SCA2-Patienten die

Färbung im Cytoplasma diffuser und das Protein war zusätzlich im Nucleus nachzuweisen. Zudem weisen SCA2-Patienten eine generell erhöhte Expression des Proteins im Gehirn auf [115, 117].

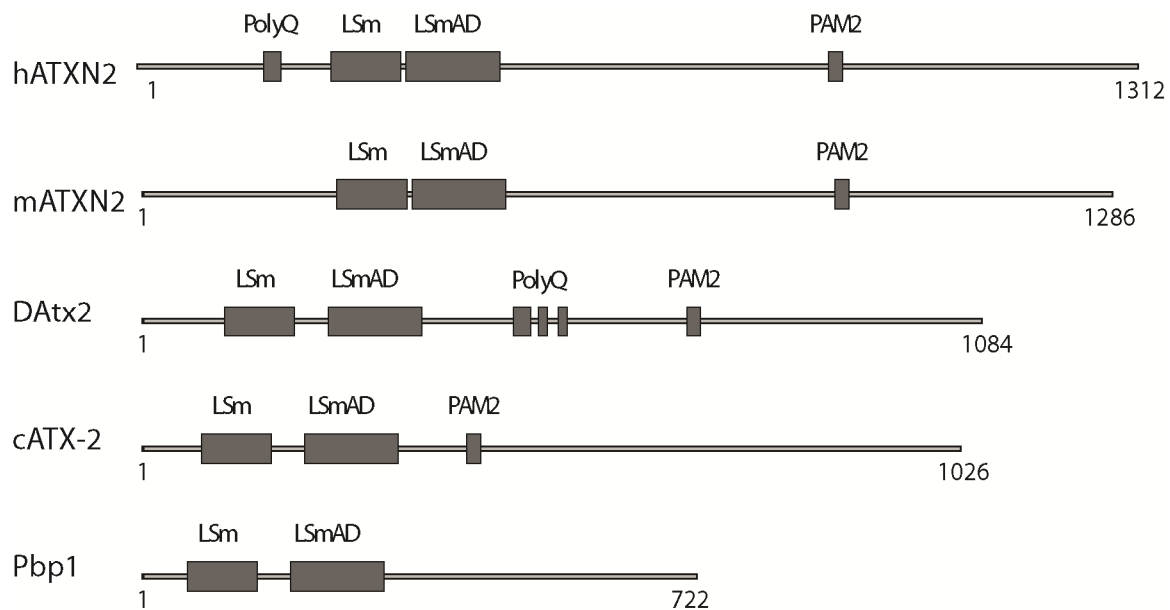
Das Haupttranskript kodiert für ein Protein bestehend aus 1312 Aminosäuren (AS), besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 140 kDa und weist eine vorwiegend cytoplasmatische zelluläre Lokalisation auf. In Abbildung 1 ist die Domänenstruktur von Ataxin-2 schematisch dargestellt. In der N-terminalen Region des Proteins befindet sich die, von Exon 1 kodierte, Polyglutamin-Domäne (AS 166-187). Aufgrund der vielen Glutamine ist das Protein stark basisch mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 10, enthält aber auch eine saure Region, die die Aminosäuren 254-475 umfasst und von den Exons 2-7 kodiert wird [96-98, 112]. Innerhalb dieser Region sind zwei globuläre konservierte Regionen lokalisiert, die Like-Sm (LSm AS 253-344) und die LSm-assozierte Domäne (LSmAD AS 352-474). Die LSm-assozierte Domäne von Ataxin-2 enthält sowohl ein putatives Clathrin-vermitteltes Trans-Golgi-Signal (YDS 413-415) als auch ein endoplasmatisches Retikulum Exit-Signal (ERD; As 425-427). In der C-terminalen Region befindet sich ein PAM2-Motiv (904-924), welches ein bekanntes Interaktionsmotiv für das Poly-(A)-Bindepotein (PABP) ist [118-119].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Ataxin-2.** N-terminal befindet sich der Polyglutamin-Bereich (AS 166-187), gefolgt von einer sauren Region (AS 254-475), die aus LSm- (AS 253-344) und der LSm-assoziierter Domäne (AS 352-475) besteht. Am C-Terminus befindet sich das PAM2-Motiv. Innerhalb der LSm-AD befinden sich die Motive YDS (AS 413-415), ERD (AS 425-427), PAM2 (AS 904-924) und eine putative Caspase-3-Schnittstelle (AS 396-399).

Wie bereits erwähnt wurden zudem weitere Spleiß-Varianten des SCA2-Transkriptes identifiziert. Dabei ist jeweils die selektive Exklusion von Exon 10, 11 bzw. 21 beschrieben worden. Die  $\Delta$  Exon 10-Isoform (Variante II) wird verstärkt im Zerebellum exprimiert und resultiert in einem Protein, dem 70 Aminosäuren in der zentralen ATXN2-Region fehlen [116]. Exon 21 der humanen ATXN2-prä-mRNA wird ebenfalls alternativ gespleißt, wobei dieses Transkript ubiquitär exprimiert wird (Isoform IV). Dem entsprechenden Protein fehlen 20 Aminosäuren in der C-terminalen Region [107]. Eine funktionelle Analyse dieser Spleiß-Varianten ist bis *dato* noch nicht durchgeführt worden. Interessanterweise konnten diese beiden alternativen ATXN2-Spleiß-Varianten auch in Mäusen identifiziert werden. Hier konnte zusätzlich dazu noch eine Variante identifiziert werden, in der zusätzlich zu Exon 10 noch Exon 11 exkludiert war [108].

Homologe von Ataxin-2 existieren in unterschiedlichsten Organismen, wie z.B. *P. troglodytes*, *C. lupus*, *B. taurus*, *M. musculus*, *R. norvegicus*, *G. gallus*, *D. rerio*, *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *D. melanogaster* (HomolGene db). Dabei wurden die Homologe von *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae* näher untersucht und sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Interessanterweise zeigen diese eine hohe Konservierung der Proteinstruktur auf. [108, 110, 119-123].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Ataxin-2-Homologe** in *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae*.

Humanes und murines Ataxin-2 besitzen zu 91% die gleiche Aminosäuresequenz. Allerdings befindet sich hier nur ein Glutamin an der Position des humanen Polyglutamin-Bereiches, wodurch es wahrscheinlich ist, dass die eigentliche Funktion des Proteins nicht über diese Domäne vermittelt wird, sondern diese eine regulative Funktion besitzt. Es wird im Herz, Nieren, Muskel, Lunge und Milz und besonders stark im Gehirn exprimiert [108].

Das Homolog der Fruchtfliege *D. melanogaster*, dATXN2, wurde im Jahre 2002 erstmals identifiziert und besteht aus 1084 Aminosäuren. Eine starke Konservierung findet sich insbesondere innerhalb der LSm/LSm-assozierten Domäne und dem PAM2-Motiv. Sequenzen außerhalb dieser Bereiche sind nicht stark konserviert. dATXN2 besitzt N-terminal keine Polyglutamin-Domäne, dafür aber drei strukturell voneinander unabhängige Polyglutamin-Bereiche (11-18Q), die C-terminal der LSm-Domäne lokalisiert sind (Abbildung 2) [122].

Das Ataxin-2-Homolog des Nematoden *C. elegans*, cATX-2 besitzt sowohl die LSm/LSmAD als auch das PAM2-Motiv, aber keine Polyglutamin-Domäne (Abbildung 2) [121, 124].



Das funktionell am besten charakterisierte Homolog von Ataxin-2 ist das *S. cerevisiae*-Homolog Pbp1 (Pab1-binding protein 1). Pbp1 besitzt wie hATXN2 eine LSm- und eine LSm-assoziierte Domäne. Im Gegensatz dazu, besitzt es aber keine Polyglutamin-Domäne und kein PAM2-Motiv [119]. Es wurde identifiziert als Suppressor des *pet*<sup>-</sup> Phänotyps im  $\Delta$ *mrs2*-Hefestamm, der dadurch gekennzeichnet ist, dass das Selbst-Spleißen von Gruppe-II-Introns in diesen Hefen stark beeinträchtigt ist [125].

## ***1.5 Biologische Funktion von Ataxin-2 und seinen Homologen***

Die genaue zelluläre Funktion von Ataxin-2 ist bis heute noch nicht gut verstanden. Es scheint aber generell eine Rolle in endozytotischen und in mRNA-Prozessen zu spielen. Zudem gibt es Hinweise, dass Ataxin-2 auch in der transkriptionellen Regulation involviert ist [66, 114, 119, 126-128].

### ***1.5.1 Rolle von Ataxin-2 im RNA-Metabolismus***

Erste Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins ergaben, dass humanes Ataxin-2 und auch sein *Drosophila*-Homolog dATXN2 mit den Polyribosomen assoziieren. Diese Studien zeigten auch, dass diese Assoziation durch das Vorhandensein eines expandierten Polyglutamin-Bereiches nicht gestört ist [110]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Ataxin-2 als RNA-bindendes Protein ein Bestandteil von mRNP-Komplexen ist und somit keine Komponente der Ribosomen *per se* [110].

Wie bereits erwähnt besitzt das Protein eine konservierte LSm- und eine LSm assoziierte Domäne. Die LSm-Domäne besteht aus den Motiven Sm1 und Sm2. Dies sind konservierte Motive, die in den sogenannten Sm-Proteinen zuerst beschrieben wurden [112, 129]. Sm-Proteine sind kleine RNA-Bindeproteine, die über das Vorhandensein dieser beiden Motive charakterisiert sind [130-131]. Zusätzlich zu den Sm-Proteinen existieren Like-Sm (LSm)- Proteine, die alle die konservierten Sm-Motive besitzen, sich aber durch das Vorhandensein anderer funktioneller Domänen auszeichnen [132]. Bekannte Sm- und LSm-Proteine spielen eine Rolle bei essentiellen RNA-Prozessierungswegen wie z.B. der RNA-Modifizierung, dem prä-mRNA-Spleißen, der Entfernung der mRNA-Kappenstruktur (decapping) und dem Abbau von mRNA, sowie bei der Translation und der replikations-abhängigen Prozessierung des 3'-Endes von Histon-mRNA [129-131, 133-134]. Sie bilden typischerweise heterogene hexa-oder heptamere Strukturen mit anderen Sm-oder LSm-Proteinen aus [133]. Einige dieser Ringstrukturen aus Sm-und LSm-Proteinen binden z.B. an einzelsträngige Regionen der snRNAs des „Spliceosoms“ und sind damit Hauptkomponenten desselben. [129, 133]. Neben den meist nukleären LSm-Proteinen gibt es auch cytoplasmatische, wie das Heptamer bestehend aus LSm1-LSm7, das z.B. eine Rolle im mRNA-Abbau nach dem „decapping“ spielt und in den „Processing-Bodies“ (P-Bodies) im Cytoplasma lokalisiert ist [133, 135]. „P-Bodies“ sind dynamische cytoplasmatische Strukturen,

in denen die mRNA über den „decapping“-Abbauweg degradiert wird oder translationell inaktiv als mRNP-Komplex vorliegt, so dass sie bei Bedarf wieder der Translationsmaschinerie zugeführt werden kann. Sie beinhalten die meisten Enzyme, die für diesen Abbau benötigt werden [135-137].

Über die LSm-Domänen werden aber auch andere Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. So assoziiert z.B. humanes Ataxin-2 über seine LSm/LSm-assoziierte Domäne mit der DEAD/H-box RNA-Helikase DDX6, einer Komponente der cytoplasmatischen „P-Bodies“. Diese Interaktion ist zudem auch zwischen den entsprechenden Hefehomologen konserviert [119, 138].

Interessanterweise scheinen erhöhte Ataxin-2-Level, wie sie in Purkinje-Zellen von SCA2-Patienten gefunden wurden, mit den „P-Body“-Strukturen zu interferieren [112, 115, 127]. In der Studie von Nonhoff *et al.* konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine erhöhte zelluläre Konzentration an Ataxin-2 einerseits einen Einfluss auf die „P-Body“-Lokalisation von DDX6 hat, andererseits die Zahl der „P-Bodies“ *per se* unter diesen Bedingungen reduziert ist, so dass Ataxin-2 möglicherweise an der Transition von mRNPs aus den „P-Bodies“ beteiligt ist [127].

„P-Bodies“ stehen im Austausch und im transienten Kontakt mit den sogenannten „Stress Granules“ (SG), dynamischen cytoplasmatischen Strukturen, die sich unter Stress-Bedingungen, wie z.B. Hitzestress, osmotischen und oxidativen Stress, bilden. „Stress Granules“ bestehen aus translationsinaktiven mRNAs, verschiedenen Proteinen, die für die Stabilität der mRNA eine Rolle spielen, Elongations-Initiationsfaktoren, ribosomalen Untereinheiten und RNA-Bindeproteinen, wie z.B. PABP (Poly-(A)-Binde-Protein), TIA-1 (T-cell-restricted intracellular antigen-1) und TIAR (TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1), für die zum Teil gezeigt werden konnte, dass sie für die Bildung dieser Strukturen essentiell sind [139-142]. Unter Stress-Bedingungen, wenn die Translationsinitiation stark inhibiert ist, kommt es zu einer Anlagerung von TIA-1 und TIAR an den Translations-Initiationskomplex, wodurch die Bildung der Polysomen inhibiert ist, diese sich auflösen und „Stress Granules“ entstehen [135, 143]. Sie dienen der Speicherung translationell inaktiver mRNA, wobei mRNAs, die für Hitzeschockfaktoren kodieren, selektiv ausgeschlossen werden [144]. Interessanterweise konnte sowohl für humanes Ataxin-2 als auch für sein Hefe-Homolog Pbp1 gezeigt werden, dass beide Proteine unter Stress-Bedingungen in die entstehenden „Stress Granules“ rekrutiert werden und außerdem für deren Bildung essentiell sind [119, 127, 145-147]. Diese Untersuchungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass Ataxin-2 auch an der Transition von mRNAs der „Stress Granules“ beteiligt ist [127].

Als einer der ersten Interaktionspartner von Ataxin-2 wurde das Poly-(A)-Binde-Protein (PABP) identifiziert, das eine weitere essentielle Komponente der „Stress Granules“ ist. Die Interaktion mit PABP erfolgt dabei über das C-terminale Poly-(A)-Bindeprotein (PABP)-Interaktionsmotiv (PAM2) [148]. PABP assoziiert mit der Poly-(A)-Sequenz von mRNAs und ist

zudem, zusammen mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor 4, an der Translations-Initiation beteiligt, indem beide Proteine die kleine ribosomale Untereinheit an die mRNA rekrutieren [149].

Interessanterweise ist diese Interaktion zwischen PABP und Ataxin-2 innerhalb der Homologe von Ataxin-2 stark konserviert, so dass selbst das Hefehomolog Pbp1, welches dieses spezifische PAM2-Interaktionsmotiv nicht besitzt, mit dem Poly-(A)-Bindeprotein der Hefe Pab1 interagiert [110, 118-120, 123]. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Pbp1, die durch  $\Delta$ Pab1-vermittelte Toxizität in der Hefe supprimiert. Weiterhin konnte für humanes Ataxin-2 gezeigt werden, dass es ein dosisabhängiger Regulator seines Interaktionspartner PABP ist. Veränderte intrazelluläre Konzentrationen an ATXN2-Protein hatten in einem Zellkultur-Modell einen Einfluss auf die Menge des PABP-Proteins. Da dies aber auf Transkriptionsebene nicht zu verzeichnen war, weisen diese Untersuchungen darauf hin, dass Ataxin-2 hier einen Effekt auf die Effizienz der Translation von PABP-mRNA ausüben könnte [127].

Ähnliche Effekte konnten in *C. elegans* beobachtet werden. Hier führte ein Funktionsverlust an cATX-2 zu einer Veränderung der Menge verschiedener Proteine, ohne dass die entsprechenden Transkriptmengen verändert waren [120]. Diese Untersuchungen lassen ebenfalls eine translationelle Regulation über Ataxin-2 vermuten. Zudem konnte gezeigt werden, dass cATX-2 generell in die Regulation der Translation involviert ist, da es mit translationellen Regulatoren wie GLD-1 und MEX-3 interagiert [121]. Hier scheint der Komplex aus cATX-2 und dem PABP-Homolog PAB-1 entscheidend zu sein für die Entwicklung der Keimbahnzellen von *C. elegans*, da in der Abwesenheit von cATX-2 die Proliferation der Keimbahnzellen gestört ist und diese maskulinisiert sind. Diese Effekte stehen im Zusammenhang mit einer Rolle von cATX-2 in der GLD-1-vermittelten Regulation der Translation [120]. In einem murinen SCA2-Knock-Out-Modell wurde zudem eine reduzierte Insulin-Rezeptor-Expression (Insr) in der Leber und im Zerebellum beobachtet, obwohl die entsprechende mRNA-Menge erhöht war [21]. Diese Daten deuten ebenfalls darauf hin, dass Ataxin-2 an der Regulation der Translation beteiligt ist.

Des Weiteren gibt es erste Hinweise, dass Ataxin-2 auch in der Regulation von Spleiß-Prozessen beteiligt sein könnte, da eine Interaktion mit einem neuronalen Spleiß-Faktor, dem Ataxin-2-Bindeprotein 1 (A2BP1), identifiziert werden konnte. Dabei konnte in der Studie von Shibata *et al.* demonstriert werden, dass die C-terminale Region von Ataxin-2 mit diesem RRM-Protein interagiert. Weitere Untersuchungen ergaben, dass beide Proteine in granulären Strukturen im Cytoplasma von Purkinjezellen und in den Neuronen des Nucleus dentatus kolokalisiert sind. Interessant daran ist, dass A2BP1, im Gegensatz zu Ataxin-2, nicht ubiquitär exprimiert wird. Dieses Protein wird im Herz, in Muskeln und im Gehirn exprimiert und aberrante Interaktionen mit expandiertem Ataxin-2 könnte somit eine gewisse Zell-Spezifität der polyglutaminvermittelten Toxizität vermitteln [113].

Desweiteren konnte kürzlich eine direkte Interaktion von Ataxin-2 mit TDP-43 (TAR DNA binding protein) nachgewiesen werden, einem nukleären RNA-Bindeprotein, welches ebenfalls in der Regulation des prä-mRNA-Spleißens involviert ist [150].

Auch für das Hefehomolog Pbp1 konnte eine Rolle, neben der Regulation der Translation, in weiteren RNA-Prozessen identifiziert werden. Zum Einen verdeutlicht ein großes Interaktionsnetzwerkes dieses Proteins, dass seine Interaktionspartner in Prozessen wie dem „RNA-editing“, dem Spleißen von prä-mRNA und dem Export von mRNA aus dem Kern eine Rolle spielen [119], zum Anderen konnte gezeigt werden, dass Pbp1 mit den Proteinen Fir1 und Ref2 interagiert, die an der 3`-Prozessierung von mRNA beteiligt sind. Im Komplex mit diesen beiden Proteinen reguliert Pbp1 die korrekte Polyadenylierung von mRNA. Pbp1-defiziente Hefen weisen somit keine vollständig polyadenylierten mRNAs auf. [151].

### ***1.5.2 Ataxin-2 und Membranen***

Neben der Rolle in RNA-Prozessen wird vermutet, dass Ataxin-2 eine Rolle in der Vesikel-Endozytose spielt, da es mit Komponenten der Endozytose, wie z.B. den Endophilinen A1 und A3, c-Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma), CIN85 (Cbl-interacting protein) und Src interagiert [126, 128]. Innerhalb der Arbeit von Ralser *et al.* wurde die Interaktion von humanem Ataxin-2 mit den Endophilinen A1 und A3 gezeigt, welche an der clathrin-vermittelten Endozytose und hierbei speziell an der Ausstülpung der Zellmembran beteiligt sind [152]. Die Interaktion von Ataxin-2 und Endophilin-A3 ist dabei nicht abhängig von der Länge des Polyglutamin-Bereiches [128, 153]. Beide Proteine kolokalisieren am endoplasmatischem Retikulum und der Plasmamembran, wobei für Endophilin-A3 ebenfalls eine Kolokalisation mit Aktin-Filamenten beschrieben worden ist [114, 126].

Für dATXN2 wurde eine mögliche Assoziation mit den Aktin-Filamenten bereits untersucht und dabei festgestellt, dass es nicht mit diesen Strukturen assoziiert vorliegt. In dieser Hinsicht ist es interessant, dass die Überexpression von dATXN2 in der Fruchtfliege in Defekten bei der Aktin-Filamentbildung resultiert. Zudem führt eine Verringerung der dATXN2-Aktivität in späteren Entwicklungsstadien von *Drosophila* zu weiblicher Sterilität und einer Degeneration von Geweben, wie z.B. einer abnormen Morphologie der Sinnesbürsten. Auch diese Effekte werden auf eine gestörte Regulation der Cytoskelett-Bildung zurückgeführt [122]. Daher geht man davon aus, dass veränderte Mengen an dATXN2 dosisabhängig die Formierung der Aktin-Filamente beeinflussen [122]. Da es dabei aber, wie bereits erwähnt, zu keiner direkten Assoziation mit den Aktinfilamenten kommt, wurde vermutet, dass dATXN2 die Translation, die Stabilität oder die Lokalisation von Transkripten kontrolliert, die an der Bildung von Aktin-Filamenten beteiligt sind.

Unter dem Gesichtspunkt ist es sehr interessant, dass die Expression von humanem Ataxin-2 und den Endophilin-Proteinen toxisch ist für Hefen, denen Fimbrin fehlt [128]. Fimbrin

ist an der Aktin-Filament-Organisation und an endozytotischen Prozessen beteiligt ist und besitzt humane Orthologe, die Proteine T- und L-Plastin. T-Plastin besitzt Aktin-bindende Eigenschaften, stabilisiert Aktin-Filament-Strukturen und ist an der Aktinfilamentbildung beteiligt. Dabei konnte bemerkenswerterweise in Säugerzellen festgestellt werden, dass die Überexpression von Ataxin-2 zu einer cytoplasmatischen Akkumulierung von T-Plastin führt [128].

Auch konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Ataxin-2 die endozytotische Internalisierung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) verlangsamt [126].

### ***1.5.3 Rolle von Ataxin-2 in der transkriptionellen Regulation***

Neben seiner vermuteten Rolle im mRNA-Metabolismus zeigten die Untersuchungen von Hallen *et al.* eine Beteiligung von Ataxin-2 in der transkriptionellen Regulation. Dabei fungiert ein Komplex aus Ataxin-2 und ZBRK1, einem bekannten transkriptionellen Regulator, als transkriptioneller Aktivator der Genexpression. Interessanterweise besitzt das *SCA2*-Gen selbst in seiner Promotorregion Bindemotive für das ZBRK1-Protein und wird von einem Komplex aus ZBRK1 und Ataxin-2 aktiviert. Innerhalb dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass, neben seiner hauptsächlich cytoplasmatischen Lokalisation, Ataxin-2 auch im Nukleus von Zellen vorkommt. Eine Überexpression von ZBRK1 verstärkte diese nukleäre Lokalisation wesentlich [66, 154].

### ***1.5.4 Rolle von Ataxin-2 in der Apoptose***

Ein interessanter Aspekt ist es, dass Ataxin-2 möglicherweise eine Rolle in der Krebsentstehung spielt, da es in apoptotische Prozesse eingreift. In der Studie von Huynh *et al.* konnte ein dosisabhängiger Effekt der ATXN2-Konzentration bezüglich der Apoptoserate beobachtet werden [111]. Hier wurde in COS1- und PC12-Zellen gezeigt, dass die Überexpression von Ataxin-2 in einer erhöhten Apoptoserate resultierte, wobei dieser Effekt durch eine Expansion des Polyglutamin-Bereiches noch verstärkt wurde und Caspase-3 abhängig war [111]. In Zellkulturstudien mit Neuroblastomazellen stellte sich zudem heraus, dass die Expression von Wildtyp-Ataxin-2, aber nicht von pathogenem, proapoptotisch wirkt. Dieser Effekt ist ebenfalls Caspase-abhängig [155]. In diesem Zusammenhang wurde erstaunlicherweise festgestellt, dass die Expression von Ataxin-2 in kindlichen Neuroblastoma-Tumoren erhöht ist. Bemerkenswerterweise sind diese Tumoren gut zu behandeln und bilden sich in ca. 10% der Fälle, aufgrund verspäteter Apoptose, von selbst zurück. Dabei zeigte sich auch, dass in Neuroblastoma-Tumoren mit einer MYC-N-Amplifizierung eine reduzierte Menge an Ataxin-2 nachzuweisen war. Im Einklang damit weisen diese Tumoren eine wesentlich schlechtere Prognose auf [155]. Zudem konnte gezeigt werden, dass *SCA2*-Genprodukte auch in Darm-Krebs-Biopsien reduziert waren [66].

### 1.5.5 Rolle von Ataxin-2 im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Eine veränderte Funktion des UPS wurde generell mit der Pathogenese der Polyglutamin-Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [14].

Für Ataxin-2 konnte eine Interaktion des N-Terminus mit Parkin, einer Ubiquitin-E3-Ligase, involviert in der Parkinson-Erkrankung, identifiziert werden. Parkin ubiquitiniert spezifische Proteine, die den zellulären ubiquitin-abhängigen Proteasom-Abbauweg zugeführt werden sollen. Die Interaktion von Ataxin-2 und Parkin wird nicht von der Länge des Polyglutamin-Bereiches beeinflusst und führt zu einer Ubiquitinierung von Ataxin-2 [156-157]. Im Zuge einiger Untersuchungen wurde festgestellt, dass in Parkin-defizienten Mäusen die Menge an Ataxin-2 erhöht war, so dass anzunehmen ist, dass Parkin am normalen Abbau des ATXN2-Proteins beteiligt ist. Konsistent mit dieser Vermutung konnte die bekannte neuroprotektive Überexpression von Parkin, den neurotoxischen Phänotyp von expandiertem Ataxin-2 verhindern [95, 158].

### 1.5.6 Rolle von Ataxin-2 in der zellulären Kalziumhomöostase

Wie schon erwähnt konnten längere, nichtpathogene CAG-Wiederholungen im *CACNA1A*-Gen, kodierend für eine Untereinheit des Kalziumkanals  $Ca_v2.1$ , mit einem früheren Krankheitsausbruch der SCA2 korreliert werden. Ein Fehlen des Rezeptors oder eine Polyglutamin-Expansion in dieser Untereinheit führt ebenfalls zu neurologischen Phänotypen [104]. Zusätzlich konnte in der Arbeit von Liu *et al.* gezeigt werden, dass expandiertes Ataxin-2, im Gegensatz zum normalen Ataxin-2, mit dem Typ 1 Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptor ( $InsP_3R1$ ), einem intrazellulärem Kalziumkanal, assoziiert ist. Dieser Kalziumkanal wird stark in zerebellären Purkinje-Zellen exprimiert. Dabei wurde festgestellt, dass diese Interaktion zu einer verstärkten Sensitivität des Rezeptors gegenüber seinem Liganden  $InsP_3$  führt [159].

## 1.6 Ataxin-2-Tiermodelle

Um einen Einblick in die normale zelluläre Funktion eines Proteins zu erhalten, eignen sich „Knock-Out“-Modelle. Dabei wurde für das Protein Ataxin-2 beobachtet, dass es offenbar eine Rolle in der embryonalen Entwicklung spielt, da ein kompletter Verlust in *C. elegans* und *D. melanogaster* embryonal lethal ist und auch SCA2-defiziente Mäuse Probleme mit der Fertilität aufweisen. Bei diesen Mäusen ist die Nachkommenschaft, im Vergleich zum Wildtyp, reduziert [20-21, 122, 124]. *Sca2*<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen eine progressive Adipositas und eine Fettleber auf. Dieser Effekt beruht dabei nicht auf lokomotorischen Einschränkungen der *Sca2*<sup>-/-</sup>-Mäuse, da diese, im Vergleich zu normalen Mäusen, eher hyperaktiv zu sein scheinen [21]. Ein Funktionsverlust von Ataxin-2 in der Maus führt interessanterweise nicht zu degenerativen Phänotypen [20-21]. Da das Fehlen des Proteins in Maus-Modellen offenbar keinen degenerativen Effekt auf Neuronen ausübt, geht man davon aus, dass eine toxische Veränderung der zellulären

Funktion von expandiertem Ataxin-2 für die SCA2-Pathogenese verantwortlich ist. Dabei scheint neben der Expansion aber offensichtlich auch die Proteinmenge eine Rolle zu spielen, da die selektive Überexpression von Wildtyp-dATXN2 im Auge von Fliegen bemerkenswerterweise zu einem degenerativen Phänotyp führt, wobei es zu einer milden Desorganisation und einer Reduktion des retinalen Querschnitts kommt [19]. Interessanterweise konnten Al-Ramahi *et al.* zeigen, dass dieser degenerative Phänotyp durch eine nukleäre Lokalisation von dATXN2 verstärkt wird.

Um zudem einen Einblick in die Pathogenese der SCA2-Erkrankung zu erhalten, wurden verschiedene SCA2-Mausmodelle generiert. Momentan existieren zwei genetische Mausmodelle der SCA2-Erkrankung, in denen das humane SCA2-Gen mit expandiertem CAG-Bereich integriert wurde. Huynh *et al.* generierten eine transgene Maus, die das offene Leseraster des humanen SCA2-Gens, entweder mit 22 oder mit 58 CAGs, unter der Kontrolle des Purkinjenzell-spezifischen Regulationselementes Pcp2 exprimieren. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Expression des expandierten Transgens zu einem progressiven Verlust an Purkinjenzellen und damit einhergehend zu einer progressiven Störung der motorischen Funktionen führte. Konsistent mit den fehlenden Aggregaten in Neuronen von SCA2-Patienten, konnten auch hier keine ubiquitin-positiven Aggregate in den murinen Neuronen gefunden werden [109]. Von Aguiar *et al.* wurde eine transgene Maus generiert, die die humane SCA2-cDNA mit 75 CAGs unter der Kontrolle des humanen SCA2-Promotors exprimiert. Auch diese Maus zeigte nach 20 Wochen eine signifikante Störung der motorischen Funktionen verursacht durch einen Verlust an Purkinjenzellen. [160]. In beiden Mausmodellen konnte somit eine spezifische Degeneration von zerebellären Purkinjenzellen nachgewiesen werden.

### ***1.7 Ataxin-2 ist ein Modulator neurodegenerativer Erkrankungen***

Bemerkenswerterweise besitzt Ataxin-2 einen modulierenden Einfluss auf die Pathogenese weiterer neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), der SCA1 und der SCA3.

So konnte z.B. eine Assoziation zwischen intermediären Längen des Ataxin-2-Polyglutamin-Bereiches (27-33) und der Ausprägung einer ALS hergestellt werden. Dabei stellen intermediäre Polyglutamine-Bereiche im Ataxin-2-Protein ein genetisches Risiko für die Ausprägung einer ALS dar [161]. Bei der ALS handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die nicht zur Familie der Polyglutamin-Erkrankungen gehört. Die molekulare Grundlage dieser Erkrankung ist nicht in allen Fällen bekannt. Es konnte aber inzwischen nachgewiesen werden, dass TDP-43 ein Regulator der Transkription und des Spleißens, eines der Hauptkomponenten in den cytoplasmatischen Inklusionen in Neuronen von ALS-Patienten ist und Mutationen innerhalb dieses Proteins zur Ausprägung einiger ALS-Formen führt [162]. In einem ALS-Fliegenmodell, ausgelöst durch eine ALS-typische Mutation im TDP-43, führt die

Überexpression bzw. Reduktion von dATXN2 zudem zu einer vermehrten bzw. verminderten Degeneration [161].

Auch ist Ataxin-2 ein als Modulator der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 identifiziert worden. In der Arbeit von Lessing *et al.* konnte hier ein modulierender Effekt von dATXN2 auf die Toxizität von expandiertem dATXN3 und auch Htt Exon 1 nachgewiesen werden [163]. Zudem wurde in diesem SCA3-Drosophila-Modell gezeigt, dass die Überexpression von dATXN2 einen steigernden Effekt auf die Formierung der ATXN3-positiven nukleären Aggregate besitzt. Dabei war Ataxin-2 in diesen nukleären Aggregaten nachzuweisen und dies konnte auch in den Aggregaten von SCA3-Patienten bestätigt werden [163-164]. Interessant ist es, dass für beide Effekte im SCA3-Fliegenmodell das Vorhandensein des PAM2-Motivs im C-Terminus von Ataxin-2 essentiell war, da eine Deletion dieses Motivs diese Effekte verhinderte. Zudem scheint auch die Länge des Polyglutamin-Bereiches im SCA2-Gen einen Einfluss auf die Schwere der Faszikulationen von SCA3-Patienten zu besitzen [165].

Ein weiterer Aspekt ist der modulierende Effekt von Ataxin-2 auf die Pathogenese der Spinozerebellären Ataxie Typ1. Dabei führt eine Reduktion bzw. Überexpression von Ataxin-2 zu einer verminderten bzw. vermehrten Toxizität des expandierten SCA1-Allels in einem *Drosophila*-Modell der Erkrankung. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dATXN2 in die nukleären dATXN1-Inklusionen rekrutiert wurde. Dieser Befund konnte auch post mortem in Neuronen von SCA1-Patienten bestätigt werden [19].

Damit lassen diese Beobachtungen vermuten, dass nukleäres Ataxin-2 eine potenzierende Wirkung auf die Toxizität von expandiertem TDP43, Ataxin-1, Ataxin-3 und Htt Exon 1 hat [19, 163]. Ein interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass Ataxin-2 mit TDP-43 und Ataxin-1 eine direkte Interaktion aufweist [19, 161, 166]. Daher kann man vermuten, dass diese Proteine in einem funktionellen Zusammenhang zu stehen. Dafür sprechen auch die Untersuchungen von Lim *et al.* Innerhalb dieser Studie wurde eine Hochdurchsatzanalyse mit 54 Proteinen, die in 23 vererbten dominanten Ataxien eine Rolle spielen, durchgeführt und ein Interaktionsnetzwerk erstellt. Innerhalb dieses Netzwerkes konnte interessanterweise ein Hauptknotenpunkt identifiziert werden, indem viele ataxieauslösende Proteine entweder direkt miteinander interagieren oder über gemeinsame Interaktionspartner miteinander verbunden sind. Auffällig ist, dass viele der Interaktionspartner, wie z.B. A2BP1, RBM9 und RBPMS in RNA-Prozessen eine Rolle spielen und somit diese Wege einen Einfluss auf die Pathogenese der entsprechenden Erkrankungen spielen könnten [166].



## 1.8 Zielsetzung

Die Funktion des Polyglutamin-Proteins Ataxin-2, ursächlich für die spinocerebelläre Ataxie Typ 2, ist bisher noch nicht gut verstanden. Einige Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Protein in der Endozytose und im zellulären mRNA-Metabolismus eine Rolle spielt [119, 127-128]. Einer der ersten Interaktionspartner die Ataxin-2 mit dem zellulären RNA-Metabolismus in Zusammenhang brachten, war das Ataxin-2-Bindeprotein 1 (A2BP1; Fox-1) [113]. Dieses Protein gehört zur Familie der Fox-Proteine, zu der bisher drei Proteine, A2BP1 (Fox-1), „RNA binding motif protein 9“ (RBM9, Fox-2) und NeuN (Fox-3) gezählt werden.

Die Fox-Proteine sind gewebsspezifische Regulatoren des alternativen Spleißens, wobei sie besonders in der Regulation neuronenspezifischer Spleiß-Ereignisse eine Rolle zu spielen scheinen [167]. Interessanterweise ergaben Interaktionsstudien innerhalb der Arbeitsgruppe erste Hinweise, dass Fox-2 (RBM9), wie sein Paralog Fox-1 (A2BP1), möglicherweise ebenfalls mit Ataxin-2 interagiert. Dieser Aspekt sollte in der vorliegenden Arbeit mittels Yeast-Two-Hybrid- und Koimmunopräzipitations-Analysen näher untersucht werden. Da die zelluläre Lokalisation von Fox-2 bis *dato* noch nicht gut untersucht wurde, wurde diese in einem ersten Schritt mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie näher analysiert. Des Weiteren sollte mittels Überexpressions- und RNA-Interferenz-Studien untersucht werden, inwiefern die Interaktion zwischen Fox-2 und Ataxin-2 für die SCA2-Pathogenese relevant ist.

In diesem Zusammenhang war es sehr interessant, dass in einer genomweiten Analyse zur Identifizierung potentieller Fox-Zielgene das *SCA2*-Gen identifiziert werden konnte [168]. Daher sollte mittels RNA-Interferenz-Analysen ebenfalls untersucht werden, ob neben der putativen Fox-2/ATXN2-Protein-Interaktion die ATXN2-prä-mRNA ein Ziel Fox-2-spezifischen Spleißens sein könnte.

Abschließend lag ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf der Charakterisierung der Interaktion von Fox-2 und Ataxin-1, welche von Lim *et al.* in einer Hochdurchsatz-Analyse identifiziert werden konnte [166]. Dies war von Interesse, da Ataxin-2 direkt mit Ataxin-1 interagiert und zudem einen modifizierenden Effekt in der SCA1-Pathogenese aufweist [19, 166]. Aus diesem Grund sollte diese Interaktion zwischen Fox-2 und Ataxin-1 validiert und näher charakterisiert werden. Da bekannt ist, dass Ataxin-1 mit einigen Spleiß-Faktoren interagiert und diese in die nukleären ATXN1-Inklusionen rekrutiert werden [69, 82], sollte ebenfalls der Einfluss einer ATXN1-Überexpression auf die endogene Fox-2-Lokalisation und Aktivität untersucht werden.

Diese Einblicke in das biologische Zusammenspiel der Interaktion von Fox-2 und Ataxin-2 bzw. Ataxin-1 könnten daher zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen beider SCA-Erkrankungen führen und zudem den Einfluss einer möglichen Deregulation des Spleißens auf diese Erkrankungen aufzeigen.

## 2 Material

### 2.1 Material und Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien

Materialien und Geräte	Firma
384-Kammer-Platte für qPCR	Applied Biosystems
ABI-PRISM 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems
Agarosegelkammer und Kämme	MPI-MG Werkstatt
Analysenwaage AT 250	Mettler
Blotapparatur (semi-dry)	Peqlab
Blotapparatur (Tank-Blotter)	Hoefer
Deckgläschen (12/18mm)	Roth
Fotofilme Hyperfilm ECL	Amersham
Fotofilme Fuji Medical X-Ray Film	Fuji
Fotofilm-Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Fotokassette 2325	Fujifilm
Geldokumentationssystem AlphaImager	Alpha Innotech
Gelkammer und Einsätze und Kämme; Protean 2 (SDS-Gele)	Bio-Rad
Heizblock	Eppendorf
Immersionsöl	Zeiss
Klebefolien Microamp für qPCR	Applied Biosystems
Kryoröhrchen	Nalgene
LSM510 Meta Mikroskop	Zeiss
LSM 700 Mikroskop	Zeiss
Magnetrührer	IKA-Combimag-Reo
Magnetständer DynaMag	Dynal
Membranvakuumpumpe	Vacuubrand
Membran für Y2H-Analysen	msi (MICRON SEPARATIONS INC.)
Nano Drop ND-1000 UV-Spektrometer	Nano Drop Technologies
Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad
Nitrozellulosemembran Protran	PerkinElmer
Nitrozellulosemembran Hybond, ECL	GE
(Immobilion-P) Transfer Membran (PVDF)	Millipore
Objektträger	Roth
Parafilm	American National Can Company

Materialien und Geräte	Firma
Pasteurpipetten	Brand
PCR-Maschinen PTC-100, PTC-225	MJ-Research
PCR-Maschine vapo.protect	Eppendorf
Petrischalen	Greiner
Photometer Ultraspec 3000	Amersham
Pipetten	Eppendorf
Präzisionswaage PM3000	Mettler
Rotationsmischgerät	Heidolph
Schüttelinkubatoren Innova44, 4330	New Brunswick Scientific
Skalpelle	Brand
Sterile Glaskugeln	MPI-MG Werkstatt
Sterile Pipetten (10ml; 25ml)	Sarstedt
Sterile Impfösen	Nunc
Tiefkühler -20°C	Bosch
Tiefkühler -80°C	Forma Scientific
Tischzentrifugen 5224, 5810R, 5417c	Eppendorf
UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab
Vortexer Vortex-Genie	Bender und Hobein AG
Wasserbad	Memmert
Wipptisch Rocky RT-1s	Fröbel Labortechnik
Whatman Filterpapier 3mm	Whatman
Zellkulturflaschen (T75)	Sarstedt
Zellkulturinkubatoren	Brunswick
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter

## 2.2 Chemikalien

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid/ Bisacrylamid Rotiphorese	Roth
Adenin	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> (Cl) <sub>2</sub> )	Merck
Ammoniumsulfat	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampizillin	Sigma-Aldrich

Substanz	Hersteller
Bakto-Agar	Becton, Dickson and company
Bakto-Pepton	Becton, Dickson and company
Bakto-Trypton	Becton, Dickson and company
Benzonase	Merck
Betain	Fluka
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bradford Protein Assay	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
CN/DAB Substrate Kit	Thermo Scientific
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
DEPC-behandeltes Wasser	Ambion
Dikaliumphosphat ( $K_2PO_4$ )	Merck
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
dNTPs	Pharmacia
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Entwickler und Fixiererlösung für Fotofilme	Agfa
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fluoromount G	Southern Biotech
Fötale Kälberserum (FBS)	Biochrom
D-Glukose-Monohydrat	Merck
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
Hefe-Extrakt	Difko
Heringsperma-DNA-Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Histidin	Sigma-Aldrich
Hoechst (bisBenzimide) 33258	Sigma-Aldrich
Hyperfect-Transfektionsreagenz	Qiagen
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Kaliumacetat (KAc)	Merck

Substanz	Hersteller
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Leuzin	Sigma-Aldrich
Lipofectamine RNAiMAX Reagenz	Invitrogen
Liziumazetat-Dihydrat (LiAc)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Uelzena
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck
Methanol	Merck
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck/Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natrium-meta-Arsenit	Merck
Oligo(dT) <sub>15</sub> -Primer (0,5 µg/µl)	Promega
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PEG 3350 (Polyethylenglykol)	Sigma-Aldrich
Penizillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom
Polyethylenimid (PEI)-Transfektionsreagenz	Polysciences, Inc.
PolyFect-Transfektions Reagenz	Qiagen
Protease-Inhibitor (Complete PI Cocktail Tablets)	Roche
Protease-Inhibitor (complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail)	Roche
SYBR Green	Applied Biosystems
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Invitrogen
Tris (Trizma Base)	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Merck
Triton X-100	Merck
Trypsin	Biochrom AG
Tryptophan	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth
Urazil	Sigma-Aldrich
Western Lightning ECL	PerkinElmer
Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline	Promega

Substanz	Hersteller
Phosphatase	
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactosid)	Sigma-Aldrich
Xylenzyanoblau	Sigma-Aldrich
YNB (Yeast Nitrogen Base)	Difco

### 2.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Lösungen und Puffer	Inhalt
Blockpuffer	5 % Milchpulver 1x PBS
$\beta$ -Galaktosidase-Puffer	1x Z-Puffer 1 M X-Gal-Lösung 1 M DTT
10x Blotpuffer (Nitrozellulosemembran)	480 mM Tris 400 mM Glyzin 0,37 % SDS
1x Blotpuffer (Nitrozellulosemembran)	zusätzlich 20 % (v/v) Methanol
1x Blotpuffer (PVDF-Membran)	25 mM Tris 192 mM Glyzin
5x Concentrated Enhancer Solution (CES)	2,7 M Betain 6,7 mM DTT 6,7% (v/v) DMSO 5,5 $\mu$ g/ml BSA
Einfriermedium	900 $\mu$ l DMEM (FBS/PenStrep) 105 $\mu$ l DMSO 150 $\mu$ l FBS
10x Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris 2,5 M Glyzin 1 % SDS
Hefetransformations-Lösung 1	100 mM Lithiumacetat 1 M Sorbitol 5 mM TE-Puffer
Hefetransformations-Lösung 2	100 mM Lithiumacetat 40 % PEG 3350

Lösungen und Puffer	Inhalt
	5 mM TE-Puffer
Heringsperma-DNA	0,2% DNA-Natriumsalz 0,5 mM EDTA
6x Ladepuffer (Agarosegelelektrophorese)	4 % Glycerin 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylenzyanolblau
5x Laemmli-Puffer	250 mM Tris (pH 6,8) 10 % SDS 0,5 % Bromphenolblau 50% (v/v) Glycerin 10 % DTT
10x PBS pH 7,4	1,37 M NaCl 27 mM KCl 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 18 mM KH <sub>2</sub> PO
Sammelgelpuffer, pH 6,8	125 mM Tris
50x TAE-Puffer	50 mM Tris 25 mM Eisessig 2,5 mM EDTA
TBS-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,6 150 mM NaCl
TE-Puffer, pH 7,5	10 mM Tris 1 mM EDTA
Trenngelpuffer, pH 8,8	375 mM Tris
X-Galaktosidase-Färbelösung	0,15% (v/v) X-Gal 10 mM DTT in Z-Puffer
Zellkulturlysepuffer 1	20 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 1 µl/10ml Benzonase 1:25 Proteaseinhibitor
Zellkulturlysepuffer A	10 mM HEPES pH 7,4 10 mM NaCl

Lösungen und Puffer	Inhalt
	3 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 1/7 complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail
Zellkulturlysepuffer B	10 mM HEPES pH 7,4 300 mM NaCl 20 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 1/7 complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail 0,2 U DNase
Zellkultureinfriermedium	900 µl DMEM-Medium(FBS/PenStrep) 150 µl FBS 105 µl DMSO
Z-Puffer, pH 7	60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O 10 mM KCl 1 mM MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O

## 2.4 Protein- und DNA-Marker

Die in Tabelle 5 angegebenen Marker wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

**Tabelle 5: Verwendete DNA- und Proteinmarker**

Marker	Firma
DNA-Marker 1kb	New England Biolabs
DNA-Marker 100bp	New England Biolabs
DNA-Marker 50bp Quick Load	Biolabs
Protein Marker Page Ruler Prestained Plus	Fermentas



## 2.5 Medien

Zur Kultivierung von Bakterien- und Hefekulturen wurden die in Tabelle 6 angegebenen Medien verwendet.

**Tabelle 6: Verwendete Bakterien- und Hefemedien**

Medium	Inhalt
Luria-Bertani-Medium (LB)*, pH 7,0	1 % Bakto-Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
LB/Ampizillin-Medium*	1 % Bakto-Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl 100 µg/ml Ampizillin
Yeast Peptone Dextrose (YPD)-Medium* pH 6,5	2 % Bakto-Trypton 1 % Hefe-Extrakt 2 % g/L Glucose
SDII-Medium*	2 % Glucose 0,68 % Yeast Nitrogen Base 0,02 % Adenin 0,02 % Urazil 0,02 % Histidin
SDIV-Medium*	2 % Glucose 0,68 % Yeast Nitrogen Base

\* für das entsprechende Festmedium, werden zusätzlich 2 % Bacto-Agar dazugegeben.

Die Kultivierung und Lagerung von humanen Zelllinien erfolgte in den in Tabelle 7 aufgelisteten Medien.

**Tabelle 7: Verwendete Zellkulturmedien**

Medium	Inhalt
DMEM-Zellkulturmedium 1 g Glucose/l	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) 1g/L 10 % FCS 1 % Pen/Strep

## 2.6 Bakterien- und Hefestämme

Innerhalb dieser Arbeit wurde zu Klonierungszwecken mit den in Tabelle 8 aufgelisteten Bakterienstämmen gearbeitet. Yeast-Two-Hybrid-Analysen wurden mit dem *S. cerevisiae*-Stamm L40ccua durchgeführt (Tabelle 9).

Tabelle 8: Verwendete Bakterienstämme

Name	Genotyp
XL1-Blue (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) ]</i>
XL10-Gold (Stratagene)	<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>
DH-5-α (Invitrogen)	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>

Tabelle 9: Verwendeter Hefestamm

Name	Genotyp
L40ccua	<i>MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2::(lexAop)<sub>4</sub>-HIS3 ura3::(lexAop)<sub>8</sub>-lacZ ADE2::(lexAop)<sub>8</sub>- URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2</i>

## 2.7 Humane Zelllinien

Innerhalb dieser Arbeit wurde mit folgenden humanen Zelllinien gearbeitet.

Tabelle 10: Verwendete humane Zelllinien

Zell-Linie	Organ	ATCC-Nummer
Caco-2	Darm	HTB-37
C33A	Zervix	CRM-HTB-31
DU145	Prostata	HTB-81
HEK293T	Niere	CRL-1573
HeLa	Zervix	CCL-2
HepG2	Leber	HB-8065
MCF7	Brust	HTB-22
PC3	Prostata	CRL-1435
SW480	Darm	CCL-228
SW620	Darm	CCL-227

## 2.8 Enzyme

Enzyme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden nach den Angaben der entsprechenden Hersteller verwendet (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Verwendete Enzyme**

Name	Hersteller
<i>Sall</i>	New England Biolabs
<i>NotI</i>	New England Biolabs
<i>M-MLV reverse Transkriptase</i>	Promega
<i>Phusion</i>	Finnzymes
<i>T4-DNA-Ligase</i>	New England Biolabs
<i>T4-DNA-Polymerase</i>	New England Biolabs

## 2.9 Antikörper

In Tabelle 12 sind die primären Antikörper gelistet, die innerhalb dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 12: Verwendete Primärantikörper**

Antikörper	Hersteller	Organismus	Verdünnung	
			Westernblot (in 3% BSA/PBS)	Mikroskopie (in PBS)
$\alpha$ -ATXN2	BD-Bioscience	Maus	1:500-1:1000	1:200
$\alpha$ -ATXN2	Sigma-Aldrich	Kaninchen	1:500	1:200
$\alpha$ -ATXN1	Sigma-Aldrich	Kaninchen	1:500	1:200
$\alpha$ -FLAG	Sigma-Aldrich	Kaninchen	1:2000	1:500
$\alpha$ -FLAG M2	Sigma-Aldrich	Maus	1:2000	1:500
$\alpha$ -HA-Fluorescein	Roche			1:10
$\alpha$ -HA	Roche	Maus	1:1000	
$\alpha$ -MYC	Millipore	Maus		1:500
$\alpha$ -MYC	Sigma-Aldrich	Kaninchen		1:500
$\alpha$ -PML	Abcam (ab31101)	Kaninchen		unverdünnt
$\alpha$ -RBM9	Abnova	Maus	1:1000	1:200
$\alpha$ -RBM9	Bethyl-Laboratories	Kaninchen	1:1000	1:200
$\alpha$ -SR	Zymed	Maus		1:400
$\alpha$ -TIAR	BD-Bioscience	Maus		1:200
$\alpha$ -Tubulin DM1A	Sigma-Aldrich	Maus	1:2000	

In Tabelle 13 sind die sekundären Antikörper gelistet, die innerhalb dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 13: Verwendete Sekundärantikörper**

Antikörper	Hersteller	Organismus	Verdünnung	
			Westernblot	Mikroskopie
			( in PBS)	
$\alpha$ -Kaninchen-POD	Sigma-Aldrich	Ziege	1:10000	
$\alpha$ -Kaninchen-AP	Dianova	Ziege	1:10000	
$\alpha$ -Maus-POD	Sigma-Aldrich	Ziege	1:10000	
$\alpha$ -Maus-AP	Dianova	Ziege	1:10000	
Alexa488- $\alpha$ -Maus	Molecular Probes	Ziege	1:2000	
Alexa568- $\alpha$ -Kaninchen	Molecular Probes	Ziege		1:500
Cy3- $\alpha$ -Kaninchen	Dianova	Ziege	1:1000	1:500
Cy3- $\alpha$ -Maus	Dianova	Ziege	1:1000	1:500
Fitc- $\alpha$ -Kaninchen	Dianova	Ziege		1:500
Fitc- $\alpha$ -Maus	Dianova	Ziege		1:500
Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG	Invitrogen	Schaf		
Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG	Invitrogen	Schaf		
Dynabeads® Protein G	Invitrogen			

## 2.10 siRNA-Moleküle

**Tabelle 14: Verwendete siRNA-Moleküle**

siRNA	Hersteller
ON-TARGETplus SMARTpool, human ATXN2	Dharmacon, L-011772-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool, human ATXN1	Dharmacon, L-004510-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool, human RENT1 (UPF1)	Dharmacon, L-011763-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool, human RBM9 (Fox-2)	Dharmacon, L-020616-01-0005
ON-TARGETplus Non Targeting Pool	Dharmacon, D-001810-10-20

## 2.11 Oligonukleotide

Für die Klonierung der Konstrukte von Fox-2<sub>v1</sub> und von pACT4-1b-ATXN1-NT Q82 wurden die in Tabelle 15 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet. Der unterstrichene Teil der Sequenzen entspricht den Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die am 5'-Ende angefügt wurden.

**Tabelle 15: Oligonukleotide für die Klonierung von Fox-2<sub>v1</sub> und pACT4-1b-ATXN1-NT Q82**

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
Fox-2_nuk_sense1_Sal1	<u>GCGTCGACGATGGAGAAAAGAAAATGGTA</u>
Fox-2_nuk_as1_E12_E13_blunt	CATATCCACCATAGAGGTCAGCACCGTAAA
Fox-2_nuk_sense1_E12_E13_blunt	TGACCTCTATGGTGGATATGCAGCCTACAG
Fox-2_nuk_as1_Not1	<u>ATTTGCGGCCGCTTTCAGTAGGGGGCAAATCGGC</u>
ATXN1_Sal1_sense	<u>ATGTCGACAAAATCCAACCAAGAG</u>
ATXN1_Not1_NT_antisense	<u>TTAGCGGCCGCATCATTTCATGAAGTAGGG</u>

Zur Quantifizierung der Genexpression und zur Analyse von bestimmten Spleiß-Ereignissen wurden die in Tabelle 16 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet.

**Tabelle 16: Oligonukleotide für RT-qPCR-Analysen**

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
ATXN1_E8_fw	AGCCATAGCCCGGGCGTGGCCGTGA
ATXN1_E9_rev	CTGGCTGGTTCTCTCCGGAC
ATXN2_E3_4_fw	ATCAGTTGTTGGCTCCAAATGT
ATXN2_E5_rev	CGGCATCAAGTACCAAATCACA
ATXN2_E17_18_fw	AGGCGTGCAACCTTTATACC
ATXN2_E18_rev	CTGCTCTATATGTCTTGGCT
ATXN2_E17_19_fw	AGGCGTGCAATACCAAATAT
ATXN2_E19_rev	CTGAGACTGATAATGTGGCA
ATXN2_E20_22_fw	GCGATGTATGTTTCCACGGG
ATXN2_E22_rev	TGCTGTCCAGTGGGGGTAGC
B2M_fw	ACTGAATTCACCCCCACTGA
B2M_rev	CCTCCATGATGCTGCTTACA
β-Aktin_fw	CGGATGTCCACGTCACACTT
β-Aktin_rev	GTTGCTATCCAGGCTGTGCT
HPRT_fw	AGGAAAGCAAAGTCTGCATTGTT
HPRT_rev	GGTGGAGATGATCTCTCAACTTAA
MAP3K7_fw	GGAGCAGTGTGGAGAGCTTG
MAP3K7_E12_rev	CTGATATGACGATCTCAGGG

MAP3K7_E11_13_rev	TGTCCGTTGCCTGTGGTTGC
UPF1_fw	GCTGTGGACGACAGTGTAGC
UPF1_rev	GGAGGTCCTTCGTGTAATAGG
Fox-2_fw	CCTGGCTTCCCTTACCCTAC
Fox-2_rev	AGCAGGCTGTGCATATCTGT
Fox-2_E12_13_fw	TGACCTCTATGGTGGATATG
Fox-2_E12_32bp_fw	GAATCTGCAAACCTGCTTCAG
Fox-2_E13_rev	TCACTGTAAGCGGCTGCAGC

## 2.12 Plasmide

### 2.12.1 Yeast-Two-Hybrid-Plasmide (Y2H-Plasmide)

Die in dieser Arbeit verwendeten Y2H-Plasmide basieren auf dem Vektorhintergrund pACT4 und pBTM und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Erich Wanker, MDC-Berlin, zur Verfügung gestellt. Exemplarisch sind die Vektoren pACT4-1b und pBTM117c in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Als Prey-Plasmid wurde der Vektor pACT4 verwendet. pACT4 enthält die Gal4-Aktivierungsdomäne und besitzt als Auxotrophiemarker das *LEU2*-Gen. Die Expression der Fusionsproteine steht unter der Kontrolle des Alkoholdehydrogenase-(ADH)-Promotors. Der Bait-Vektor pBTM117c beinhaltet die Sequenzen für die LexA-Bindedomäne und enthält ebenfalls den ADH-Promotor. Als Auxotrophiemarker dient hier das *TRP1*-Gen. Als Selektionsmarker kodieren beide Vektoren für die  $\beta$ -Lactamase und vermitteln damit eine Ampizillin-Resistenz.

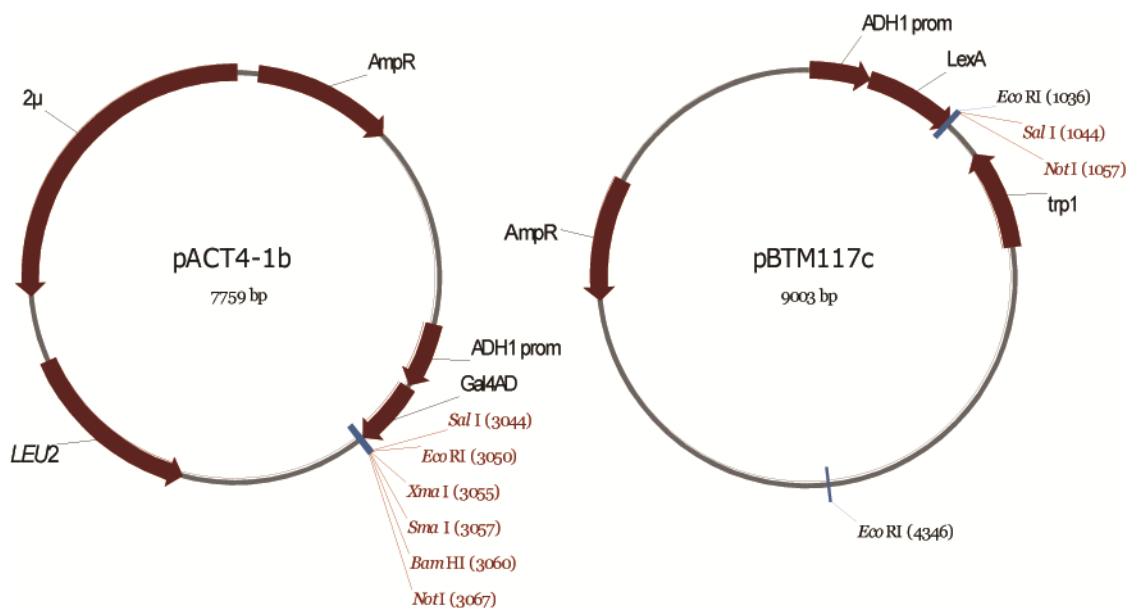


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hefeexpressionsvektoren pACT4-1b und pBTM 117c.

Im folgendem sind die in dieser Arbeit verwendeten Hefeexpressionsplasmide gelistet.

### Ataxin-2

Die für die ATXN2-Fragmente kodierenden Hefeexpressionsplasmide waren in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Sylvia Krobtsch vorhanden und wurden zur Verfügung gestellt.

pBTM117c-ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und pBTM117c-ATXN2(Q79)<sub>1-396</sub>: Die entsprechenden Fusionsproteine umfassen den N-terminalen Bereich von Ataxin-2 (AS1-396) mit jeweils 22 bzw. 79 aufeinanderfolgenden Glutaminen.

pBTM117c-ATXN2<sub>254-475</sub>: Das entsprechende Fusionsprotein beinhaltet die LSm- und die LSm-assoziierte Domäne (AS 254-475) von Ataxin-2.

pBTM117c-ATXN2<sub>481-815</sub>: Dieses Plasmid kodiert für die Aminosäuren 481-815 von Ataxin-2.

pBTM116-ATXN2<sub>816-1312</sub>: Das entsprechende Fusionsprotein kodiert für den C-Terminus von Ataxin-2 (AS 815-1312), inklusive der PAM2-Domäne.

### Ataxin-1

Die Hefeexpressionsvektoren pBTM-ATXN1-NT Q30, pBTM-ATXN1-AXH und pBTM-ATXN1-CT wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Aus diesen wurden die entsprechenden ATXN1-Fragmente mittels der Restriktionsenzyme *SalI* und *NotI* herausgeschnitten und in den, über *SalI/NotI* linearisierten pACT4-1b-Vektor ligiert. Für die Generierung des Hefexpressionsplasmids pACT4-1b-ATXN1-NT Q82 wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden ATXN1\_sense\_SalI und ATXN1\_NotI\_NT\_antisense durchgeführt. Als Template diente pCDNA1-Flag-SCA1-Q82.

pACT4-1b-ATXN1-NT Q30 und pACT4-1b-ATXN1-NT Q82: Die entsprechenden Fusionsproteine umfassen den N-terminalen Bereich von Ataxin-1 (AS1-576) mit jeweils 30 bzw. 82 aufeinanderfolgenden Glutaminen.

pACT4-1b-ATXN1-AXH: Dieses Konstrukt kodiert für die AXH-Domäne von Ataxin-1 und umfasst die Aminosäuren 559-701.

pACT4-1b-ATXN1-CT: Das entsprechende Fusionsprotein beinhaltet den C-Terminus von Ataxin-1 (AS 530-816).

### Fox-2

Die Plasmide pACT4-1b-Fox-2<sub>Cyt</sub> und pBTM117c-Fox-2<sub>Cyt</sub> wurden von Melanie Isau, im Rahmen ihrer Diplomarbeit „Untersuchungen zur zellulären Funktion des Proteins Ataxin-2“ innerhalb der Arbeitsgruppe generiert.

pACT4-1b-Fox-2<sub>Cyt</sub> und pBTM117c-Fox-2<sub>Cyt</sub>: Beide Hefeexpressionsvektoren kodieren für die vollständige Sequenz von Fox-2<sub>Cyt</sub> (AS 1-391).

pACT4-1b-Fox-2<sub>V1</sub> und pBTM117c-Fox-2<sub>V1</sub>: Beide Hefeexpressionsvektoren kodieren für die vollständige Sequenz von Fox-2 Variante 1 (AS 1-380). Für die Generierung dieser Plasmide wurde das entsprechende DNA-Fragment mittels der Restriktionsenzyme *SalI* und *NotI* aus dem Säugerexpressionsplasmid pCMV-HA-Fox-2<sub>V1</sub> herausgeschnitten und in die, über *SalI* und *NotI* linearisierten, Vektoren pACT4-1b und pBTM117c ligiert.

### 2.12.2 Säugerexpressionsvektoren

Die Säugerexpressionsplasmide pCMV-HA und pCMV-MYC wurden von Dr. Marie-Laure Yaspo (MPI-MG, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Vektoren kodieren für einen N-terminalen HA-, bzw. MYC-tag. In Abbildung 4 sind beide Vektoren schematisch dargestellt. Die Expression der Fusionsproteine steht unter dem humanen CMV-Promotor. Die Vektoren besitzen zusätzlich das Ampizilin-Resistenzgen für die Selektion in *E. coli*.

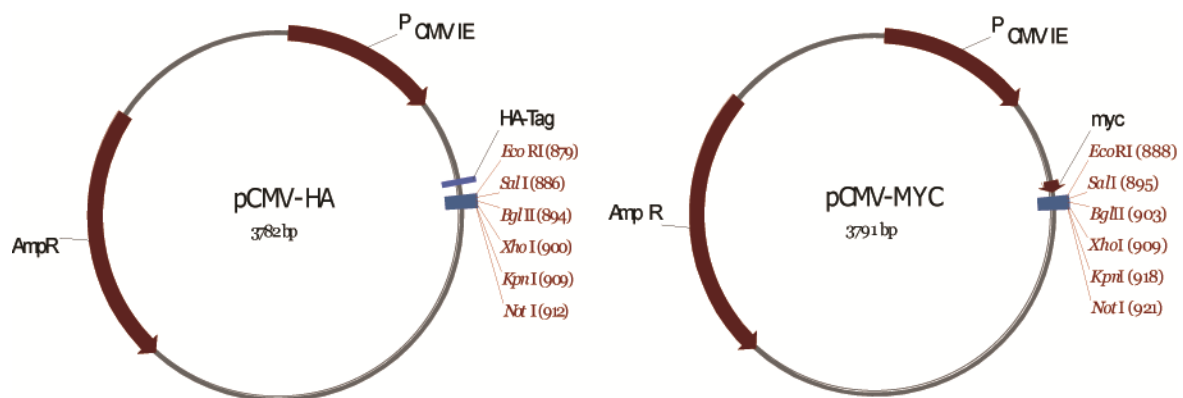


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Plasmide pCMV-MYC und pCMV-HA.

Das Säugerexpressionsplasmid pTL-FLAG wurde von Prof. Dr. Erich Wanker (MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt und ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Die Expression der Fusionsproteine steht unter dem SV40-Promotor. Der Vektor kodiert für einen N-terminalen FLAG-tag und besitzt ein Ampizilin-Resistenzgen.

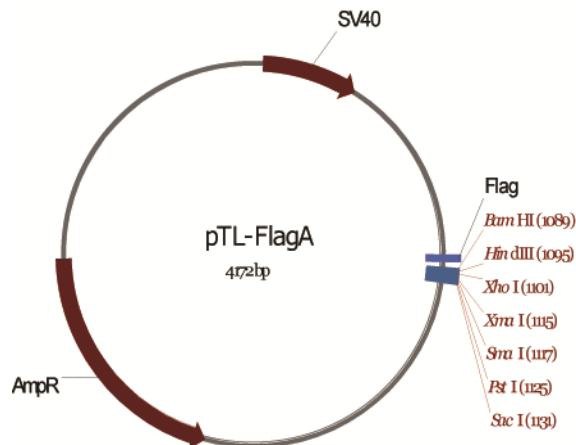


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Plasmids pTL-FLAG.



Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Konstrukte verwendet:

### Ataxin-2

pCMV-MYC-ATXN2 Q22 und pCMV-MYC-ATXN2 Q79: Beide Vektoren kodieren für die vollständige ATXN2-Sequenz (AS 1-1312) mit entweder 22 oder 79 Glutaminen, wobei ein N-terminaler MYC-tag fusioniert ist.

### Ataxin-1

pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 und pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82: Beide Plasmide kodieren für die vollständige Sequenz von Ataxin-1 (AS 1-816) mit entweder 30 oder 82 Glutaminen fusioniert an einen N-terminalen FLAG-tag. Diese Plasmide wurden der Arbeitsgruppe von Flaviano Giorgini, University of Leicester, zur Verfügung gestellt.

### Fox-2

Das Säugerexpressionsplasmid pCMV-MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub> wurde von Melanie Isau, im Rahmen ihrer Diplomarbeit „Untersuchungen zur zellulären Funktion des Proteins Ataxin-2“ innerhalb der Arbeitsgruppe generiert.

pCMV-MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub>: Kodiert für die vollständige Sequenz von Fox-2<sub>Cyt</sub> (AS 1-391) fusioniert an einen N-Terminalen MYC-tag.

pCMV-HA-Fox-2<sub>V1</sub>: Kodiert für die vollständige Sequenz von Fox-2<sub>V1</sub> (AS 1-380) fusioniert an einen N-terminalen HA-tag.

Für die Generierung der Plasmide pACT4-1b-Fox-2<sub>V1</sub>, pBTM117c- Fox-2<sub>V1</sub> und pCMV-HA-Fox-2<sub>V1</sub> diente als Vorlage das Konstrukt pCMV-MYC-Fox2<sub>Cyt</sub>. Um die 32 zusätzlichen Nukleotide zu entfernen, wurden zwei PCR-Schritte durchgeführt. Im ersten Schritt wurde mittels der Oligonukleotide Fox-2\_nuk\_sense1\_SalI und Fox-2\_nuk\_as1\_E12\_E13\_blunt ein N-terminales Fragment von Fox-2<sub>V1</sub> generiert. Das Oligonukleotid Fox-2\_nuk\_as1\_E12\_E13 wurde so generiert, dass er aus den letzten 20 Nukleotiden von Exon 12, gefolgt von den ersten 11 Nukleotiden von Exon 13 besteht. Im zweiten PCR-Schritt wurden die Oligonukleotide Fox-2\_nuk\_sense1\_E12\_E13\_blunt und Fox-2\_nuk\_as1\_NotI verwendet, um das entsprechende C-terminale Fragment von Fox-2<sub>V1</sub> zu generieren. Das Oligonukleotid Fox-2\_nuk\_sense1\_E12\_E13\_blunt beinhaltet die letzten 10 Nukleotide von Exon 12 und die ersten 21 Nukleotide von Exon 13. Beide Amplikons wurden über ein 1% Agarosegel aufgereinigt, 1:1 gemischt und als Template für eine weitere PCR verwendet. Hierbei wurden die Oligonukleotide Fox-2\_nuk\_sense1\_SalI und Fox-2\_nuk\_as1\_NotI verwendet. Das entstandene Amplifikat entspricht in seiner Sequenz Variante 1 von Fox-2. Das Amplikon wurde in den Klonierungsvektor pJet1.2 kloniert und über die Restriktionsenzyme SalI und NotI aus diesem isoliert. Das isolierte DNA-Fragment wurde in den entsprechend vorbereiteten Vektor pCMV-HA kloniert. Nach erfolgreicher Sequenzierung erfolgte eine Umklonierung in die Vektoren pACT4-1b und pBTM117c.

### 3 Methoden

#### 3.1 Polymerasekettenreaktion

##### 3.1.1 Herstellung der Fox-2 Variante 1

Zur Herstellung der Fox-2<sub>v1</sub>-Expressionsplasmide wurden zunächst zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. Für beide PCRs wurde als Vorlage das Expressionsplasmid pCMV-MYC-Fox2<sub>Cyt</sub> verwendet. Folgende Ansätze wurden verwendet:

PCR 1: 4 µl Phusion HF-Puffer (5x), 0,2 µl dNTPs (25 mM), 0,1 µl Fox-2\_nuk\_sense1\_SalI (100 µM), 0,1 µl Fox-2\_nuk\_as1\_E12\_E13\_blunt (100 µM), 1 µl pCMV-MYC-Fox2<sub>Cyt</sub> (20 ng/µl), 0,6 µl DMSO, 13,8 µl Wasser und 0,2 µl *Phusion*-Polymerase.

PCR 2: Der Ansatz dieser PCR entsprach der PCR1. Allerdings wurden hier die Oligonukleotide Fox-2\_nuk\_sense1\_E12\_E13\_blunt und Fox-2\_nuk\_as1\_NotI verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 17 : PCR-Programm zur Generierung von Fox-2<sub>v1</sub>**

Schritt	Temperatur	Zeit	
Erstes Aufschmelzen	98°C	30 sek	
Aufschmelzen	98°C	10 sek	} 35x
Primer-Anlagerung	60°C	30 sek	
Verlängerung	72°C	60 sek	
Verlängerung	72°C	10 min	

Nach Überprüfung der Zwei-Schritt-PCR über ein Agarosegel, wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Beide Eluate wurden 1:1 gemischt und eine 1:10-Verdünnung hergestellt. Dies diente als Vorlage für eine erneute PCR, die wie folgt zusammengesetzt war:

PCR 3: 4 µl Phusion HF-Puffer (5x), 0,2 µl dNTPs (25 mM), 0,1 µl Fox-2\_nuk\_sense1\_SalI (100 µM), 0,1 µl Fox-2\_nuk\_as1\_NotI (100 µM), 1 µl Vorlage, 0,6 µl DMSO, 0,2 µl *Phusion*-Polymerase und 13,8 µl Wasser.

Die PCR-Bedingungen entsprachen denen von PCR 1 und 2 und sind in Tabelle 17 aufgelistet. Das entsprechende Produkt wurde über ein 1%iges präparatives Agarosegel aufgereinigt und in einer Ligationsreaktion eingesetzt.

### 3.1.2 Herstellung des Plasmids pACT4-1b-ATXN1-NT Q82

Für die Generierung des Hefeexpressionsplasmids pACT4-1b-ATXN1-NT Q82 wurde eine PCR durchgeführt, bei der als Vorlage das Plasmid pCDNA1-Flag-SCA1 Q82 diente. Es wurde folgender Ansatz verwendet:

4  $\mu$ l Phusion GC-Puffer (5x), 0,2  $\mu$ l dNTPs (25 mM), 0,1  $\mu$ l ATXN1\_Sal1\_sense (100  $\mu$ M), 0,1  $\mu$ l ATXN1\_Not1\_NT\_antisense (100 $\mu$ M), 1  $\mu$ l pcDNA1-Flag-ATXN1 Q82 (30 ng/ $\mu$ l), 0,6  $\mu$ l DMSO, 0,2  $\mu$ l Phusion-Polymerase und 13,8  $\mu$ l Wasser.

Die PCR erfolgte wie in Tabelle 17 angegeben. Das entstandene DNA-Fragment wurde über ein präparatives Gel aufgereinigt und anschließend in einer Ligationsreaktion eingesetzt

### 3.1.3 PCR zur Expressionsanalyse

Die PCR-Analysen zur Überprüfung der Expression von Fox-2-Isoformen die das Exon ENSE00001553845 zwischen Exon 12 und 13 besitzen, wurden mit den Oligonukleotiden Fox-2\_E12\_32bp\_fw und Fox-2\_E13\_rev durchgeführt. Als Vorlage diente HEK293T-, HeLa- bzw. SW620-cDNA. Der hier verwendete Ansatz entspricht dem Ansatz einer RT-qPCR und das PCR-Programm entspricht dem in Tabelle 18 aufgelistetem RT-qPCR-Programm.

Die PCR-Analysen zur Überprüfung der Expression von ATXN2 $\Delta$ E18-Isoformen wurden mit den Oligonukleotiden ATXN2\_E17\_19\_fw und ATXN2\_E19\_rev durchgeführt. Als Vorlage diente die cDNA von unterschiedlichen Zelllinien. Der hier verwendete Ansatz entspricht dem Ansatz einer RT-qPCR und das PCR-Programm entspricht dem in Tabelle 18 aufgelistetem RT-qPCR-Programm. Die PCRs wurden über ein 3%iges Agarosegel nichtquantitativ ausgewertet.

### 3.1.4 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR)

Innerhalb dieser Arbeit wurde die SYBR-GreenI-Methode verwendet, die aufgrund des verwendeten Farbstoffes sehr sensitiv ist. Vor den eigentlichen Analysen wurde mit den entsprechenden Primer-Paaren eine Schmelzkurvenanalyse bei unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen durchgeführt, um die Spezifität des entstehenden Produktes zu verifizieren. Außerdem wurde anhand einer cDNA-Verdünnungsreihe überprüft, ob die Oligonukleotide für die RT-qPCR geeignet waren. Von den Primern wurde ein Mastermix hergestellt, der aus 90  $\mu$ l DEPC-Wasser, 5  $\mu$ l sense und 5  $\mu$ l antisense Primer (100  $\mu$ M) bestand. Für eine Reaktion in einer 384-Kammerplatte wurden 1,25  $\mu$ l cDNA eingesetzt und diese mit 5,75  $\mu$ l DEPC-Wasser, 2,5  $\mu$ l SYBR-Green, und 0,5  $\mu$ l Primer-Mix versetzt. Bei jeder Analyse wurden drei technische Replikate von zwei biologischen Proben untersucht. Es wurde das ABI-PRISM 7900HT Sequence Detection System von Applied Biosystems verwendet, welches die Fluoreszenzemission aufzeichnete. In Tabelle 18 ist das verwendete PCR-Programm ersichtlich. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SDS 2.1 nach der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode.

Tabelle 18: Temperaturprogramm für die RT-qPCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Vorbereitung	50°C	2 min
Aufschmelzen	95°C	10 min
Aufschmelzen	95°C	15 sek
Primer-Anlagerung	60°C	60 sek
Schmelzkurve	95°C	15 sek
	60°C	15 sek
	95°C	15 sek

} 40x

### 3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus einem 1-3%igem Agarosegel herausgeschnitten und über das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega nach den Hersteller-Angaben aufgereinigt. Die DNA wurde mit 30 µl Wasser von den Säulen eluiert und für die folgende Ligation eingesetzt.

### 3.3 Ligation

Um DNA-Fragmente in die entsprechend vorbereiteten Vektoren zu ligieren, wurden linearisierter Vektor und DNA-Fragment im Verhältnis 1:3 zusammengegeben. Das Volumen des Gesamtansatzes betrug 20 µl. Es wurde der Quick-Ligation-Puffer (2x) von NEB verwendet und 1 µl der T4-DNA-Ligase eingesetzt. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.4 Transformation von *E. coli*

50 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit 7 µl des entsprechenden Ligationsansatzes gemischt und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Anschließend wurde der Ansatz sofort wieder auf Eis überführt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Ansätze für eine Stunde bei 37°C und 500 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze bei 14000 rpm zentrifugiert und 700 µl des Überstandes abgenommen. Die Zellen wurden im verbleibenden Überstand resuspendiert und auf LB-Platten mit Ampizilin (Tabelle 6) ausplattiert und die Platten für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

### ***3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli***

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden verschiedene Aufreinigungs-Kits unterschiedlicher Hersteller verwendet (PeqLab, Fermentas, Promega, Invitrogen). Für Mini-Aufreinigungen wurden 3 ml und für Midi-Präparationen 100 ml Bakterienkultur über Nacht bei 37°C angezogen. Die Kulturen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in Resuspensionspuffer aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Lyse der *E. coli*-Zellen durch die Zugabe von Lyse-Puffer. Chromosomale DNA und Zelltrümmer wurden mittels Zugabe von Präzipitations-Puffer gefällt. Durch eine Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, RT) erfolgte die Trennung des Präzipitates von der Plasmid-DNA-haltigen Lösung. Diese Überstände wurden auf entsprechende Säulen gegeben (Mini: 1min, 13000 rpm; Midi: Vakuum-vermittelt). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule nach den Herstellerangaben gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit Wasser (Mini: 50 µl; Midi: 300 µl). Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration der Proben mittels Nano Drop bestimmt.

### ***3.6 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen***

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des Nano Drop ND-1000 spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurden 2 µl der wässrigen Nukleinsäurelösung auf die Gerätevorlage pipettiert. Das Gerät misst die Absorption bei 260 nm und 280 nm und bestimmt darüber die Konzentration der Probe in ng/µl. Gleichzeitig wird das Verhältnis 260nm/280nm angegeben, womit die Reinheit der DNA bzw. RNA bestimmt wird.

### ***3.7 Agarosegelelektrophorese***

Zur Überprüfung und Aufreinigung von Restriktionsanalysen bzw. DNA-Amplifikaten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Für Plasmid- und Klonierungszwecke wurden 1-2%ige Agarosegele verwendet. Um die Amplifikate der qPCR zu überprüfen wurden 3%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 1-3% Agarose in TAE-Puffer gelöst, mit 0,5 g/ml Ethidiumbromid versetzt, in die Gelkammer gegossen und ein Taschenkamm gesetzt. Die entsprechenden Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Zusätzlich wurde ein DNA-Marker aufgetragen (Tabelle 5). Die Elektrophorese erfolgte für ca. 30-45 Minuten bei 60V. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das Geldokumentationssystem verwendet.

### **3.8 Restriktionsverdau**

Um Plasmid-DNA einem Restriktionsverdau zu unterziehen, wurden die vom Hersteller angegebenen Einheiten an Restriktionsenzym und die entsprechenden Original-Puffer verwendet. Für eine Kontroll-Restriktionsverdau betrug das Volumen 20  $\mu\text{l}$  und für einen präparativen Ansatz 50  $\mu\text{l}$ . Die Ansätze wurden für 2-4 Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend über eine Agarosegelelektrophorese analysiert.

### **3.9 Sequenzierung**

Zur Verifizierung von neu generierten Konstrukten oder von PCR-Amplifikaten wurde entweder der MPI-MG-interne Sequenzierservice benutzt oder die Proben wurden von Eurofins/MWG Operon analysiert.

### **3.10 Transformation von *S. cerevisiae***

Ein Einzelklon des Hefestamms L40ccua wurde in 3 ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurde die optische Dichte bei 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) gemessen. Die Kultur wurde anschließend mit YPD verdünnt, so dass sie eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 aufwies. Diese Hauptkultur wurde für 3-4 Stunden bei 30°C schüttelnd inkubiert, bis eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,6-0,8 erreicht war. Die Kultur wurde pelletiert (5 min, 2000 rpm, RT) und die Zellen im Folgenden mit 30 ml TE-Puffer gewaschen und erneut pelletiert (2000 rpm, 5 Minuten, RT). Es erfolgte eine Resuspension der Zellen in 1 ml Hefetransformationslösung 1. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Heringssperma-DNA wurde für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. 250 ng Plasmid-DNA wurden mit 230  $\mu\text{l}$  Hefetransformationslösung 2 und 5  $\mu\text{l}$  Heringssperma-DNA (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gemischt. 30  $\mu\text{l}$  der resuspendierten Hefe-Zellen wurden in diesen Ansatz gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Ansätze bei 30°C für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  DMSO erfolgte ein Hitzeschock für 7 Minuten bei 42 °C. Anschließend wurden die Hefezellen für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach erfolgter Resuspension in 50  $\mu\text{l}$  Wasser wurden die Zellen auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

### **3.11 Yeast-Two-Hybrid (Y2H)-System**

Das Y2H-System ist eine Methode, mit der man Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* nachweisen kann. Das Prinzip des Y2H-Systems beruht darauf, dass Transkriptionsfaktoren zwei Domänen besitzen, eine DNA-Bindedomäne (BD) und eine Polymerase II-Aktivierungsdomäne (AD), welche in räumlicher Nähe sein müssen, um die Transkription auszulösen. Um eine Interaktion von zwei Proteinen zu testen, werden Aktivierungs- und Bindedomäne jeweils mit einem der zu untersuchenden Proteine fusioniert. Interagieren beide Proteine miteinander, so befinden sich Aktivierungs- und Bindedomäne in räumlicher Nähe und können als vollständiger

Transkriptionsfaktor fungieren, wodurch es zur Transkription von Reportergenen kommt. Das hier verwendete Prey-Plasmid pACT4 enthält die Sequenzen für die Gal4-Aktivierungsdomäne und das Bait-Plasmid pBTM die Sequenz für die LexA-Bindedomäne. Der verwendete Hefestamm L40ccua besitzt die Reportergene *HIS3*, *LacZ* und *URA3*, die von Promotoren reguliert werden, die unter der Kontrolle des LexA-Operators stehen, der von der LexA-Bindedomäne erkannt wird.

Um auszuschließen, dass die verwendeten Konstrukte ohne einen Interaktionspartner in der Lage sind die Transkription der Reportergene zu aktivieren, wurde im Voraus jeweils ein Test auf Autoaktivierung durchgeführt, wobei das jeweilige Bait- bzw. Prey-Plasmid mit dem entsprechenden leeren Prey- bzw. Bait-Vektor zusammen in den Hefestamm L40ccua kotransformiert wurde, wie unter Punkt 3.10 beschrieben. Für die eigentlichen Interaktionsstudien wurden die jeweiligen Bait- und Prey-Plasmide in den Hefestamm L40ccua kotransformiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze auf SDII-Medium ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert. Vier einzelne Transformanten wurden in 50 µl sterilem Wasser in Mikrotiterplatten eingerührt und mit Hilfe eines Replikators auf eine SDII-Platte, eine SDII-Platte mit Nylon-Membran und eine SDIV-Platte übertragen. Die Platten wurden ebenfalls für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend das Wachstum der jeweiligen Klone auf den Platten analysiert. Dabei diente die SDII-Platte als Wachstumskontrolle und die SDIV-Platte zur Beurteilung der Reportergenaktivität. Die Transkription des *LacZ*-Gens wurde mittels einer β-Galaktosidase-Analyse überprüft. Hierfür wurde die Membran in flüssigem Stickstoff inkubiert, um die Hefezellen aufzuschließen. Die Membran wurde dann auf ein Whatmanpapier, welches mit X-Gal-Färbelösung getränkt war, gelegt und für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Ergebnisse wurden photographisch dokumentiert.

### ***3.12 Lagerung von kryokonservierten Säugerzellen***

Zur langfristigen Lagerung der humanen Zelllinien wurden Kryostocks angefertigt. Dafür wurden die Zellen in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und zur Ablösung der adhärennten Zellen für 10 Minuten mit 1 ml Trypsin (0,25 % in 1 mM EDTA) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 5 ml DMEM-Medium (FBS/PenStrep) aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 2000 rpm). Das Medium wurde abgenommen, die Zellen in Einfriermedium aufgenommen und nachfolgend à 1ml auf Kryoröhrchen aufgeteilt. Im Folgenden wurden die Zellen für 24 Stunden in einem Kryo-Einfriercontainer (gefüllt mit Isopropanol) pro Minute um 1°C auf -80°C abgekühlt und dann in einen Stickstofftank überführt.

### 3.13 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Der entsprechende Stock wurde aus dem Stickstofftank auf Eis überführt. Die Zellen wurden in 1 ml vorgewärmtem DMEM-Medium (FBS/PenStrep) aufgenommen, resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 2000 rpm). Nach einmaligem Waschen mit PBS und nochmaliger Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml DMEM-Medium (FBS/PenStrep) aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Flasche überführt, die 20 ml vorgewärmtes DMEM-Medium (FBS/PenStrep) enthielt.

### 3.14 Kultivierung von humanen Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien (Tabelle 10) wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit 20 ml DMEM-Medium (FBS/PenStrep) kultiviert. Das DMEM-Medium enthielt 10% fötales bovines Serumalbumin, 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden je nach Konfluenz alle 3-4 Tage umgesetzt. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin (0,25 % in 1 mM EDTA) versetzt. Anschließend wurden die Zellen in DMEM-Medium (FBS/PenStrep) aufgenommen und im Verhältnis 1:15 in die 75 cm<sup>2</sup>-Flasche überführt. Entsprechend den experimentellen Ansätzen wurden die Zellen, wie in Tabelle 19 aufgelistet, in unterschiedlichen Zellkulturplatten ausgesät und bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert.

**Tabelle 19: Anzahl ausgesäeter humaner Zellen in unterschiedlichen Zellkulturplatten**

Zelllinie	Zellkulturplatte	Zellzahl
HeLa	150x20 mm	1-3 Mio
	24-Kammer-Platte	10000-20000
MCF7	24-Kammer-Platte	10000-20000
DU145	150x20 mm	1-3 Mio
	24-Kammer-Platte	10000-20000
HEK293T	150x20 mm	1-3 Mio
	12-Kammer-Platte	20000-75000
	24-Kammer-Platte	10000-20000

### 3.15 Lyse von Säugerzellen

Die Lyse von Säugerzellen erfolgte innerhalb dieser Arbeit nach zwei unterschiedlichen Protokollen.

Protokoll A) Humane Zellen wurden ausgesät, kultiviert und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Zellkulturlysepuffer 1, welcher mit Benzonase (1 µl/ 10 ml) und Proteaseinhibitor (1:20) versetzt wurde, behandelt. Für 150x20 mm-Zellkulturplatten wurde 2-3 ml Lysepuffer, für 6-Kammerplatten 400 µl und für 12-Kammerplatten 200 µl eingesetzt. Die



Lyse erfolgte für eine halbe Stunde bei 4°C auf einem Wipptisch. Die Lysate wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Um nicht lysierte Zellen und Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Ansätze im Anschluss zentrifugiert (1 min, 18000 rpm) und das Pellet verworfen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurden 800 µl PBS in einer Küvette vorgelegt und mit 200 µl Bio-Rad-Lösung sowie 5 µl des Lysats versetzt. Die Absorption bei 595 nm wurde photometrisch gemessen und die Proteinkonzentration anhand der BSA-Standardreihe bestimmt.

Protokoll B) Alternativ wurden HEK293T-Zellen ausgesät, kultiviert und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden im Folgenden für 10 Minuten mit Zelllysepuffer A versetzt und 10mal mittels einer Nadel mechanisch geschert. Darauffolgend wurden die Ansätze mit 500 mM NaCl versetzt, für 20 Minuten bei 4 °C auf einem Rotationsrad inkubiert und die Ansätze für 5 Minuten (5000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4°C gelagert. Das Pellet wurde für 30 Minuten bei 37°C mit Zellkulturlysepuffer B behandelt und erneut zentrifugiert (5000 rpm, 4°C). Dieser Überstand wurde mit dem ursprünglichen Überstand (Lyse mit Puffer A) vereinigt.

### **3.16 Koimmunopräzipitation**

Die Koimmunopräzipitation ist eine Methode, mit der direkte und indirekte Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* nachgewiesen werden können. Dazu wird einer der potentiellen Interaktionspartner mit einem spezifischen Antikörper aus Zelllysaten isoliert, wobei Interaktionspartner dieses Proteins weiterhin assoziiert bleiben.

Für die KoIp von Fox-2 und Ataxin-2 wurden 2 µl Kaninchen- $\alpha$ -RBM9-Antikörper mit 1 mg HeLa-Lysat versetzt, wohingegen für die KoIp von Fox-2 und Ataxin-1 4 µl Maus- $\alpha$ -RBM9-Antikörper mit 1 mg HEK293T-Lysat inkubiert wurden. Als Kontrolle diente die gleiche Lysatmenge, die nicht mit dem primären Antikörper versetzt wurde. Diese Ansätze wurden für 12-16 Stunden bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Im Anschluss wurden die KoIp-Proben und die Kontrollproben mit 15 µl  $\alpha$ -Kaninchen-Dynabeads bzw. 30 µl Protein G-gekoppelten-Dynabeads versetzt, welche vorher je dreimal mit 3% BSA/PBS und PBS gewaschen wurden. Diese Ansätze wurden für weitere drei Stunden bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert und im Folgenden dreimal mit 3% BSA/PBS und dreimal mit PBS gewaschen. Die Beads wurden in 10 µl PBS aufgenommen, mit 5 µl Laemmli-Puffer versetzt und für 5-10 Minuten bei 95°C inkubiert, um die Proteine von den Dynabeads zu lösen.

### **3.17 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, bei der Proteingemische elektrophoretisch, unter denaturierenden Bedingungen, der Masse nach getrennt werden. Für die Herstellung eines SDS-Geles wurde das Mini Protean 3 System von Bio-Rad verwendet. Im ersten Schritt wurde ein Trenngel gegossen (Tabelle 20) und mit Isopropanol überschichtet. Nach

dessen Polymerisierung wurde das Isopropanol vollständig entfernt und ein 5%iges Sammelgel gegossen und ein Taschenkamm gesetzt (Tabelle 20). Nach der Auspolymerisierung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Gelkammer wurde zusammengesetzt und mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Im Anschluss wurde das Gel mit den Protein-Proben beladen. Als Marker wurden 5  $\mu$ l des Page Ruler Plus (Fermentas) aufgetragen. Zum Einlaufen der Proben wurde die Elektrophorese für ca. 15 Minuten bei 90V durchgeführt. Anschließend wurde die Spannung auf 180V erhöht.

**Tabelle 20: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel**

	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12,5 %	5%
Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	
Sammelgelpuffer			1 ml
30% Acrylamid/bis-Acrylamid	4 ml	5 ml	0,67 ml
Wasser	5 ml	4 ml	2,33 ml
10 % APS	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l
Temed	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l	4 $\mu$ l

### 3.18 Western-Blot

Beim Western-Blot handelt es sich um eine Methode, mit der man Proteine auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert. Innerhalb dieser Arbeit wurde sowohl mit einem semi-dry Blot-System (Peqlab) als auch mit einem Tankblot-System (Hoefler) gearbeitet. Die Nitrozellulosemembran wurde vor dem Zusammenbau des Blot-Systems für 2 Minuten in Blotpuffer geschwenkt, wohingegen die PVDF-Membran für 20 Sekunden in Methanol inkubiert und anschließend für 10 Minuten in Blotpuffer equilibriert wurde. Nach erfolgtem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran 10 Minuten getrocknet und dann kurz in Methanol gelegt und erneut getrocknet.

Auf die Anode des semi-dry-Blotsystem PerfectBlue wurden drei mit Blotpuffer benetzte Whatmanpapiere gelegt. Auf diese wurden die Membran und das Gel gelegt, welches mit weiteren drei, in Blotpuffer getränkten, Whatmanpapieren bedeckt wurde. Die Apparatur wurde geschlossen und die Elektrophorese bei 150mA für eine Stunde durchgeführt.

Für das Tank-Blot-System wurde auf die untere Seite der Blotkassette eine Faser-Matte gelegt, sowie zwei in Blotpuffer getränkte Whatmanpapiere. Auf diese wurde das Gel gelegt, gefolgt von der benetzten Membran, sowie zwei weiteren Whatmanpapieren und einer Fasermatte. Die Blotkassette wurde zusammengesetzt und die Kühlkammer in die Blotapparatur, gefüllt mit Blotpuffer, eingefügt. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 90V im Kühlraum (4°C).

Die Membranen wurden anschließend für eine halbe Stunde in 5 % Magermilchpulver in PBS inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Nach dreimaligem Waschen in PBS, erfolgte die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation im ersten Antikörper wurde die Membran dreimal 10 Minuten in PBS/ 0,05 % Tween 20 gewaschen und für eine Stunde in der sekundären Antikörper-Lösung inkubiert. Dieser wurde in 2 % Magermilchpulver / PBS gelöst. Daraufhin wurde die Membran erneut dreimal mit PBS/ 0,05 % Tween 20 gewaschen.

Der Nachweis der Proteine erfolgte unter Nutzung eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers mit Western Lightning ECL. Dazu wurde die Membran in eine Entwicklerkassette gelegt und mit 1 ml der Entwicklerlösung benetzt. Die Fluoreszenz der immunmarkierten Proteine wurde durch das Auflegen eines Fotofilmes sichtbar gemacht. Alternativ wurde das CN/DAB Substrate Kit nach Herstellerangaben verwendet, um die immunmarkierten Protein direkt auf der Membran sichtbar zu machen.

Im Falle der Verwendung eines AP-gekoppelten Zweitantikörpers wurden die Proteine mit dem Western Blue Substrat direkt auf dem Blot visualisiert.

### 3.19 Transfektion von Säugerzellen

#### 3.19.1 Transfektion mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion von humanen Zellen wurden innerhalb dieser Arbeit zwei Transfektionsreagenzien benutzt, Polyethylenimid (PEI) und Polyfectamin. Für die Transfektion wurden Transfektionsreagenz, DNA und das Medium entsprechend den Angaben in Tabelle 21 zusammengegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionsansätze wurden anschließend auf die Zellen gegeben und nach dreistündiger Inkubation das Medium gewechselt. Um eine Expression der Proteine zu ermöglichen, wurden die Zellen für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert und folgend für weitere experimentelle Ansätze verwendet.

**Tabelle 21: Zusammenfassung der Transfektionsansätze für humanen Zellen**

	DNA-Menge	PEI	DMEM-Medium	Polyfect	DMEM-Medium
Zellkultur-Platte 150x20 mm	10-15 µg	45 µl	2,5 ml		
12-Kammer-Platte	2 -3 µg	6 µl	100 µl	5 µl	100 µl
24-Kammer-Platte	1-2 µg	3 µl	50 µl	2,5 µl	50 µl

### ***3.19.2 Transfektion mit siRNA***

Die siRNA-Moleküle, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von Dharmacon bezogen und sind in Tabelle 14 aufgelistet. Diese wurden mit 250 µl DEPC-behandeltem Wasser auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt und bei – 80°C gelagert.

Für RNA-Interferenz-Experimente wurden, in 12-Kammerplatten bzw. 24-Kammerplatten, 15000-40000 Zellen ausgesät. Dafür wurde DMEM-Medium verwendet, welches nur mit FBS versetzt war, benutzt. Die Zellen wurden für 16-24 Stunden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Für 12-Kammerplatten wurden 24 pmol der siRNA mit 200 µl DMEM-Medium und 3 µl des Transfektionsreagenzes (Lipofectamine RNAiMAX) versetzt. Im Fall von 24-Kammerplatten wurde 12 pmol siRNA, 100 µl Medium und 1,5 µl Transfektionsreagenz eingesetzt. Der Transfektionsansatz wurde anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 48-72 Stunden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C.

### ***3.20 Induktion von oxidativem Stress in Säugerzellen***

Um oxidativen Stress in Säugerzellen auszulösen, wurden die Zellen mit 0,5 mM Natrium-meta-Arsenit behandelt und für eine Stunde bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die entsprechenden weiterführenden Analysen aufgearbeitet.

### ***3.21 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen***

HeLa- und HEK293T-Zellen wurden in 12-Kammerplatten kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Zur Aufreinigung der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Für die Lyse der Zellen wurde 350 µl RLT Puffer mit 0,1 M DTT auf die Zellen gegeben und die Zellen mit einer Spritze sechsmal mechanisch geschert. Daraufhin wurde 350 µl 70% Ethanol zu dem Ansatz gegeben, gut gemischt und das Gemisch auf die Säule gegeben. Nach Bindung der RNA an die Silica-Membran, wurde die Säule einmal mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte ein DNase-Verdau, indem ein Gemisch aus 10 µl DNase (2,7 U/µl) und 70 µl RDD-Puffer auf die Säule gegeben wurde und diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Daraufhin erfolgte ein weiterer Waschschritt mit RW1-Puffer. Nach zwei weiteren Waschschritten mit RPE-Puffer erfolgte die Elution der RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser. Anschließend wurde die Konzentration der RNA mittels NanoDrop bestimmt.

### ***3.22 Herstellung einzelsträngiger DNA***

2 µg Gesamt-RNA wurden mit 0,5 µl Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primern (0,5 µg/µl) versetzt und mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf 4°C abgekühlt. 9,4 µl DEPC-Wasser, 5 µl M-MLV 5x-Puffer, 0,5 µl dNTPs (25 mM) und 0,1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) wurden als Master-Mix vorbereitet und zu den Ansätzen gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 42°C für eine Stunde. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 25 µl DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Davon wurden 1,25 µl für eine RT-qPCR-Reaktion (10 µl) eingesetzt.

### ***3.23 Fluoreszenz-Mikroskopie***

Um die Lokalisation von Proteinen in humanen Zelllinien zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Zellen in 24-Kammerplatten auf runden Deckgläschen ausgesät, so dass sie nach den entsprechenden Behandlungen (Plasmid-Transfektion, RNAi, Stress) eine Konfluenz von ca. 80 % aufwiesen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 1h – 12 h bei -20°C mit eiskaltem Methanol fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in 3% BSA/PBS (1 Stunde, RT), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Im Folgenden wurde über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit den Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Danach erfolgte die Kernfärbung mit Hoechst (10 µg/ml PBS) für eine Minute. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben auf einem Objektträger mit 8 µl FluoromountG-Mountingmedium eingebettet. Die Analyse der Proben erfolgte am konfokalen, inversen Laser-Scanning Mikroskop LSM510 Meta (Zeiss) oder am aufrechten, konfokalen Mikroskop LSM700 Imager M2 (Zeiss). Zur Analyse wurden Ölobjektive (Zeiss PlanNEOLUAR 40x/ 1.3 oder 63x/ 1.4 DIC) verwendet. Es wurden 8 bit-Bilder aufgenommen und mit der ZEN 2009 V5.5 Software (Carl Zeiss) bearbeitet.

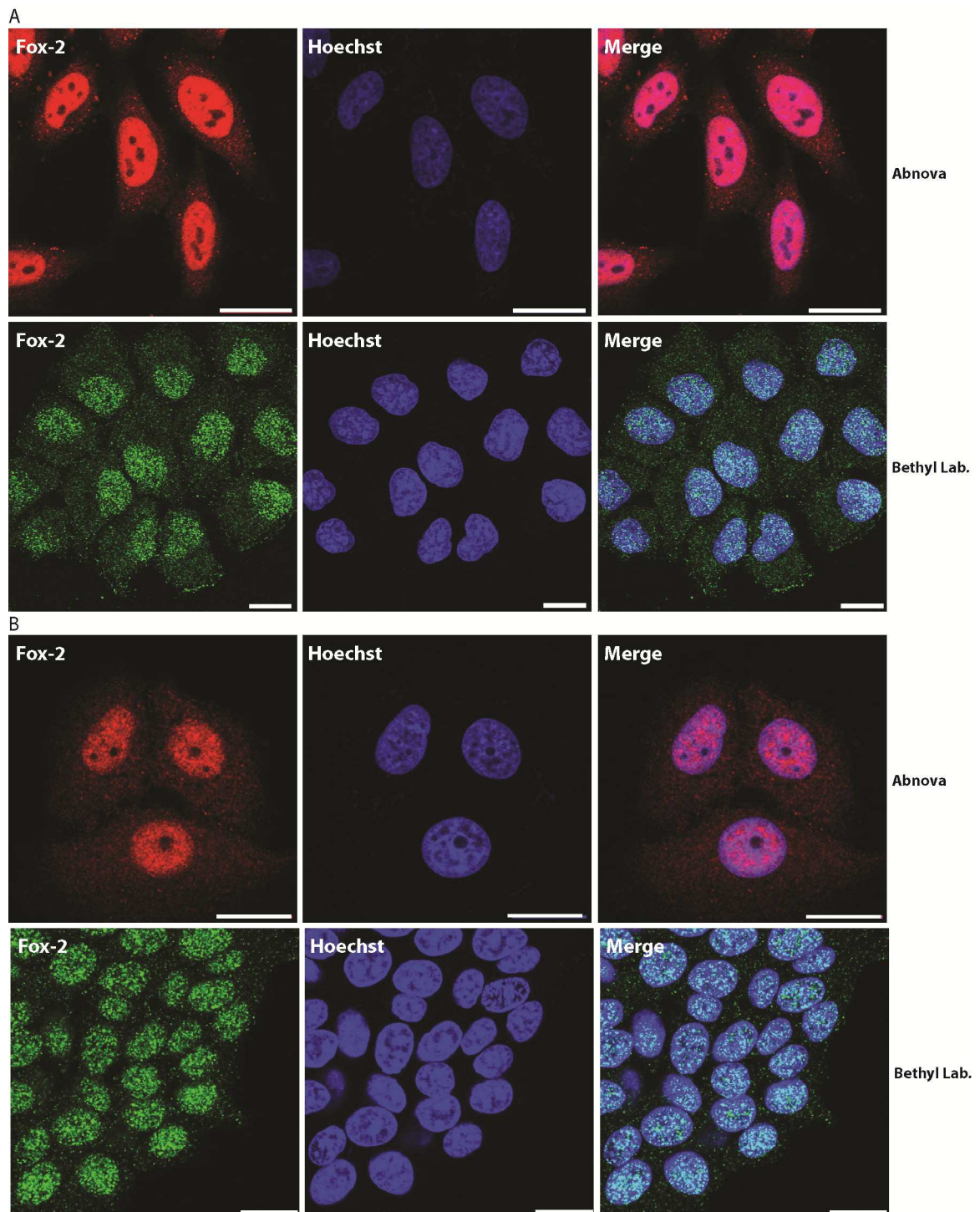
## 4 Ergebnisse

Wie bereits erwähnt, ist die Funktion von Ataxin-2, dem krankheitsverursachenden Protein der spinocerebellären Ataxie Typ 2, noch nicht vollständig verstanden. Es gibt erste Hinweise, die dem Protein eine Rolle in der Endozytose sowie im mRNA-Mechanismus zuweisen [119, 126-128]. Interessanterweise ergaben Interaktionsstudien innerhalb der Arbeitsgruppe, dass das „RNA binding motif protein 9“ (RBM9; Fox-2) möglicherweise ein Bestandteil eines Ataxin-2-Netzwerkes ist und eventuell direkt mit Ataxin-2 interagieren könnte. Fox-2 gehört zur Familie der Fox-Proteine, welche über das Vorhandensein eines einzelnen spezifischen RNA-Bindemotivs, „RNA recognition motif“ (RRM), definiert werden und mit dem „feminizing on X“ (Fox)-Genprodukt in *C. elegans* verwandt sind [169-170]. Proteine dieser Familie sind gewebspezifische Regulatoren des alternativen Spleißens [167], und es konnte bemerkenswerterweise gezeigt werden, dass die Fox-Proteine mit einigen Ataxie-auslösenden Proteinen im Zusammenhang stehen [166]. Bisherige Studien zeigen, dass Fox-2 ein nukleäres Protein ist [167, 171]. Da die subzelluläre Lokalisation des Fox-Proteins RBM9 (Fox-2) jedoch noch nicht näher untersucht wurde, sollte diese zunächst eingehender charakterisiert werden.

### 4.1 Untersuchungen zu Fox-2

#### 4.1.1 Endogene Lokalisation von Fox-2

Nach bisherigen Beschreibungen existieren sowohl nukleäre als auch cytoplasmatische Isoformen der Fox-Proteine [167]. Daher wurde innerhalb dieser Arbeit zunächst die endogene Lokalisation von Fox-2 in den humanen Zelllinien HeLa und MCF7 mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Die Zellen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, ausgesät und für die mikroskopischen Analysen vorbereitet. Um endogenes Fox-2 nachzuweisen, wurden die Zellen jeweils mit spezifischen Fox-2-Antikörpern, welche verschiedene Fox-2-Isoformen erkennen, und nachfolgend mit dem entsprechenden Fluorochromgekoppelten sekundären Antikörper behandelt.

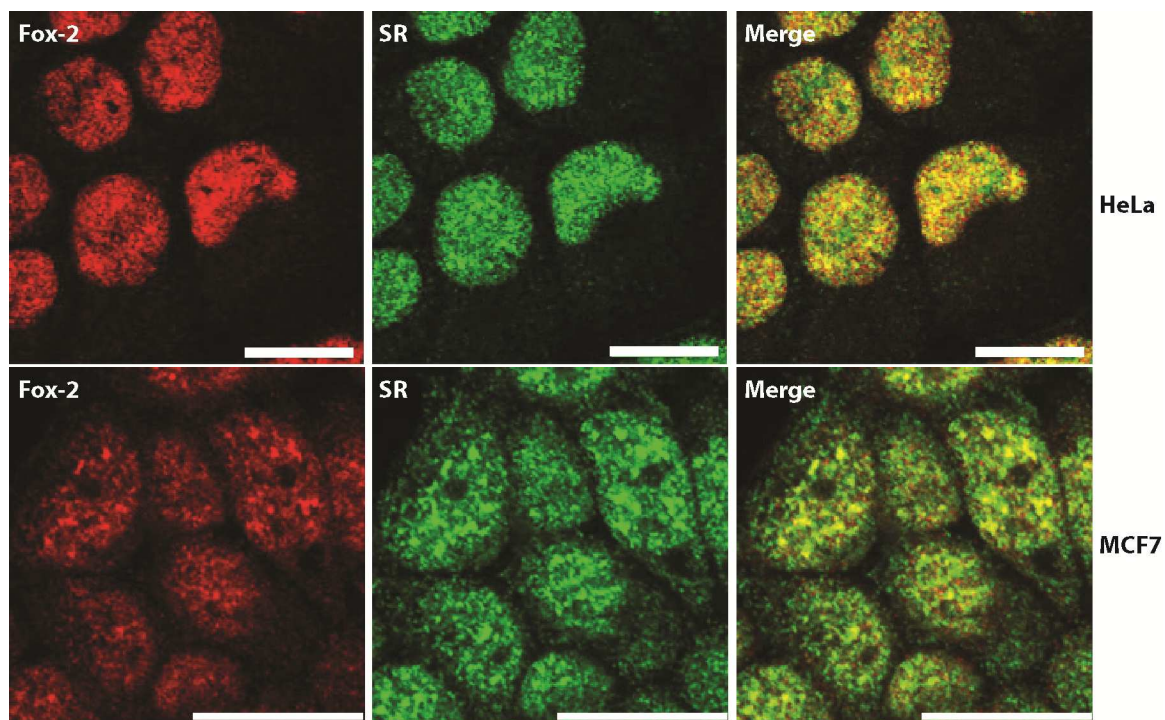


**Abbildung 6: Lokalisation von Fox-2 in humanen Zelllinien.** HeLa- (A) und MCF7-Zellen (B) wurden in 24-Kammerplatten auf Deckgläschen ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Visualisierung des Fox-2-Proteins erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen Fox-2 (obere Reihe: Kaninchen- $\alpha$ -RBM9; Bethyl Lab. und untere Reihe: Maus- $\alpha$ -RBM9; Abnova). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst. Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich wird, weist Fox-2, sowohl in HeLa-Zellen (A) als auch in MCF7-Zellen (B), eine überwiegend nukleäre Lokalisation auf. Dabei fällt auf, dass neben der gleichmäßigen Verteilung im Nukleus, Akkumulierungen von Fox-2 in nukleären Strukturen zu beobachten waren, welche mit einem Fox-2-Antikörper von Abnova (untere Reihe) deutlicher zu

detektieren waren als mit dem eingesetzten Antikörper von Bethyl Lab. (obere Reihe). Zudem konnte in beiden Zelllinien auch eine leichte cytoplasmatische Lokalisation von Fox-2 detektiert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in einem nächsten Schritt die nukleären Fox-2-Strukturen näher charakterisiert. Da die Fox-Proteine bekannte Regulatoren des prä-mRNA-Spleißens sind [167], wurde untersucht, ob es sich bei diesen Strukturen um nukleäre „Speckles“ handelt, die in den Interchromatinregionen des Nukleoplasmas vorliegen [172]. Integraler Bestandteil dieser Strukturen sind Regulatoren des Spleißens, die zu der Familie der SR-Proteine gezählt werden [173]. Für diese Analysen wurden HeLa- und MCF7-Zellen ausgesät und, wie in Material und Methoden beschrieben, für die mikroskopische Analyse vorbereitet. Als Marker für die nukleären „Speckles“ wurde ein Antikörper verwendet, der gegen einige der SR-Proteine (SRP75, SRP55, SRP40, SRP20) gerichtet ist.



**Abbildung 7: Lokalisation von Fox-2 und SR-Proteinen.** HeLa- und MCF7-Zellen wurden in 24-Kammerplatten auf Deckgläschen ausgesät und für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Fox-2 (Kaninchen- $\alpha$ -RBM9; Bethyl Lab.) und den SR-Proteinen (Maus- $\alpha$ -SR; Zymed). Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, weisen die SR-Proteine in beiden verwendeten Zelllinien die beschriebene nukleäre Lokalisation mit Akkumulierungen in sogenannten „Speckles“ auf [174]. Anhand der Überlagerungsdarstellung in Abbildung 7 wird deutlich, dass Fox-2-positive Strukturen überwiegend mit den nukleären „Speckles“ kolokalisieren. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Fox-2 ein Bestandteil von nukleären „Speckles“ ist.

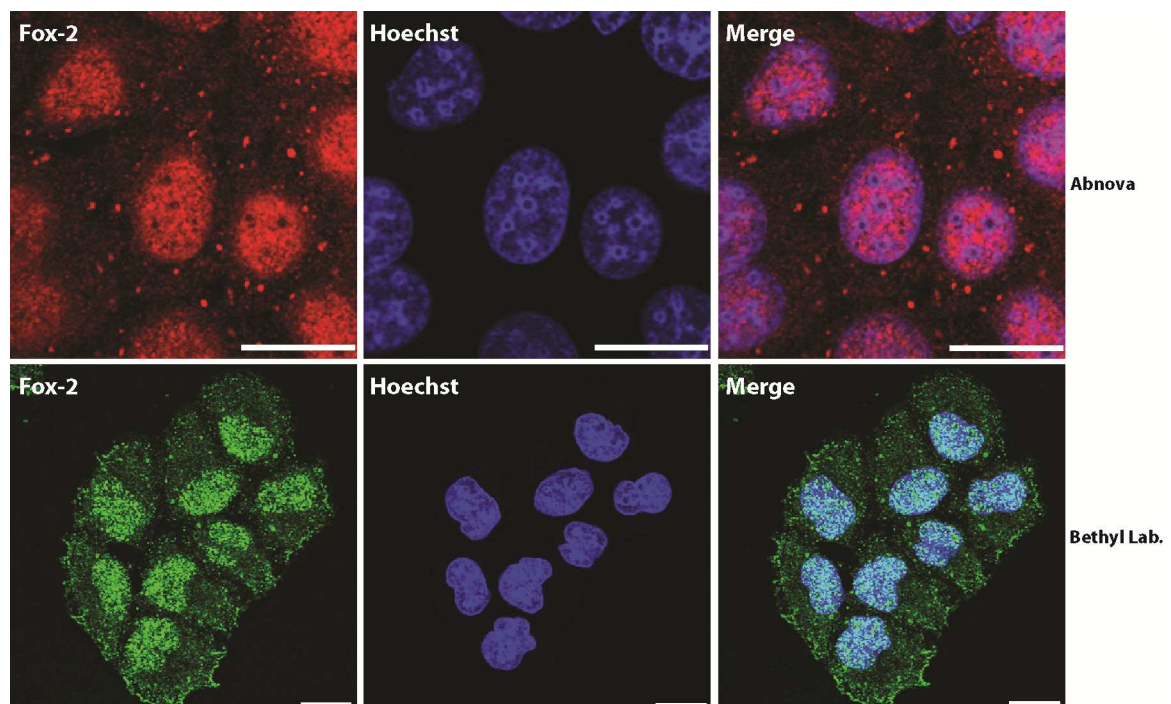


#### 4.1.2 Zelluläre Fox-2-Lokalisation unter oxidativen Stress-Bedingungen

Interessanterweise konnte für einige Spleiß-Regulatoren der SR-Familie nachgewiesen werden, dass sie unter Stress-Bedingungen in cytoplasmatischen „Stress Granules“ vorliegen [175-177]. Diese zellulären Strukturen entstehen unter Stress-Bedingungen, wie z.B. oxidativem Stress, UV-Stress oder osmotischem Stress. Dabei wird angenommen, dass translationell reprimierte mRNP-Komplexe in den „Stress Granules“ gespeichert werden. Interessanterweise sind viele RNA-Bindeproteine, die wie Fox-2 eine RRM-Domäne besitzen, ebenfalls Bestandteile der „Stress Granules“. Dazu gehören die essentiellen „Stress-Granule“-Markerproteine PABP, TIA-1 und TIAR [139]. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob oxidativer Stress einen Einfluss auf die subzelluläre Fox-2-Lokalisation ausübt.

Für diese Analysen wurden HeLa-Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben, ausgesät und kultiviert. Die Zellen wurden, durch die Behandlung mit 0,5 mM Natrium-meta-Arsenit, einem oxidativen Stress ausgesetzt. Im Anschluss wurden die Proben für die mikroskopische Analyse aufgearbeitet.

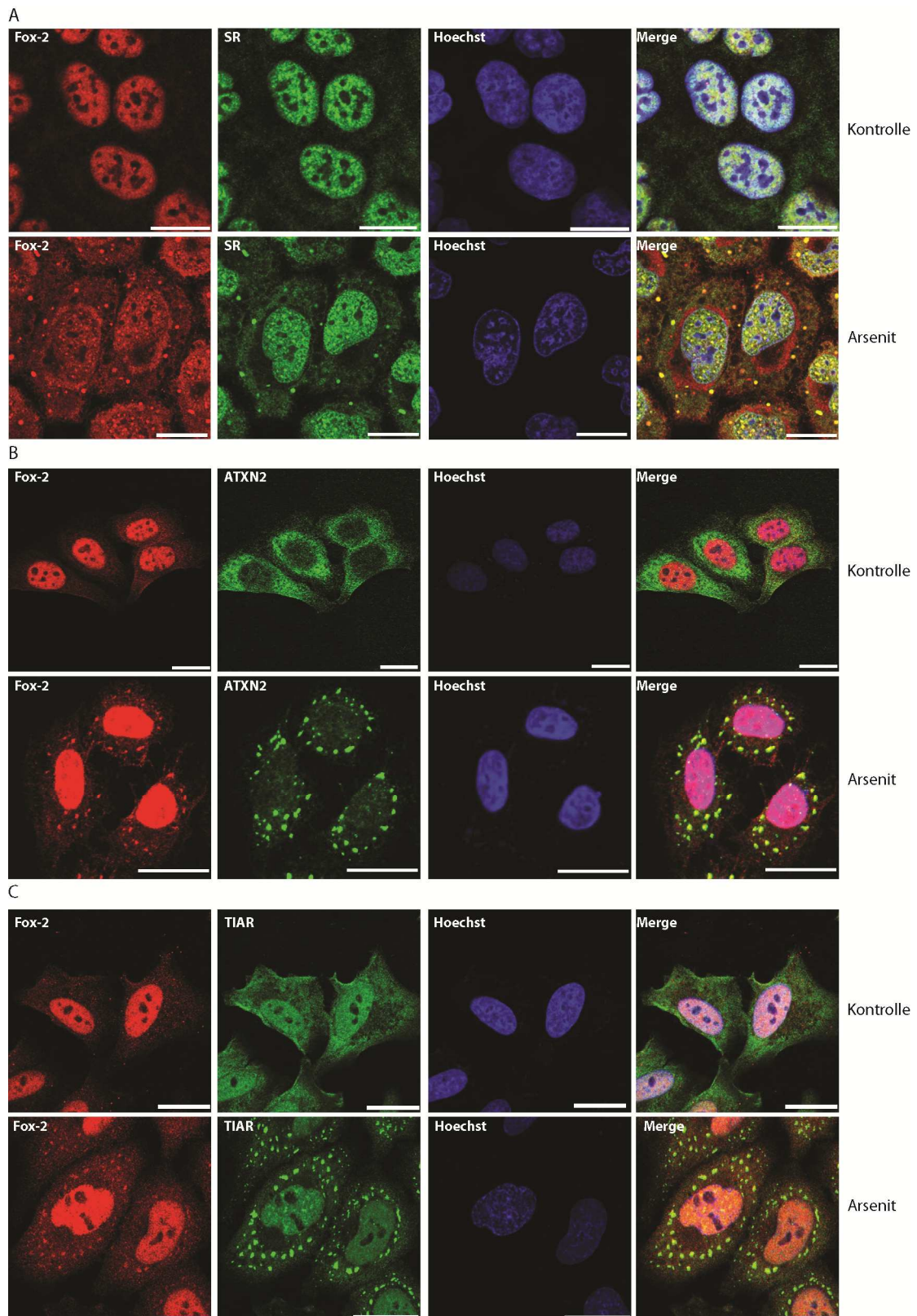
Die mikroskopische Analyse ergab, dass Fox-2 in Arsenit-behandelten HeLa-Zellen in cytoplasmatischen Strukturen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 8). Dabei waren diese unter Stress entstehenden Strukturen mit beiden Fox-2-Antikörpern nachzuweisen.



**Abbildung 8: Lokalisation von Fox-2 unter oxidativen Stress-Bedingungen.** HeLa-Zellen wurden in 24-Kammerplatten ausgesät und für weitere 24 Stunden kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Induktion von oxidativen Stress durch eine Behandlung der Zellen mit 0,5 mM Natrium-meta-Arsenit für eine Stunde. Die Färbung von Fox-2 erfolgte mit den Antikörpern Kaninchen- $\alpha$ -RBM9; Bethyl Lab. (obere Reihe) und Maus- $\alpha$ -RBM9; Abnova (untere Reihe). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst. Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

Um in einem nächsten Schritt zu überprüfen, ob es sich bei den Fox-2-Strukturen tatsächlich um „Stress Granules“ handelt, wurde überprüft, ob die, unter Stress entstehenden Fox-2-Foci, positiv für „Stress Granule“-Markerproteine sind. Zur Induktion von oxidativem Stress wurden HeLa-Zellen mit Natrium-meta-Arsenit behandelt und im Anschluss für die mikroskopische Analyse vorbereitet. Als Markerproteine für die „Stress-Granules“ dienten die SR-Proteine, Ataxin-2 und TIAR.

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich wird, wiesen nicht-behandelte Zellen eine vorwiegend nukleäre Lokalisation der SR-Proteine (A) auf, wohingegen Ataxin-2 (B) hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert war. TIAR (C) ist unter diesen Bedingungen in beiden Kompartimenten nachzuweisen. Arsenit-behandelte HeLa-Zellen wiesen cytoplasmatische Strukturen auf, in denen die „Stress Granule“-Komponenten SR (A), Ataxin-2 (B) und TIAR (C) akkumulierten. Wie aus den entsprechenden Überlagerungsdarstellungen ersichtlich wird, kolokalisieren die Fox-2-Foci mit diesen Strukturen. Da diese Proteine essentielle Komponenten der „Stress Granules“ sind, kann daraus geschlossen werden, dass es sich bei den Fox-2-Foci ebenfalls um „Stress Granules“.



**Abbildung 9: Fox-2 ist Bestandteil von „Stress Granules“ in HeLa-Zellen.** (A-C) HeLa-Zellen wurden in 24-Kammerplatten ausgesät und für weitere 24 Stunden kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Induktion von oxidativem Stress durch eine Behandlung der Zellen mit 0,5 mM Natrium-meta-Arsenit für eine Stunde (untere Reihe). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (obere Reihe). Die Färbung der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Fox-2 (Kaninchen- $\alpha$ -RBM9; Bethyl Lab.) und (A) SR-Proteine (Maus-  $\alpha$ -SR; Zymed), (B) Ataxin-2 (Maus- $\alpha$ -ATXN2; BD-Bioscience) oder (C) TIAR (Maus- $\alpha$ -TIAR, BD-Bioscience). Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

Zur weiteren Validierung von Fox-2 als „Stress Granule“-Komponente wurden diese Experimente ebenfalls in MCF7- und DU145-Zellen durchgeführt. Wie in Abbildung 10 ersichtlich wird, wiesen Arsenit-behandelte MCF7- und DU145-Zellen ebenfalls Fox-2-positive cytoplasmatische Foci auf. Anhand der Überlagerungsdarstellung wird deutlich, dass diese mit Ataxin-2 kolokalisieren (Abbildung 10). Daher konnte Fox-2 auch in diesen humanen Zelllinien als eine Komponente der „Stress Granules“ identifiziert werden.

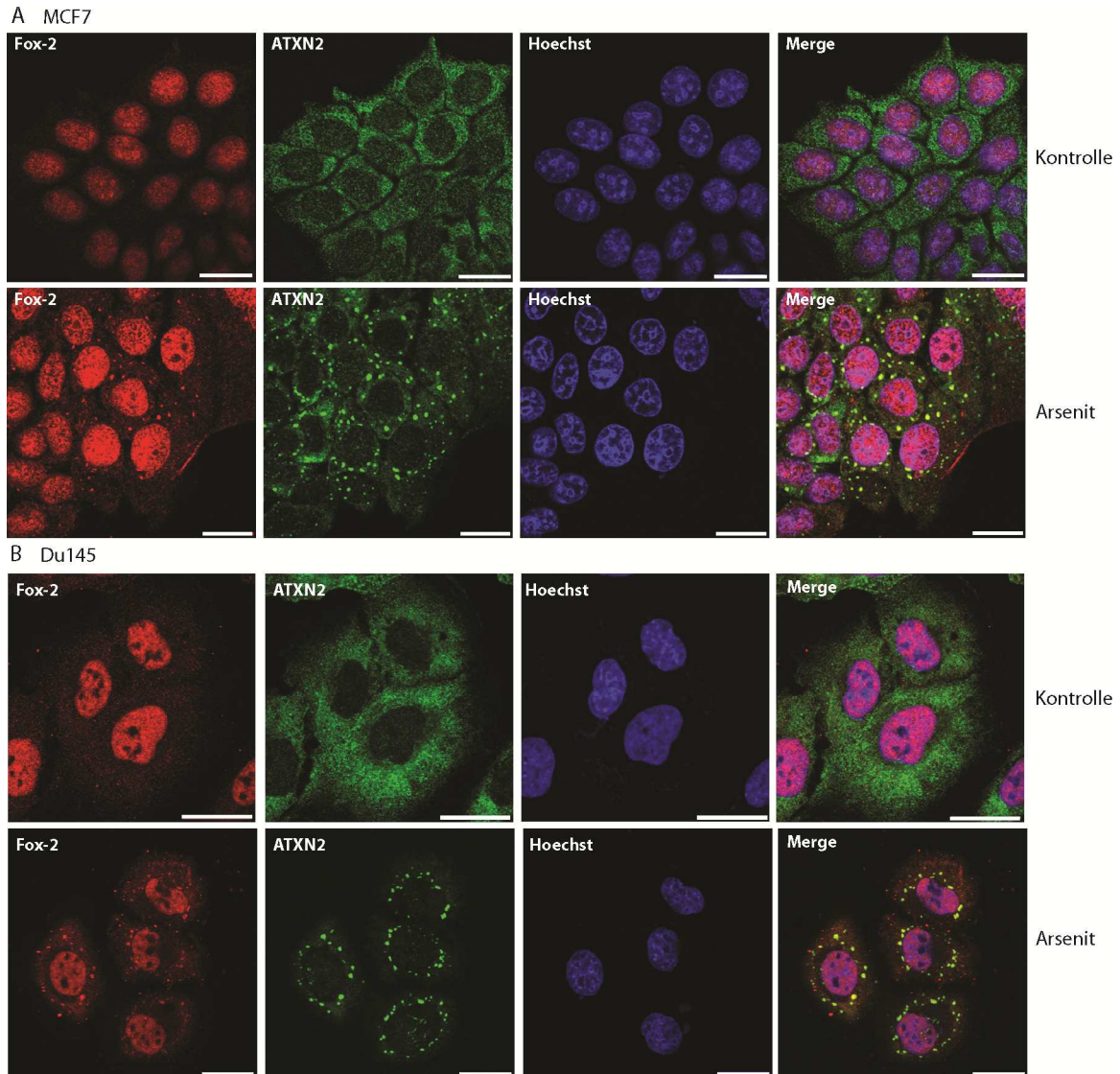


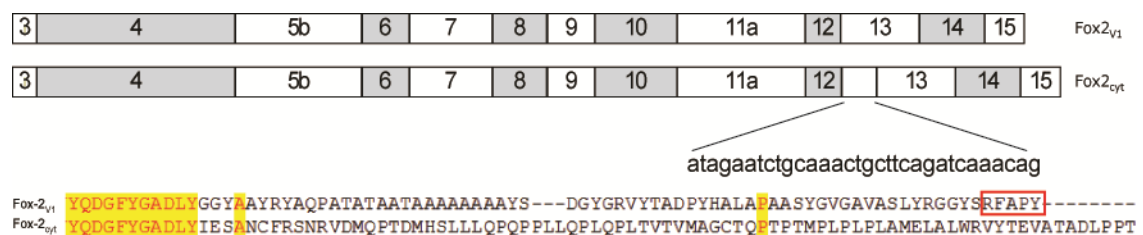
Abbildung 10: Fox-2 ist Bestandteil von „Stress Granules“ in humanen Zelllinien. (A) MCF7- und (B) DU145-Zellen wurden in 24-Kammerplatten ausgesät und für weitere 24 Stunden kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Induktion von oxidativem Stress, durch eine Behandlung der Zellen mit 0,5 mM Natrium-meta-Arsenit für eine Stunde (untere Reihe). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (obere Reihe). Die Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Fox-2 (Kaninchen- $\alpha$ -RBM9; Bethyl Lab.) und Ataxin-2 (Maus- $\alpha$ -ATXN2; BD-Bioscience) gefärbt und die Zellkerne mit Hoechst. Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

### 4.1.3 Untersuchungen von nukleären und cytoplasmatischen Fox-2-Varianten unter Stress-Bedingungen

Wie bereits erwähnt weisen die Fox-Proteine unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen auf [167]. Innerhalb dieser Arbeit konnte in unterschiedlichen Zelllinien beobachtet werden, dass Fox-2 vorwiegend nukleär lokalisiert ist, aber auch im Cytoplasma und unter Stress-Bedingungen in den cytoplasmatischen „Stress-Granules“ vorliegt. Daher stellte sich die Frage, ob sowohl cytoplasmatische, als auch nukleäre Fox-2-Varianten Komponenten von „Stress Granules“ sind.

#### 4.1.3.1 Klonierung und Expressionanalysen der Fox-2-Varianten Fox-2Cyt und Fox-2VI

Dafür konnte auf eine neue Fox-2-Variante zurückgegriffen werden, die innerhalb der Diplomarbeit „Untersuchungen zur zellulären Funktion des Proteins Ataxin-2“ von Melanie Isau in der Arbeitsgruppe kloniert wurde. Erste Untersuchungen zeigten, dass diese cytoplasmatisch lokalisiert war. Von daher wurde diese Variante in der vorliegenden Arbeit Fox-2<sub>Cyt</sub> genannt. Diese neue Variante konnte ebenfalls innerhalb dieser Arbeit, unter Verwendung derselben Oligonukleotide (Fox-2-sense-Sal1 und Fox-2-as-Not1) aus HEK293T-cDNA amplifiziert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um eine neue Spleißvariante von Fox-2 handelt.



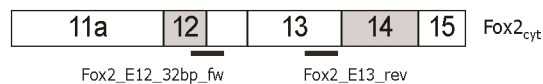
**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Exonstruktur der Fox-2-Variante 1 und der isolierten Spleiß-Variante Fox-2<sub>Cyt</sub>.** Insertionsposition und Sequenz des Exons ENSE00001553845 ist dargestellt (obere Reihe). Alignment der C-terminalen Regionen von Fox-2<sub>v1</sub> und Fox-2<sub>Cyt</sub>. Das rote Rechteck kennzeichnet die Fox-typische RF(A/T)PY-NLS. Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt (untere Reihe).

Die Nukleotidsequenz dieser Variante ist in ihrer Exonstruktur nicht in der Ensembl-Datenbank annotiert, entspricht aber der Exonstruktur der annotierten Fox-2-Variante 1 (Transkript-Id: ENST00000449924) (Abbildung 11). Allerdings befindet sich zwischen Exon 12 (ENSE00001578447) und Exon 13 (ENSE00001611944) eine Integration von 32 Nukleotiden (Abbildung 11, obere Reihe). Diese 32 Nukleotide entsprechen dem Ensembl-Exon ENSE00001553845, welches in anderen annotierten Fox-2-Varianten (Transkript-Ids: ENST00000359369 und ENST00000338644) ebenfalls zu finden ist. Interessanterweise führt die 32nt-Insertion in den entsprechenden Transkripten zu einer Leserasterverschiebung, die in einem alternativen C-Terminus resultiert. Diese differente C-terminale Region ist in Abbildung 11 für Fox-2<sub>Cyt</sub> schematisch dargestellt und für andere Fox-2-Varianten (z.B. Variante 4 Transkript-Id:

ENST00000414461) bereits publiziert worden (Ensembl release 63 - Juni 2011). Wie aus Abbildung 11 ersichtlich wird, besitzt dieser alternative C-Terminus von Fox-2<sub>Cyt</sub> das Fox-familienpezifische hydrophobe nukleäre Lokalisationssignal RF(A/T)PY-Motiv nicht [167].

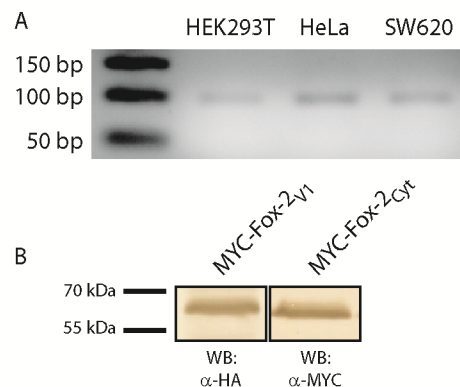
Für die Analyse einer nukleären Form wurde innerhalb dieser Arbeit, wie in Material und Methoden beschrieben, die annotierte Fox-2 Variante 1 (Transkript-Id: ENST00000449924) kloniert.

In einem ersten Schritt wurde untersucht, inwiefern Fox-2-Transkripte in humanen Zellen nachzuweisen sind, die diese Exonstruktur von Fox-2<sub>Cyt</sub> aufweisen. Dazu wurde Gesamt-RNA aus HEK293T-, HeLa- und SW620-Zellen isoliert und, wie in Material und Methoden beschrieben, cDNA synthetisiert. Im Anschluss wurden PCR-Analysen mit den Oligonukleotiden Fox-2\_E12\_32bp\_fw und Fox-2\_E13\_rev durchgeführt, welche an der Exon-Exon-Verbindung zwischen Exon 12 und Exon ENSE00001553845 bzw. im Exon 13 binden, so dass Fox-2-Transkripte nachgewiesen werden konnten, die zwischen Exon 12 und 13 das Ensembl-Exon ENSE00001553845 besitzen (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Teils der Exonstruktur von Fox-2<sub>Cyt</sub>.** Die Bindestellen der Oligonukleotide Fox-2\_E12\_32bp\_fw und Fox-2\_E13\_rev sind durch schwarze Striche dargestellt.

Wie in Abbildung 13 A zu sehen ist, konnte in den untersuchten Zelllinien ein Amplifikat der erwarteten Größe (115 bp) nachgewiesen werden. Das Amplifikat, generiert aus HEK293T-cDNA, wurde anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen. Diese ergab die erwartete Sequenz, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in den untersuchten Zelllinien Fox-2-Transkripte existieren, in denen Exon ENSE00001553845 zwischen Exon 12 und 13 integriert ist.

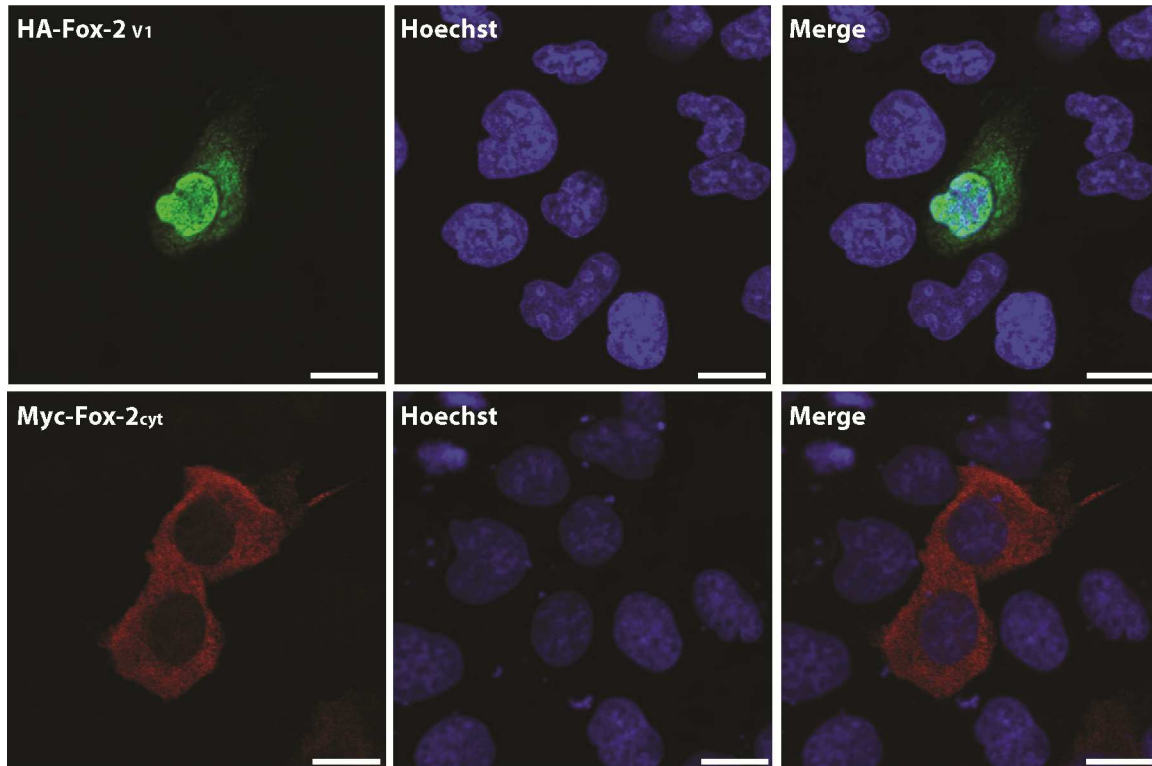


**Abbildung 13: Nachweis der Expression der Fox-2-Varianten.** (A) Auswertung der PCR, durchgeführt mit den Oligonukleotiden Fox-2\_E12\_32bp\_fw und Fox-2\_E13 rev. Als Template diente cDNA von HEK293T-, HeLa- und SW620-Zellen. Die Auswertung erfolgte nicht-quantitativ über ein 3% Agarosegel. (B) HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV-HA-Fox-2<sub>v1</sub> und pCMV-MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub> transfiziert und nach 24 Stunden Expression lysiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem spezifischen α-HA- bzw. α-MYC-Antikörper (Maus-α-HA; Roche bzw. Maus-α-MYC, Millipore).

In einem zweiten Schritt wurde die Expression der Fusionsproteine HA-Fox-2<sub>v1</sub> und MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub> in HEK293T-Zellen überprüft. Dafür wurden diese ausgesät und mit den Plasmiden pCMV-HA-Fox-2<sub>v1</sub> bzw. pCMV-MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub> transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert, die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Wie aus Abbildung 13 B ersichtlich wird, konnten die Fox-2-Varianten mit Hilfe der spezifischen Antikörper gegen den HA- bzw. MYC-tag im Western-Blot nachgewiesen werden, so dass die Expression der entsprechenden Fusionsproteine nachgewiesen werden konnte.

Im nächsten Schritt wurde ebenfalls die zelluläre Lokalisation der beiden Fox-2-Varianten, Fox-2<sub>v1</sub> und Fox-2<sub>Cyt</sub>, untersucht. Für diese Analysen wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsplasmiden pCMV-HA-Fox-2<sub>v1</sub> und pCMV-MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub> transfiziert und im Anschluss für die mikroskopische Analyse, wie in Material und Methoden beschrieben, vorbereitet. Der immunologische Nachweis der Fusionsproteine HA-Fox-2<sub>v1</sub> und MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub> erfolgte mit spezifischen  $\alpha$ -HA- bzw.  $\alpha$ -MYC-Antikörpern.

Wie anhand von Abbildung 14 (obere Reihe) zu erkennen ist, wurde in HeLa-Zellen, die Fox-2<sub>v1</sub> exprimierten, eine überwiegend nukleäre Verteilung des überexprimierten Proteins detektiert. Zellen, die Fox-2<sub>Cyt</sub> exprimierten, wiesen hingegen, konsistent mit dem fehlenden nukleären Lokalisationssignal, eine überwiegend cytoplasmatische Expression des Proteins auf (Abbildung 14; untere Reihe).



**Abbildung 14: Zelluläre Lokalisation der Proteine HA-Fox-2<sub>v1</sub> und MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub>.** HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit den Plasmiden pCMV-HA-Fox-2<sub>v1</sub> bzw. pCMV-MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub> transfiziert. Die Zellen wurden für 16-24 Stunden kultiviert und anschließend für die mikroskopische Analyse vorbereitet. Die Expression der Fox-2-Varianten wurde mit  $\alpha$ -HA-Fluorescein (Roche) bzw. einem  $\alpha$ -MYC-Antikörper (Maus- $\alpha$ -MYC; Millipore) nachgewiesen. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst. Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

#### 4.1.3.2 Zelluläre Lokalisation der Fox-2-Varianten unter oxidativen Stress-Bedingungen

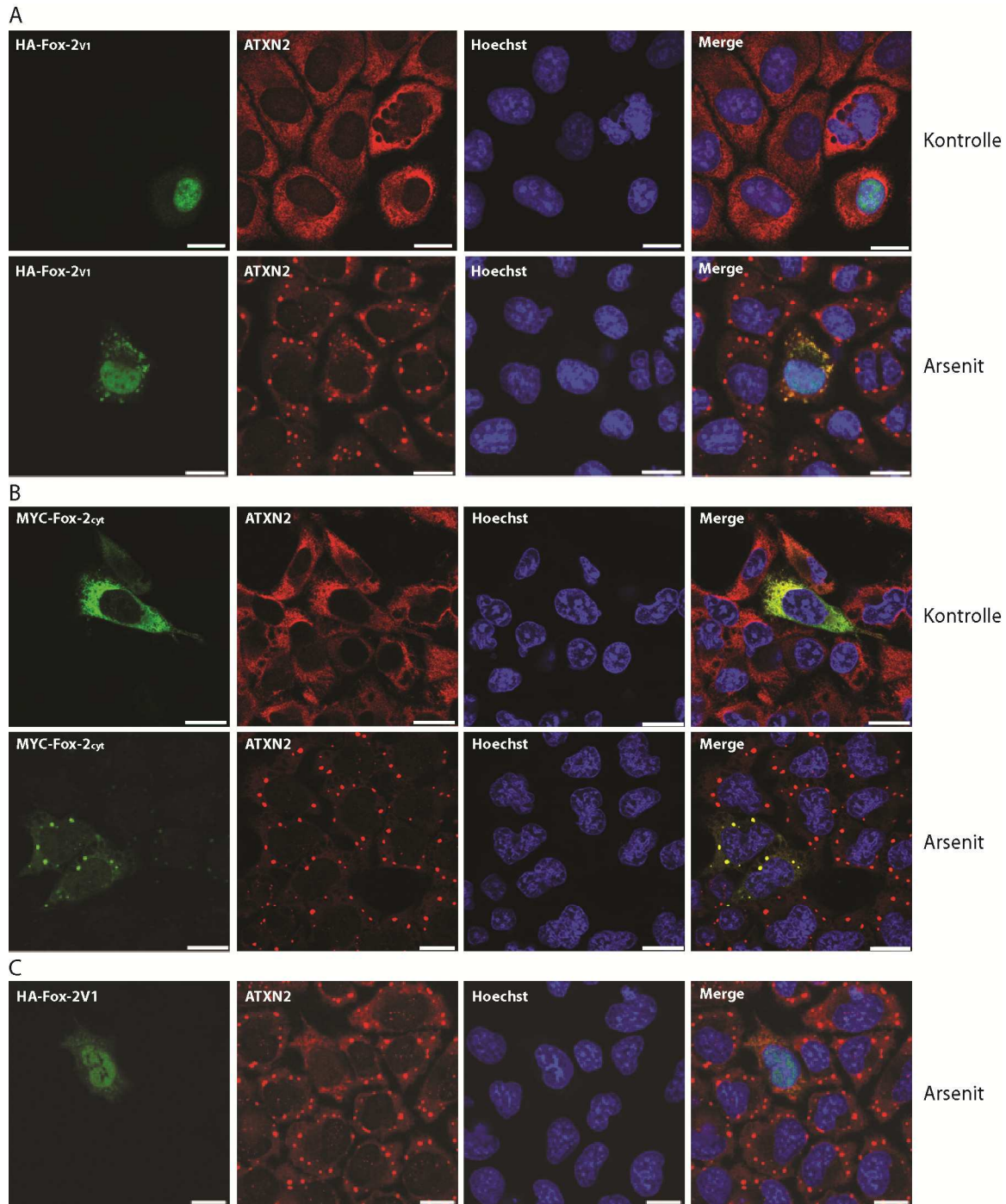
Wie bereits erwähnt, konnte in den vorangegangenen Analysen gezeigt werden, dass Fox-2 ein Bestandteil der cytoplasmatischen „Stress Granules“ ist. Im Folgenden wurde daher mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht, ob cytoplasmatische oder nukleäre Fox-2-Varianten ihre subzelluläre Lokalisation unter Stress-Bedingungen ändern.

Für diese Analysen wurden HeLa-Zellen mit den Plasmiden pCMV-HA-Fox-2<sub>v1</sub> und pCMV-MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub> transfiziert und die entsprechenden Zellen oxidativem Stress ausgesetzt. Als Markerprotein für die „Stress Granules“ wurde Ataxin-2 verwendet.



Wie anhand der Abbildung 15 ersichtlich wird, führte die Expression der Fox-2-Varianten, Fox-2<sub>v1</sub> (A) und Fox-2<sub>Cyt</sub> (B), unter Normal-Bedingungen zu der erwarteten Lokalisation im Nukleus bzw. Cytoplasma der Zellen. Ataxin-2 wies in diesen Zellen eine vorwiegend cytoplasmatische Lokalisation auf. Die Behandlung der HeLa-Zellen mit Natriummeta-Arsenit führte bei beiden Fox-2-Varianten zu einer Lokalisierung in cytoplasmatischen granulären Strukturen. Da diese mit den ATXN2-positiven „Stress Granules“ kolokalisierten, kann davon ausgegangen werden, dass beide Fox-2-Varianten Bestandteile der „Stress Granules“ sind (Abbildung 15 A-B; untere Reihen). Dieses Ergebnis ist besonders in der Hinsicht interessant, dass auch die überwiegend nukleäre Variante 1 von Fox-2 offensichtlich unter oxidativen Stress-Bedingungen in den cytoplasmatischen „Stress Granules“ vorliegt. Bei diesen Analysen fiel auf, dass bei einer Überexpression von Fox-2<sub>v1</sub> die Form, Größe und Anzahl der „Stress Granules“ verändert aussah (Abbildung 15 A, untere Reihe). Ein großer Teil der Zellen, die Variante 1 überexprimierten, wiesen zudem gar keine „Stress Granules“ mehr auf, wie exemplarisch in Abbildung 15 C gezeigt ist. Damit könnte eine erhöhte Konzentration an nukleärem Fox-2 mit der Bildung der „Stress Granules“ interferieren.

Somit sind beide Fox-2-Varianten Komponenten der „Stress Granules“, wobei eine Überexpression der nukleären Variante aber offensichtlich zu einer gestörten „Stress Granule“-Bildung führt.

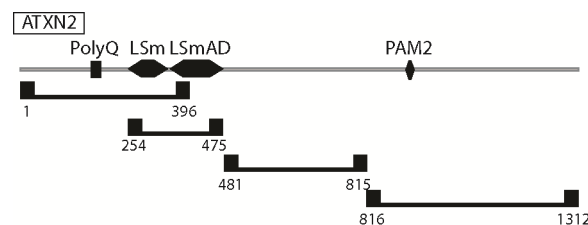


**Abbildung 15: Zelluläre Lokalisation von Fox-2<sub>v1</sub> und Fox-2<sub>cyt</sub> in „Stress Granules“.** HeLa-Zellen wurden in 24-Kammerplatten ausgesät und mit (A) pCMV-HA-Fox-2<sub>v1</sub>, (B) pCMV-MYC-Fox-2<sub>cyt</sub> und (C) pCMV-HA-Fox-2<sub>v1</sub> transfiziert. Es erfolgte eine Kultivierung der Zellen für weitere 24 h und die Induktion von oxidativem Stress durch Behandlung der Zellen mit 0,5 mM Natrium-meta-Arsenit für eine Stunde (untere Reihe). Als Kontrolle dienten Zellen, die keinem oxidativen Stress ausgesetzt waren (obere Reihe). Die Expression der Fox-2-Varianten wurden mit  $\alpha$ -HA-Fluorescein (Roche) bzw. einem  $\alpha$ -MYC-Antikörper (Maus- $\alpha$ -MYC; Millipore) nachgewiesen. Endogenes Ataxin-2 wurde mittels eines spezifischen Antikörpers (Kaninchen- $\alpha$ -ATXN2; Sigma) nachgewiesen. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst. Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

## 4.2 Untersuchungen zur Interaktion von Fox-2 und Ataxin-2

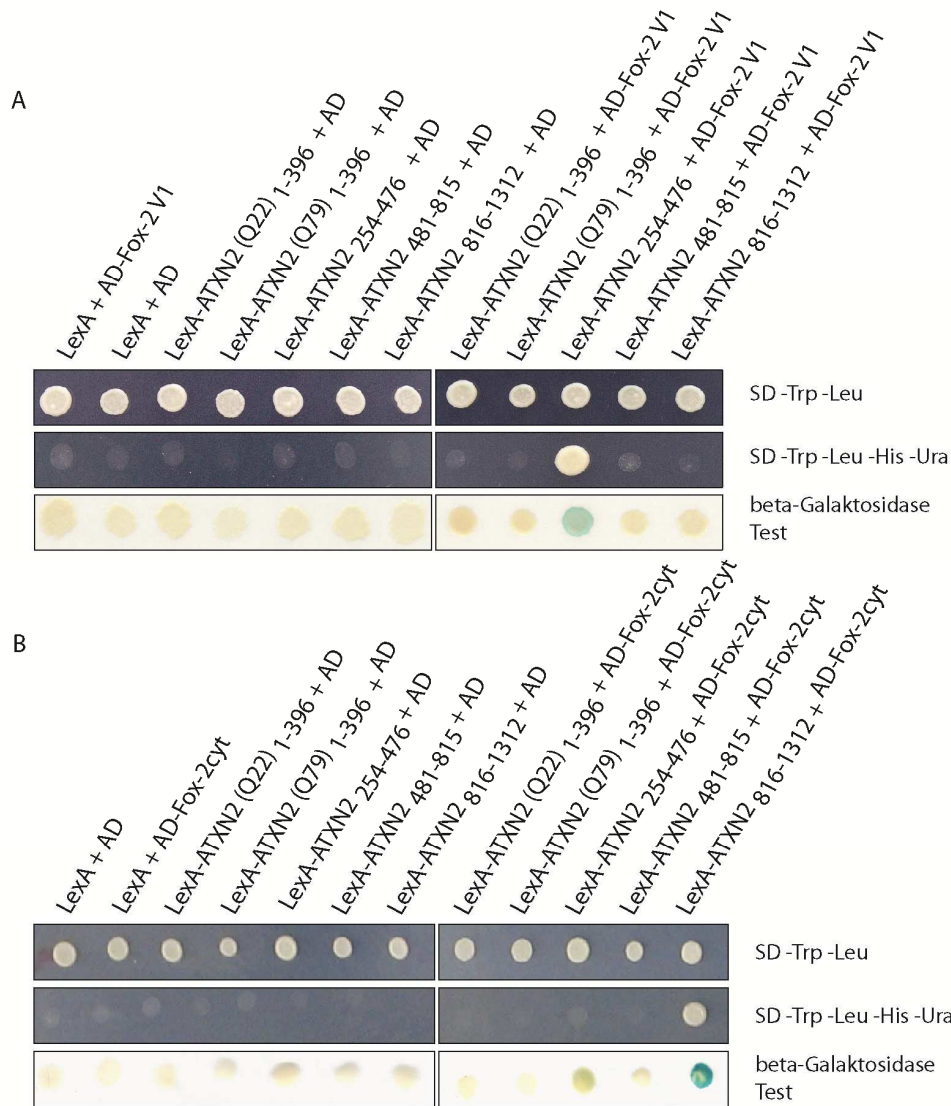
Wie schon erwähnt, wiesen erste Ergebnisse der Arbeitsgruppe darauf hin, dass Fox-2 möglicherweise mit Ataxin-2, dem krankheitsverursachenden Protein der spinocerebellären Ataxie Typ 2, interagieren könnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Fox-2, wie auch Ataxin-2, eine Komponente der „Stress Granules“ ist. Aus diesem Grund sollte nach der zellulären Charakterisierung von Fox-2 im Folgenden diese mögliche Interaktion eingehender untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Yeast-Two-Hybrid-Analysen mit Fox-2 und Ataxin-2 zum Nachweis einer direkten Interaktion durchgeführt. In der Y2H-Analyse wurde sowohl die nukleäre als auch die cytoplasmatische Isoform von Fox-2 verwendet. Für Ataxin-2 wurden dafür unterschiedliche Bereiche des Proteins eingesetzt, welche das gesamte Protein umfassen und in Abbildung 16 dargestellt sind.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Ataxin-2** und der verwendeten Proteinbereiche im Y2H. Die Polyglutamin-Domäne von Ataxin-2 befindet sich in der N-terminalen Region, gefolgt von der LSM- und der LSM-assoziierten Domäne. C-terminal befindet sich das PAM2-Motiv.

Zunächst wurden Y2H-Analysen mit den verwendeten Fusionsproteinen durchgeführt, um eine mögliche Autoaktivität dieser Proteine auszuschließen. Dafür wurden die Konstrukte pBTM117c-ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub>, pBTM117c-ATXN2(Q79)<sub>1-396</sub>, pBTM117c-ATXN2<sub>254-475</sub>, pBTM117c-ATXN2<sub>481-815</sub> und pBTM116-ATXN2<sub>816-1312</sub>, bzw. pACT4-1b-Fox-2<sub>V1</sub> und pACT4-1b-Fox-2<sub>Cyt</sub> mit den jeweiligen Vektoren pACT4-1b bzw. pBTM117c in den Hefestamm L40ccua kotransformiert.



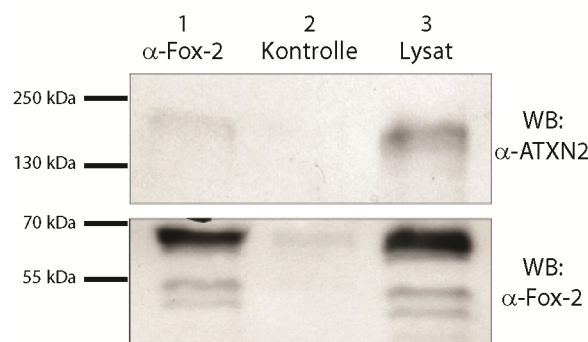
**Abbildung 17: Ataxin-2 interagiert mit den Fox-2-Varianten Fox-2<sub>V1</sub> (A) und Fox-2<sub>Cyt</sub> (B)** Der Hefestamm L40ccua wurde mit den entsprechenden Bait- und Prey-Plasmiden kotransformiert. Die Transformanten wurden auf SDII- und SDIV-Medium sowie auf eine Nylonmembran auf SDII-Medium übertragen. Die Überprüfung der Aktivität der Reportergene erfolgte über die Analyse des Wachstums auf SDIV-Medium sowie einem  $\beta$ -Galaktosidase-Test.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich wird, waren die Transformanten die, die Fusionsproteine LexA-ATXN2 und die Aktivierungsdomäne sowie LexA und die Fusionsproteine AD-Fox-2<sub>V1</sub> bzw. Fox-2<sub>Cyt</sub> koexprimierten, nicht in der Lage auf Selektionsmedium zu wachsen und wiesen auch keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf. Da keine Reportergenaktivität nachgewiesen werden konnte, sind die verwendeten Fusionsproteine nicht autoaktivierend und konnten somit für die Interaktionsanalysen verwendet werden.

Daraufhin wurde der Hefestamm L40ccua mit den entsprechenden ATXN2-Bait-Plasmiden und den Fox-2-Prey-Plasmiden kotransformiert. Die Transformanten wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf Selektionsmedium und eine Nylonmembran übertragen, um die Reportergenaktivität analysieren zu können.

Wie anhand der Abbildung 17 ersichtlich wird, zeigten Hefe-Transformanten, die die Fusionsproteine LexA-ATXN2<sub>254-476</sub> und AD-Fox-2<sub>V1</sub> (A), bzw. LexA-ATXN2<sub>816-1312</sub> und AD-Fox-2<sub>Cyt</sub> (B) koexprimierten, ein Wachstum auf SDIV-Medium, was auf eine Reporterogenaktivität hinweist. Zusätzlich dazu zeigten die entsprechenden Hefen im  $\beta$ -Galaktosidase-Test eine *LacZ*-Reporterogenaktivität, da eine Blaufärbung zu beobachten war. Somit konnte eine Interaktion von Fox-2<sub>V1</sub> bzw. Fox-2<sub>Cyt</sub> und Ataxin-2 im Yeast-Two-Hybrid-System nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass die Fox-2-Varianten offenbar mit unterschiedlichen Domänen von Ataxin-2 interagieren. Die cytoplasmatische Variante Fox-2<sub>Cyt</sub> zeigte eine Interaktion mit der C-terminalen Region, wohingegen die nukleäre Variante 1 mit der RNA-Bindedomäne, der LSm/LSm-assoziierten Domäne, von Ataxin-2 interagiert.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Interaktion zwischen Ataxin-2 und Fox-2 auch in humanen Zellen nachzuweisen ist. Für die entsprechende Koimmunopräzipitations-Analyse wurden HeLa-Zellen kultiviert. Nach erfolgter Lyse wurde endogenes Fox-2, mittels eines spezifischen  $\alpha$ -Fox-2-Antikörpers, welcher verschiedene Protein-Varianten erkennt, präzipitiert. Die Proteine wurden im Anschluss über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, welche im Folgenden mit einem  $\alpha$ -ATXN2-Antikörper inkubiert wurde.



**Abbildung 18: Interaktion von Fox-2 und Ataxin-2 in humanen Zellen.** HeLa-Zellen wurden lysiert. 1 mg des Lysates wurde mit 2  $\mu$ l Kaninchen- $\alpha$ -RBM9-Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 15  $\mu$ l  $\alpha$ -Kaninchen-Dynabeads. Als Kontrolle diente eine Probe, der kein primärer Antikörper zugesetzt wurde. Der Nachweis von Ataxin-2 erfolgte mit einem spezifischen Antikörper (Maus- $\alpha$ -ATXN2; BD-Bioscience).

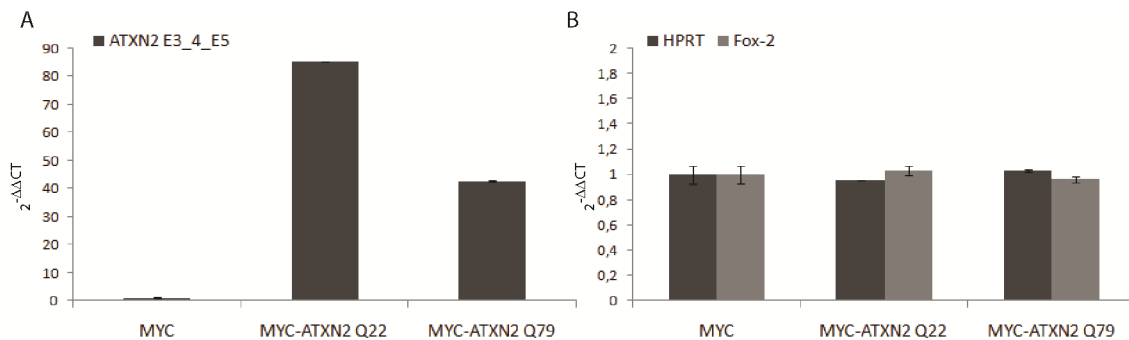
Wie anhand von Abbildung 18 ersichtlich wird, konnte endogenes Ataxin-2 mit einem Antikörper gegen Fox-2 präzipitiert werden (Spur 1). Im Kontrollansatz, dem kein Fox-2-Antikörper zugesetzt worden war, war kein Ataxin-2 nachzuweisen (Spur 2). Im eingesetzten Zelllysate konnten beide Proteine nachgewiesen werden (Spur 3). Somit konnte die Interaktion von Fox-2 und Ataxin-2 in auch HeLa-Zellen nachgewiesen werden.

### 4.3 Untersuchungen zum Einfluss erhöhter Ataxin-2-Konzentrationen auf Fox-2

Wie einleitend schon erwähnt konnte in SCA2-Patienten eine erhöhte Konzentration an Ataxin-2 in Hirnregionen detektiert werden [115, 117]. Ein weiterer Aspekt ist es, dass aus vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bekannt war, dass Ataxin-2 ebenfalls als transkriptioneller Aktivator fungieren kann [66]. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine erhöhte Expression von Ataxin-2 möglicherweise einen Einfluss auf die FOX-2-Genexpression oder die subzelluläre Lokalisation seines Interaktionspartners ausüben könnte.

#### 4.3.1 Einfluss einer erhöhten Ataxin-2-Konzentration auf die FOX-2-Genexpression

Um dies zu analysieren, wurden HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pCMV-MYC-ATXN2 Q22 bzw. pCMV-MYC-ATXN2 Q79 transfiziert und für weitere 48 Stunden kultiviert, um die Expression der Fusionsproteine zu ermöglichen. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, isoliert und die entsprechende cDNA synthetisiert. Mittels der Oligonukleotide ATXN2\_E3\_4\_fw und ATXN2\_E5\_rev wurde die Überexpression von Ataxin-2 in einer RT-qPCR validiert. Diese Oligonukleotide binden in der Region von Exon 3 bis 5 der ATXN2-prä-mRNA, die für die LSm-Domäne kodiert. Bisher sind noch keine alternativen Spleißvarianten von Ataxin-2 beschrieben, die diesen Bereich betreffen, so dass dieses Oligonukleotidpaar zur Quantifizierung der Genexpression verwendet wurde. Zur Quantifizierung der Fox-2-Expression wurden die Oligonukleotide Fox-2\_fw und Fox-2\_rev verwendet.



**Abbildung 19: Einfluss einer Ataxin-2-Überexpression auf die FOX-2-Genexpression.** HEK293T-Zellen wurden mit pCMV-MYC-ATXN2 Q22 bzw. pCMV-MYC-ATXN2 Q79 transfiziert und im Anschluss für 48 Stunden kultiviert. Als Kontrolle wurde eine Probe mit dem Plasmid pCMV-MYC transfiziert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und cDNA synthetisiert. Anschließend wurde mittels RT-qPCR die Expressionsrate der Gene FOX-2, HPRT und  $\beta$ -Aktin bestimmt. Für die RT-qPCR-Analysen wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit zwei biologischen Replikaten. Die Auswertung erfolgte mittels der  $\Delta\Delta CT$ -Methode, wobei auf B2M normalisiert wurde. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

Es zeigte sich, dass in ATXN2-überexprimierenden Zellen die ATXN2-Transkriptmenge 40-80-fach erhöht war, wobei die Expression des expandierten Proteins wesentlich schwächer ausfiel (Abbildung 19 A). Somit konnte die Überexpression von Ataxin-2 Q22 bzw. Ataxin-2

Q79 in beiden Fällen auf Transkript-Ebene nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 19 B dargestellt ist, verändert sich die Menge an Fox-2-Transkript im Vergleich zur Kontrolle nicht, wobei die hier verwendeten Oligonukleotide alle bisher bekannten Transkriptvarianten von Fox-2 detektieren. Innerhalb dieses Zellkulturmodells hatte die Überexpression von Ataxin-2 mit 22 bzw. 79 Glutaminen folglich keinen Einfluss auf die *FOX-2*-Genexpression.

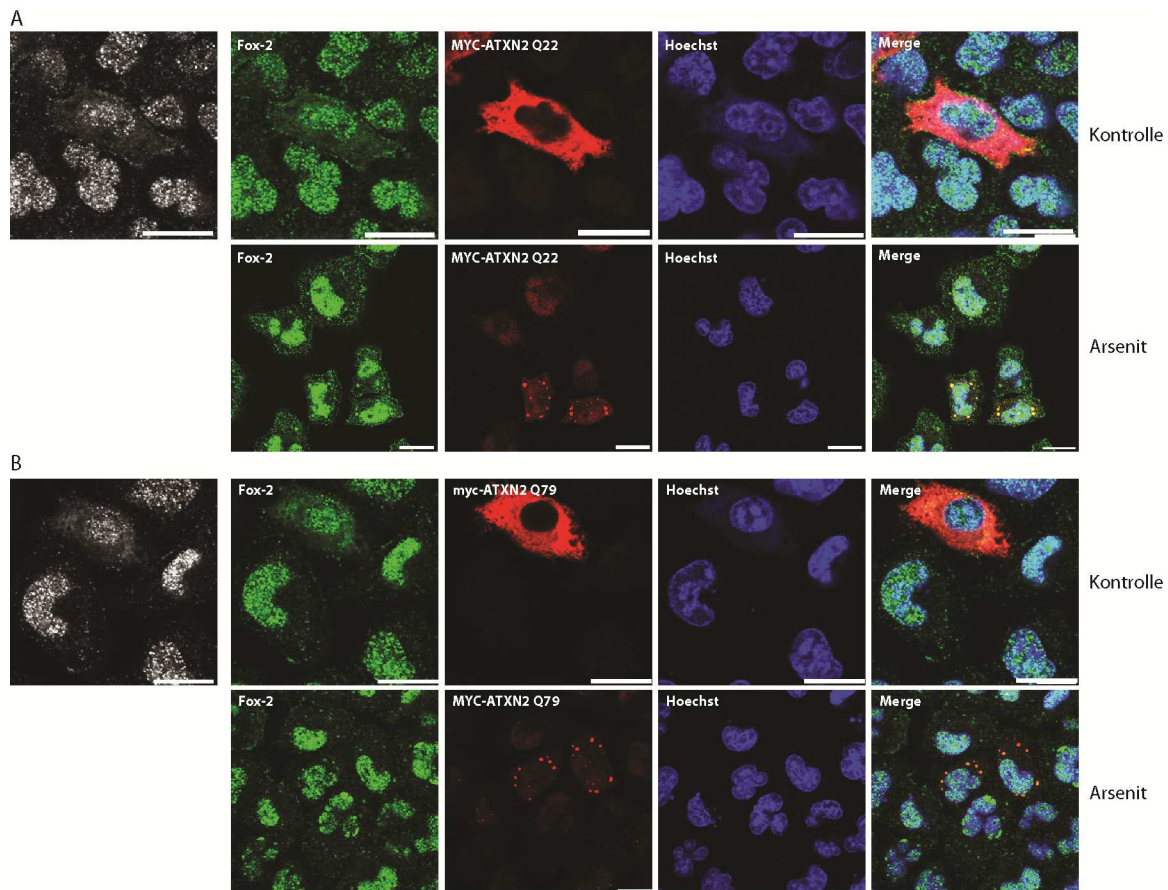
#### ***4.3.2 Einfluss einer erhöhten Ataxin-2-Konzentration auf die Fox-2-Lokalisation***

In einem zweiten Schritt wurde daher untersucht, ob eine erhöhte Ataxin-2-Menge einen Einfluss auf die Lokalisation von Fox-2 unter Normal- und Stress-Bedingungen besitzt. Für diese Analysen wurden HeLa-Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben, ausgesät und kultiviert. Die Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV-MYC-ATXN2 Q22 bzw. pCMV-MYC-ATXN2 Q79 transfiziert und für weitere 24 Stunden kultiviert, um die Expression von normalem und expandiertem Ataxin-2 (ATXN2 Q22 und ATXN2 Q79) zu ermöglichen. Für die Stress-Analysen wurden die entsprechenden Proben mit Natrium-meta-Arsenit behandelt.

Wie aus Abbildung 20 ersichtlich wird, zeigten Zellen, die Ataxin-2 mit 22 (A) oder 79 (B) Glutaminen überexprimierten, eine vermehrte flächige cytoplasmatische Fox-2-Lokalisation im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (obere Reihe). Zur besseren Ansicht ist die Fox-2-Färbung zusätzlich in schwarz-weiß dargestellt.

In ATXN2-überexprimierenden Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt waren (untere Reihe), konnte Fox-2 in den „Stress Granules“ nachgewiesen werden. Aufgrund der Akkumulierung in den „Stress Granules“ kann hier keine Aussage über eine vermehrte cytoplasmatische Lokalisation von Fox-2 gemacht werden.

Somit hat die ATXN2-Überexpression unter normalen Bedingungen einen Einfluss auf die endogene Fox-2-Lokalisation.



**Abbildung 20: Überexpression von Ataxin-2 mit 22 bzw. 79 Glutaminen.** HeLa-Zellen wurden in 24-Kammerplatten ausgesät und mit (A) pCMV-MYC-ATXN2 Q22 oder (B) pCMV-MYC-ATXN2 Q79 transfiziert. Es erfolgte eine Kultivierung der Zellen für weitere 24 Stunden und die Induktion von oxidativen Stress durch eine Behandlung der Zellen mit 0,5 mM Natrium-meta-Arsenit für eine Stunde (untere Reihe). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (obere Reihe). Die Expression von Fox-2 wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen (Kaninchen- $\alpha$ -RBM9; Bethyl Lab.), wohingegen MYC-ATXN2 mittels eines spezifischen  $\alpha$ -MYC-Antikörpers (Maus-anti-MYC; Millipore) nachgewiesen wurde. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst. Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

#### 4.4 Untersuchungen zum Einfluss von Fox-2 auf die SCA2-Genexpression

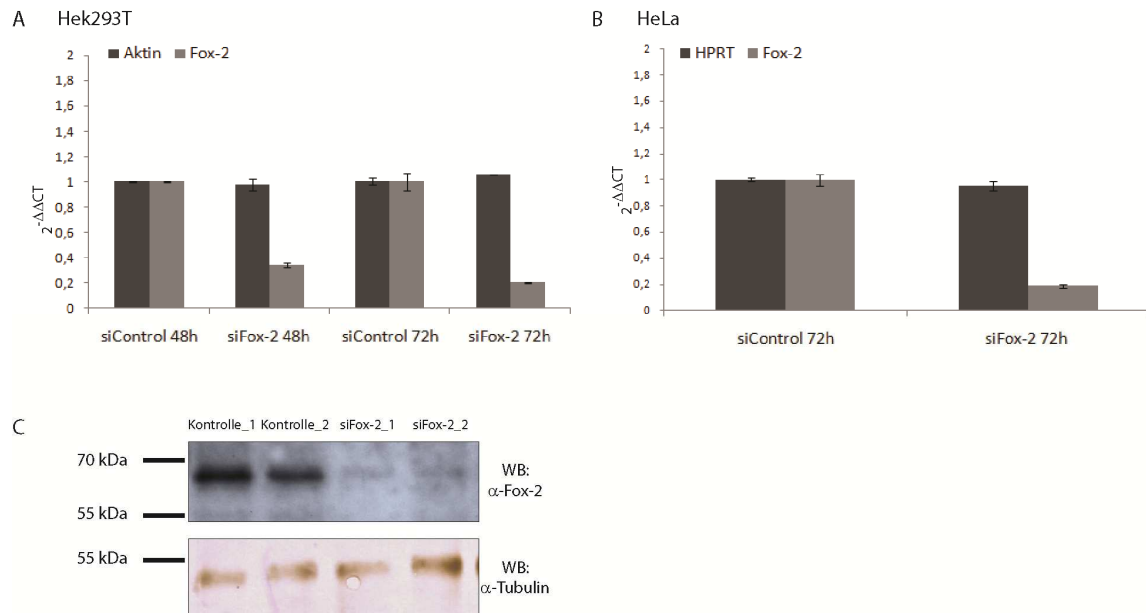
Innerhalb der Arbeit von Ma *et al.* wurde beobachtet, dass die Reduktion von A2BP1, dem Paralog von Fox-2, in einer hypothalamischen Zelllinie der Maus (N-41) zu einer Reduktion der SCA2-Genexpression führte [178]. Zudem scheint Fox-2 neben seiner Rolle in der Regulation des Spleißens ebenfalls an der Regulation der Transkription beteiligt zu sein, da es als negativer Ko-Regulator des Östrogenrezeptors identifiziert wurde [179]. Aus diesem Grund sollte im Folgenden mittels RT-qPCR-Analysen überprüft werden, ob die Reduktion der zellulären Fox-2-Konzentration einen Einfluss auf die SCA2-Genexpression haben könnte.

##### 4.4.1 Optimierung der siRNA-vermittelten Fox-2-Reduktion

Dafür wurde in einem ersten Schritt die siRNA-vermittelte Reduktion von Fox-2 optimiert und validiert. HEK293T- und HeLa-Zellen wurden mit Fox-2-spezifischer siRNA bzw. einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48



bzw. 72 Stunden kultiviert. Im Folgenden wurde die Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Für die Quantifizierung der Expression von Fox-2 wurde eine RT-qPCR mit den Oligonukleotiden Fox-2\_fw und Fox-2\_rev durchgeführt.



**Abbildung 21: Reduktion der FOX-2-Genexpression. Quantifizierung der Transkriptmenge von Fox-2 mittels RT-qPCR in HEK293T- (A) und HeLa-Zellen (B).** Zellen wurden ausgesät und mit Fox-2-spezifischer, bzw. Kontroll-siRNA, transfiziert und für 48 bzw. 72 Stunden inkubiert. Gesamt-RNA wurde isoliert und cDNA synthetisiert. Die Quantifizierung der Transkriptmenge erfolgte mittels RT-qPCR und den Oligonukleotiden Fox-2\_fw und Fox-2\_rev. Als Kontrollgene dienten *HPRT* und *B2M* bzw. *β-Aktin*. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit zwei biologischen Replikaten. Die Auswertung erfolgte mit der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, wobei auf *B2M* normalisiert wurde. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM). **(C) Quantifizierung der Proteinmenge von Fox-2 mittels Immunoblot in HEK293T-Zellen.** Zellen wurden ausgesät und mit Fox-2-spezifischer bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und 72 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss lysiert. Für den Immunoblot wurden 10  $\mu\text{g}$  Gesamt-Protein aufgetragen. Der Fox-2-Nachweis erfolgte mit einem spezifischen  $\alpha$ -Fox-2-Antikörper (Kaninchen- $\alpha$ -RBM9; Beth. Lab). Als Ladekontrolle wurden ebenfalls 10  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen und der entsprechende Blot mit einem spezifischen  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper behandelt (Maus- $\alpha$ -Tubulin; Sigma).

Es zeigte sich, dass bei HEK293T-Zellen, die für 48 Stunden mit einer Fox-2-spezifischen siRNA behandelt wurden, eine Reduktion des Fox-2-Transkripts um ca. 70% auftrat, wohingegen eine 72stündige Behandlung in einer Reduktion von nahezu 80% resultierte (Abbildung 21 A). Auch bei Verwendung von HeLa-Zellen konnte nach 72stündiger Inkubation mit spezifischer Fox-2-siRNA eine Reduktion der Fox-2-Transkriptmenge um 80% erreicht werden (Abbildung 21 B).

Um diese Reduktion ebenfalls auf Protein-Ebene nachzuweisen, wurde die Fox-2-Expression in einer Zelllinie mittels Western-Blot analysiert. Dafür wurden diese, wie beschrieben, mit der Fox-2-spezifischen siRNA behandelt und nach 72 Stunden lysiert. Anschließend erfolgte die Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese mit einem Antikörper gegen Fox-2 inkubiert. Wie aus Abbildung 21 C ersichtlich wird, führte die Behandlung von HEK293T-Zellen mit Fox-2-

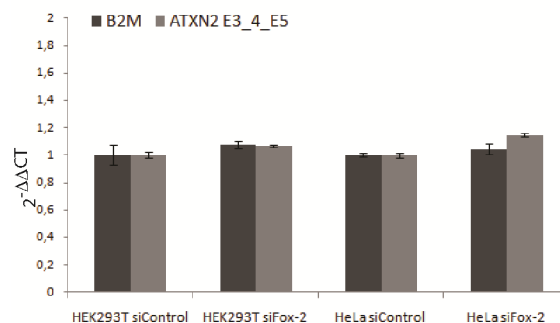
spezifischer siRNA zu einer deutlichen Reduktion des Proteins im Western-Blot, wohingegen die Proteinmenge des Kontroll-Proteins Tubulin keine Veränderung aufwies.

Da nach 72 Stunden Inkubation mit Fox-2-spezifischer siRNA eine ca. 80%ige Reduktion an Fox-2-Transkript und außerdem eine deutliche Reduktion der Proteinmenge mittels Westerblot nachgewiesen werden konnte, wurden die folgenden Analysen nach 72 Stunden Behandlung mit der Fox-2-spezifischen siRNA durchgeführt.

#### 4.4.2 Einfluss einer reduzierten Fox-2-Konzentration auf die SCA2- Expression

Nach Etablierung der RNAi-Bedingungen wurde im Folgenden der Einfluss einer reduzierten Fox-2-Konzentration auf die SCA2-Genexpression untersucht. Dazu wurden HEK293T- und HeLa-Zellen ausgesät und mit Fox-2-spezifischer bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert und für 72 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die Quantifizierung der SCA2-Genexpression erfolgte mittels RT-qPCR und den Oligonukleotiden ATXN2\_E3\_4\_fw und ATXN2\_E5\_rev.

Wie aus Abbildung 22 ersichtlich wird, hatte eine reduzierte Fox-2-Expression in HEK293T- und HeLa-Zellen keinen Einfluss auf die ATXN2-Transkriptmenge. Somit fungiert Fox-2 unter diesen Bedingungen nicht als transkriptioneller Regulator des SCA2-Gens.



**Abbildung 22: SCA2-Genexpression bei einer reduzierten Fox-2-Konzentration.** HEK293T- und HeLa-Zellen wurden ausgesät und mit Fox-2-spezifischer bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und für 72 Stunden inkubiert. Gesamt-RNA wurde isoliert und cDNA synthetisiert. Die Quantifizierung der ATXN2-Transkriptmenge erfolgte mittels RT-qPCR und den Oligonukleotiden ATXN2\_E3\_4\_fw und ATXN2\_E5\_rev. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Als Kontrollgene dienen *HPRT* und *B2M*. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit zwei biologischen Replikaten. Die Auswertung erfolgte mittels der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, wobei auf *HPRT* normalisiert wurde. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

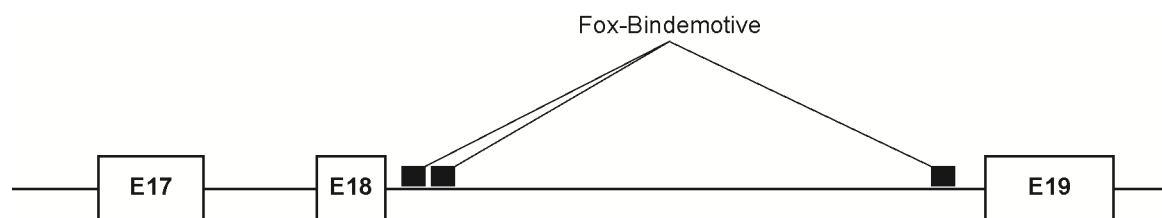
#### 4.5 ATXN2-prä-mRNA besitzt Fox-2-Bindemotive

Die hauptsächliche Funktion der Fox-Proteine scheint die Regulation des prä-mRNA-Spleißens zu sein [167]. Die beiden Fox-Proteine, Fox-1 (A2BP1) und Fox-2 (RBM9), besitzen eine identische RRM-Domäne, über die beide Proteine an das RNA-Hexamer UGCAUG binden, welches oft in duplizierter Form vorliegt [180-183]. Bisherige Daten lassen vermuten, dass die Fox-Proteine als Aktivatoren des Spleißens fungieren, wenn sie in der DIF- (downstream intronic flanking) Region binden. Eine Bindung der Fox-Proteine in den UIF- (upstream intronic flanking)

Regionen hingegen scheint hingegen eine repressive Wirkung auf das Spleißen des entsprechenden Exons zu haben [168, 181, 184].

Interessanterweise konnte innerhalb einer genomweiten Analyse zur Identifizierung von Genen, die mindestens ein Fox-Bindemotiv enthalten, ebenfalls das *SCA2*-Gen als Träger dieses hexameren Sequenzelements identifiziert werden [168]. Somit besteht die Möglichkeit, dass Spleiß-Ereignisse der *ATXN2*-prä-mRNA durch eine Bindung der Fox-Proteine reguliert werden könnten. Dieser Aspekt wurde im Folgenden untersucht.

Dafür wurde das *SCA2*-Gen auf mögliche Fox-2-Bindemotive hin untersucht. Innerhalb der genomischen Ataxin-2-Sequenz befinden sich 30 dieser Motive, wobei diese nahezu ausschließlich in den intronischen Bereichen zu finden sind. Da bekannt ist, dass das UGCAUG-Element ein konserviertes intronisches Element ist, welches in der Nähe Fox-regulierter Exone angereichert ist [185] und im Bereich bis 250 Nukleotide innerhalb der UIF und DIF-Regionen regulierter Exone vorliegt [186-188], wurde dieser Bereich auf das Vorhandensein möglicher Fox-2-Bindemotive hin untersucht. Von den 30 identifizierten Motiven innerhalb der intronischen Sequenzen lagen 6 innerhalb der UIF bzw. DIF-Regionen vor. Jeweils ein Fox-Bindemotiv befindet sich in den flankierenden intronischen Regionen von Exon 11, 19, 21 und 22. Innerhalb dieser Arbeit wurde sich auf die Fox-2-Bindemotive in der DIF-Region von Exon 18, welches aus 61 Nukleotiden besteht, konzentriert, da hier 40 Nukleotide hinter Exon 18 (ENSE00001474550) zwei Bindemotive für die Fox-Proteine identifiziert werden konnten (Abbildung 23) [168].



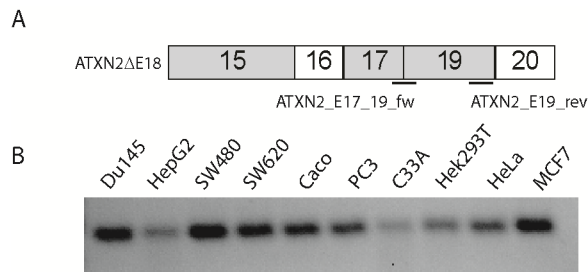
**Abbildung 23: Das *SCA2*-Gen besitzt Fox-Bindemotive.** Schematische Darstellung eines Ausschnitts des *SCA2*-Gens. 40 nt hinter *ATXN2* Exon 18 befinden sich zwei Fox-Bindemotive.

Theoretisch würde also eine Bindung von Fox-2 an die Fox-Bindemotive im DIF-Bereich von Exon 18 zu einer Aktivierung des Spleißens und damit einer Inklusion von Exon 18 führen. Das bisher bekannte Haupttranskript von Ataxin-2 beinhaltet dieses Exon 18. Daher stellte sich im Folgenden die Frage, ob *ATXN2*-Transkripte existieren, welche Exon 18 nicht beinhalten. Diese werden im Folgenden als *ATXN2ΔE18*-Transkripte bezeichnet.

#### 4.5.1 Nachweis des *ATXN2ΔE18*-Transkripts

Um diese Fragestellung zu klären, wurde die Gesamt-RNA unterschiedlicher Zelllinien isoliert und die entsprechende cDNA synthetisiert. Im Folgenden wurde mittels PCR-Analyse überprüft, ob das *ATXN2ΔE18*-Transkript in diesen Zelllinien nachzuweisen war. Dafür wurden

die Oligonukleotide ATXN2\_E17\_19\_fw und ATXN2\_E19\_rev verwendet, wobei ATXN2\_E17\_19\_fw direkt auf dem putativen Übergang von Exon 17 zu Exon 19 lokalisiert ist und somit nur an die DNA binden kann, wenn Exon 18 im Transkript nicht vorhanden ist (Abbildung 24 A).



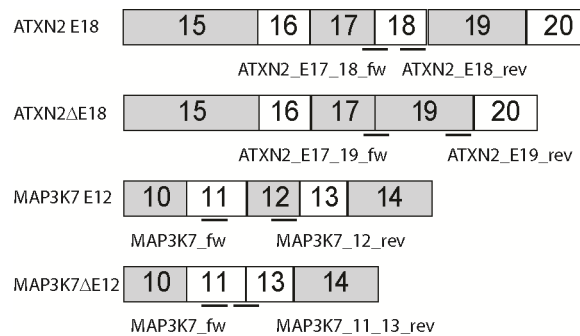
**Abbildung 24:** (A) Schematische Darstellung eines Ausschnitts der putativen Exonstruktur von ATXN2ΔE18. Die Bindestellen der Oligonukleotide ATXN2\_E17\_19\_fw und ATXN2\_E19\_rev sind durch schwarze Striche dargestellt. (B) Expression des ATXN2ΔE18-Transkripts in unterschiedlichen humanen Zelllinien. Die PCR wurde, wie in Material und Methoden unter dem Punkt RT-qPCR beschrieben, durchgeführt und die Oligonukleotide ATXN2\_E17\_19\_fw und ATXN2\_E19\_rev verwendet. Die Auswertung erfolgte nicht-quantitativ über ein 3%-Agarosegel.

Wie aus Abbildung 24 B ersichtlich wird, konnte in den untersuchten Zelllinien ein Amplifikat der erwarteten Größe von 195 bp nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass es sich dabei, um ein unspezifisches PCR-Produkt handelte, wurde eines der Amplifikate (HEK293T) einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei stellte sich heraus, dass es sich um das erwartete ATXN2ΔE18-Produkt handelte. Da somit in 10 unterschiedlichen Zelllinien die Expression des ATXN2ΔE18-Transkriptes nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass in humanen Zelllinien dieses Spleiß-Ereignis stattfindet. Dafür spricht auch, dass in der neuesten Version der Ensembl-Datenbank vom Juni 2011 eine Transkriptvariante von Ataxin-2 (ENST00000550104) annotiert ist, in der Exon 18 nicht inkludiert ist.

#### 4.5.2 Fox-2-abhängiges Spleißen der ATXN2-prä-mRNA

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwiefern die Inklusion von ATXN2 Exon 18 Fox-2-abhängig ist. Dazu wurde die zelluläre Fox-2-Konzentration mittels RNAi reduziert und untersucht, ob dies zu einer vermehrten Exklusion von Exon 18 führt.

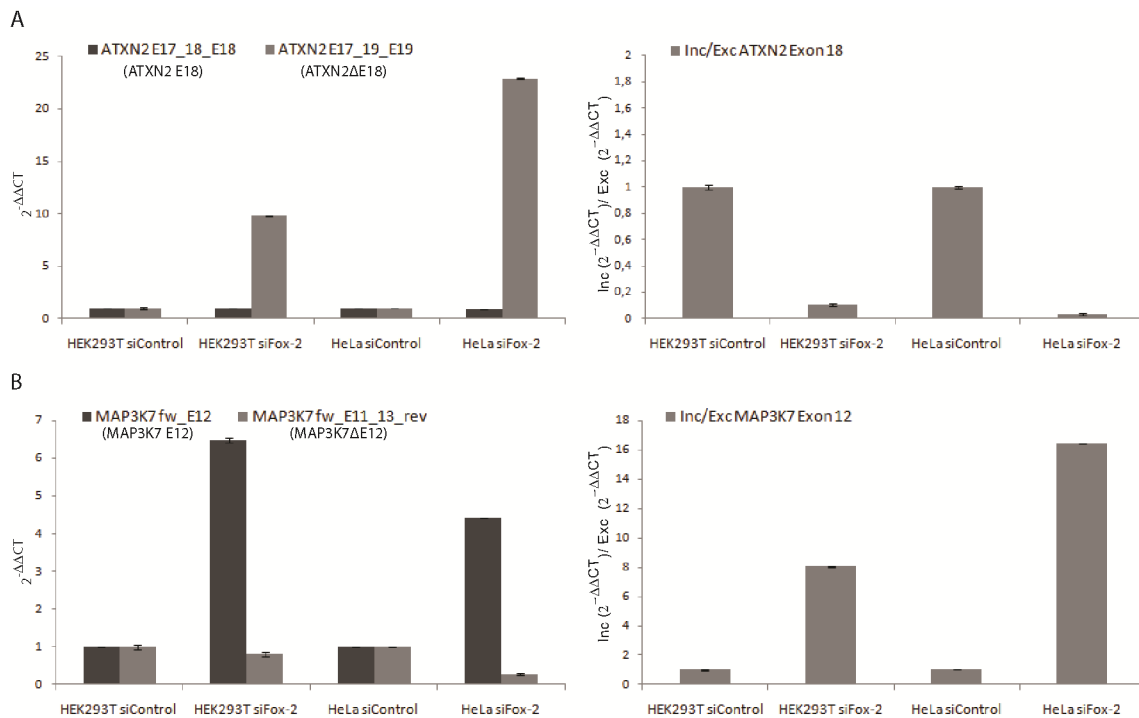
Für die Bestimmung der Expression der unterschiedlichen ATXN2-Transkripte wurden HEK293T- und HeLa-Zellen mit einer spezifischen siRNA gegen Fox-2 und einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 72stündiger Inkubation wurde die Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels RT-qPCR. Für die Detektion der ATXN2-Transkripte, die Exon 18 beinhalten, wurden die Primer ATXN2\_E17\_18\_fw und ATXN2\_E18\_rev verwendet, wobei ATXN2\_E17\_18\_fw an der Grenze von Exon 17 zu Exon 18 bindet (Abbildung 25). Die Detektion der ATXN2ΔE18-Transkripte erfolgte mittels der Oligonukleotide ATXN2\_E17\_19\_fw und ATXN2\_E19\_rev (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Schematische Darstellung eines Ausschnitts der Exonstruktur von ATXN2E18 und ATXN2ΔE18 bzw. MAP3K7E12 und MAP3K7ΔE12.** Die Bindestellen der entsprechenden Oligonukleotide sind durch schwarze Striche dargestellt.

Als Kontrolle wurde in diesen Analysen ein bekanntes Fox-2-abhängiges Spleiß-Ereignis einbezogen. Im „Upstream-Intron“ von Exon 12 besitzt die MAP3K7-prä-mRNA 4 Bindemotive für die Fox-Proteine. Von Yeo *et al.* konnte gezeigt werden, dass in humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) eine Reduzierung der Fox-2-Konzentration in einem vermehrten Einbau von MAP3K7 Exon 12 resultiert [184]. Für die Quantifizierung der unterschiedlichen Spleiß-Varianten von MAP3K7, MAP3K7E12 und MAP3K7ΔE12, mittels RT-qPCR wurden unterschiedliche Oligonukleotidpaare verwendet. MAP3K7E12 wurde mit Hilfe der Oligonukleotide MAP3K7\_fw und MAP3K7\_E12\_rev nachgewiesen. Um MAP3K7ΔE12 zu detektieren, wurde das Oligonukleotidpaar MAP3K7\_fw und MAP3K7\_E11\_13\_rev verwendet, wobei MAP3K7\_E11\_13\_rev an der Verbindung von Exon 11 zu Exon 13 bindet. Daher führt die Verwendung dieses Oligonukleotidpaares nur zu einem Amplifikat, wenn Exon 12 nicht vorhanden ist (Abbildung 25).

Wie in Abbildung 26 A zu erkennen ist, führt eine Reduktion des Fox-2-Proteins zu einer Zunahme an ATXN2ΔE18-Transkript in beiden verwendeten Zelllinien im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (linke Seite). Dabei weist das entsprechende ATXN2E18-Transkript in HeLa-Zellen eine minimale Reduktion auf und bleibt in HEK293T-Zellen relativ konstant. Durch die erhöhte Menge an ATXN2ΔE18-Transkript verringerte sich das Verhältnis von ATXN2E18- zu ATXN2ΔE18-Transkript in beiden Zelllinien (Abbildung 26 A, rechte Seite).



**Abbildung 26: Fox-2-abhängiges Spleißen von (A) ATXN2-prä-mRNA bzw. (B) MAP3K7-prä-mRNA in humanen Zelllinien.** HEK293T- und HeLa-Zellen wurden ausgesät und mit Fox-2-spezifischer bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und für 72 Stunden inkubiert. Gesamt-RNA wurde isoliert und cDNA synthetisiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels RT-qPCR. Für die RT-qPCR-Analyse wurden die Oligonukleotide (A) ATXN2\_E17\_18\_fw und ATXN2\_E18\_rev bzw. ATXN2\_E17\_19\_fw und ATXN2\_E19\_rev und (B) MAP3K7\_fw und MAP3K7\_E12 bzw. MAP3K7\_fw und MAP3K7\_E11\_13 verwendet. Dargestellt ist ebenfalls das Verhältnis von Inklusion zu Exklusion des ATXN2 Exons 18 bzw. MAP3K7 Exons 12. Es wurden mindestens zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Als Kontrollgene dienten *HPRT* und *B2M* bzw.  $\beta$ -Aktin. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit zwei biologischen Proben. Die Auswertung erfolgte mittels  $\Delta\Delta$ CT-Methode, wobei auf *B2M* normalisiert wurde. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

Als Kontrolle diente in diesen Analysen das spezifische Fox-2-Target MAP3K7. Wie aus Abbildung 26 B (linke Seite) ersichtlich wird, kommt es in HEK293T- und HeLa-Zellen durch eine Reduktion von Fox-2 wie erwartet zu einem vermehrten Einbau von Exon 12 in das MAP3K7-Transkript [184]. Dies führt zu einer Erhöhung des Verhältnisses von MAP3K7E12 zu MAP3K7 $\Delta$ E12 (rechte Seite).

Somit konnte gezeigt werden, dass die ATXN2-prä-mRNA in der downstream flankierenden Region von Exon 18 zwei Fox-Bindemotive enthält. Eine siRNA-vermittelte Reduktion von Fox-2 führt zu einer vermehrten Exklusion des ATXN2 Exons 18.

#### 4.5.3 Untersuchungen zur Stabilität des ATXN2 $\Delta$ E18-Transkripts

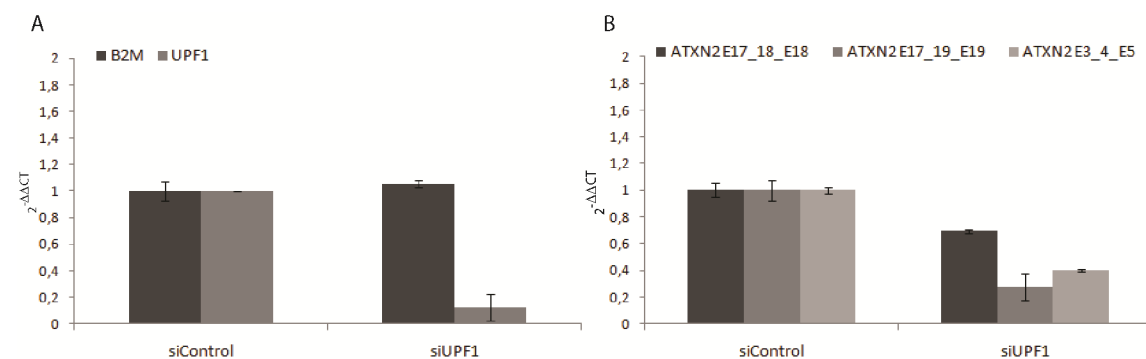
Alternatives Spleißen ist eine Form post-transkriptioneller Genregulierung, die mehrere mRNA-Transkripte einer prä-mRNA generiert. Dies führt nicht nur zur Translation unterschiedlicher und funktionell verschiedener Protein-Isoformen, sondern beeinflusst die Genexpression *per se*. Dabei kann einerseits über Spleiß-Ereignisse in den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) die Translationsinitiation oder die Stabilität und Lokalisation der mRNA reguliert werden, andererseits können Spleiß-Ereignisse zu frühzeitigen Terminations-

Codons (premature translation termination codon; PTC) führen. Einige der mRNAs mit PTC kodieren für verkürzte Isoformen der entsprechenden Proteine, wohingegen andere über den „nonsense-mediated mRNA decay“ (NMD) abgebaut werden und dadurch die Genexpression reguliert wird [189]. Speziell für einige Spleiß-Regulatoren konnte gezeigt werden, dass der NMD, ausgelöst durch alternatives Spleißen, Bestandteil eines autoregulativen, negativen „Feedback-loops“ ist [189]. Interessanterweise führt die Exklusion der 61 bp von ATXN2 Exon 18 zu einer Leserasterverschiebung und damit einhergehend zu einem vorzeitigen Stop-Codon. Deshalb sollte überprüft werden, ob das ATXN2 $\Delta$ E18-Transkript eine Ziel-mRNA des NMDs ist.

Ein wesentlicher Bestandteil des NMD ist das Protein UPF1 (Up-frameshift suppressor 1 homolog), welches ein Bestandteil des SMG1C-Komplexes ist. Dieser erkennt mRNAs mit speziellen vorzeitigen Terminations-Codons und führt zu deren Abbau.

Daher sollte hier der NMD durch eine Reduktion von UPF1 inhibiert werden, so dass Ziel-mRNAs des NMDs nicht mehr abgebaut werden können und somit akkumulieren [182, 190].

Für diese Analysen wurde in einem ersten Schritt die siRNA-vermittelte Reduktion von UPF1 etabliert, indem HEK293T-Zellen jeweils mit siRNA gegen UPF1 bzw. einer Kontroll-siRNA behandelt wurden. Diese Zellen wurden weitere 72 Stunden inkubiert und anschließend die Gesamt-RNA isoliert. Nach der cDNA-Synthese wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Die UPF1-Transkriptmenge wurde mittels der Oligonukleotide UPF1\_fw und UPF1\_rev bestimmt. Wie aus Abbildung 27 A ersichtlich wird, wiesen siUPF-1-behandelte Zellen eine um 80% reduzierte Menge des UPF1-Transkriptes auf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der NMD unter diesen Bedingungen stark eingeschränkt ist.



**Abbildung 27: siRNA-induzierte Reduktion von UPF1.** HEK293T-Zellen wurden ausgesät und jeweils mit UPF1- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und für 72 Stunden inkubiert. Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. **(A) Quantifizierung der Transkriptmenge von UPF1.** Die Quantifizierung erfolgte mittels RT-qPCR und den Oligonukleotiden UPF1\_fw und UPF1\_rev. **(B) Das ATXN2 $\Delta$ E18-Transkript wird nicht über den NMD abgebaut.** Die Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und den Oligonukleotiden ATXN2\_E3\_4\_fw und ATXN2\_E5\_rev, ATXN2\_E17\_18\_fw und ATXN2\_E18\_rev bzw. ATXN2\_E17\_19\_fw und ATXN2\_E19\_rev. Als Kontrollgene für diese Analysen dienten *HPRT* und *B2M*. Es wurden mindestens zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels  $\Delta\Delta CT$ -Methode, wobei auf *HPRT* normalisiert wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit zwei biologischen Replikaten. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

Im Folgenden konnte nun überprüft werden, inwiefern diese UPF1-Reduktion einen Einfluss auf die Stabilität des ATXN2 $\Delta$ E18-Transkripts ausübt. Dazu wurden Zellen ausgesät und mit der spezifischen UPF1- bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert und für weitere 72 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und cDNA synthetisiert. Die Analyse erfolgte mittels RT-qPCR. Wie aus Abbildung 27 B ersichtlich wird, wurde mittels der Oligonukleotide ATXN2\_E3\_4\_fw/ ATXN2\_E5\_rev eine Abnahme des ATXN2-Transkriptes in siUPF1-behandelten Zellen beobachtet. Diese Abnahme konnte ebenfalls mit den Oligonukleotidpaaren ATXN2\_E17\_18\_fw/ ATXN2\_E18\_rev und ATXN2\_E17\_19\_fw/ ATXN2\_E19\_rev beobachtet werden. Da eine Reduktion des ATXN2-Transkriptes mit allen drei Oligonukleotidpaaren in siUPF1-Zellen zu verzeichnen war, scheint diese Inhibition des NMD einen Einfluss auf die SCA2-Genexpression *per se* zu haben.

Interessanterweise kommt es hierbei folglich aber nicht zu einer Anreicherung des ATXN2 $\Delta$ E18-Transkriptes in der siUPF1-Probe. Somit hat die Inhibition des NMD offensichtlich keinen stabilisierenden Einfluss auf das ATXN2 $\Delta$ E18-Transkript. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ATXN2 $\Delta$ E18-mRNA nicht über den „nonsense-mediated mRNA decay“ abgebaut wird. Daher ist davon auszugehen, dass das entsprechende Transkript translatiert wird, wie es für das  $\Delta$ E18-Ensembl-Transkript von ATXN2 (Transkript-Id: ENST00000550104) auch annotiert ist.

## ***4.6 Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der Fox-2-ATXN1-Interaktion***

Interessanterweise gibt es Hinweise, dass Ataxin-2 auch einen modifizierenden Effekt auf die Pathogenese anderer neurodegenerativer Erkrankungen besitzt [19, 161, 163]. Dabei konnte bemerkenswerterweise von Al-Ramahi *et al.* demonstriert werden, dass das ATXN2-Protein in Lage ist den Phänotyp der spinozerebellären Ataxie Typ 1 in einem Fliegenmodell zu modifizieren [19]. Bemerkenswerterweise konnte in einem Hochdurchsatzverfahren von Lim *et al.* auch eine Interaktion von Fox-2 mit dem Polyglutamin-Protein Ataxin-1 identifiziert werden [166]. Da Ataxin-2 auch mit Ataxin-1 interagiert, sollte der funktionelle Zusammenhang dieser drei Interaktionspartner hier näher untersucht werden [19, 166]. Zudem sollte abschließend geklärt werden, inwieweit die Interaktionen mit dem Spleiß-Regulator Fox-2 eine Rolle in der Pathogenese der SCA1 spielen könnten. Aus diesem Grund wurde als erstes die Interaktion zwischen Fox-2 und Ataxin-1 validiert und näher untersucht.

### ***4.6.1 Untersuchungen zur Interaktion von Fox-2 und Ataxin-1***

Bei Ataxin-1 handelt es sich um ein vorwiegend nukleäres Protein, welches aber zu einem gewissen Grad bei Überexpression auch im Cytoplasma vorzufinden ist [78]. Daher wurde innerhalb dieser Arbeit ebenfalls überprüft, inwiefern nukleäre und cytoplasmatische Varianten



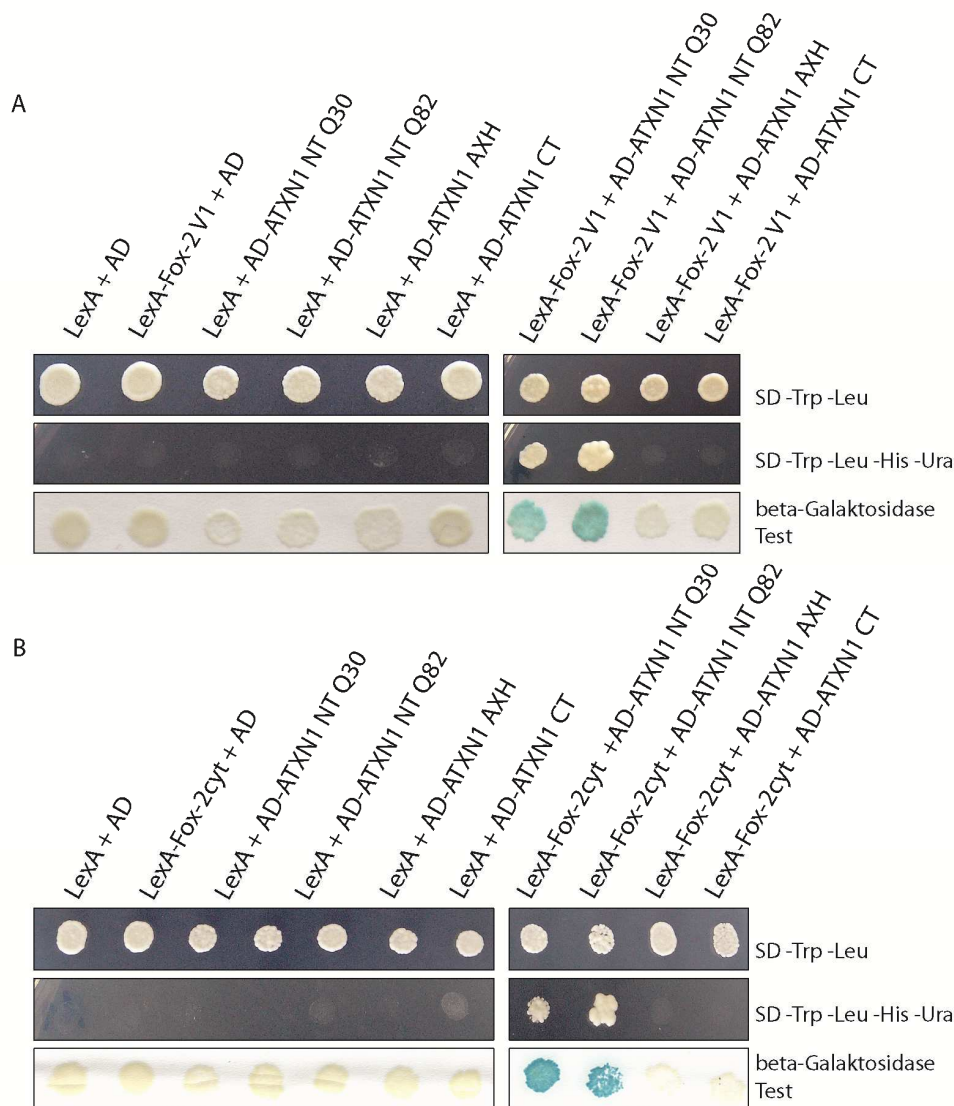
von Fox-2 mit Ataxin-1 interagieren können. Für die Y2H-Analysen wurden unterschiedliche Bereiche von Ataxin-1 eingesetzt, die das gesamte Protein umfassen und schematisch in Abbildung 28 dargestellt sind.



**Abbildung 28: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Ataxin-1** und den verwendeten Proteinbereichen im Y2H. Die Polyglutamin-Domäne von Ataxin-1 befindet sich N-terminal, gefolgt von der AXH-Domäne.

Auch hier wurde in einem ersten Schritt eine mögliche Autoaktivierung der Fusionsproteine getestet. Dazu wurden die Prey-Plasmide pACT4-1b-ATXN1-NTQ30, pACT4-1b-ATXN1-NTQ82, pACT4-1b-ATXN1-AXH und pACT4-1b-ATXN1-CT mit dem Vektor pBTM117c und die Bait-Plasmide, pBTM117c-Fox-2<sub>v1</sub> bzw. pBTM117c-Fox-2<sub>Cyt</sub> mit dem Vektor pACT4-1b in den Hefestamm L40ccua kotransformiert. Im Anschluss wurde die Reporterogenaktivität der Transformanten analysiert. Wie aus Abbildung 29 ersichtlich wird, waren Transformanten, die die Aktivierungsdomäne und die Fusionsproteine LexA-Fox-2<sub>v1</sub> bzw. LexA-Fox-2<sub>Cyt</sub> sowie LexA und die Fusionsproteine AD-ATXN1, koexprimierten nicht in der Lage auf Selektionsmedium zu wachsen und wiesen zudem keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auf. Da keine Reporterogenaktivität nachgewiesen werden konnte, sind die verwendeten Fusionsproteine nicht autoaktivierend und konnten somit für die Interaktionsanalysen verwendet werden.

Um die Interaktion von Fox-2<sub>v1</sub> und Fox-2<sub>Cyt</sub> mit Ataxin-1 im Y2H zu untersuchen, wurden die unterschiedlichen ATXN1-Prey-Plasmide, pACT4-1b-ATXN1-NTQ30, pACT4-1b-ATXN1-NTQ82, pACT4-1b-ATXN1-AXH und pACT4-1b-ATXN1-CT, in Kombination mit den Fox-2-Bait-Plasmiden, pBTM117c-Fox-2<sub>v1</sub> bzw. pBTM117c-Fox-2<sub>Cyt</sub>, in den Hefestamm L40ccua kotransformiert. Die Transformanten wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, auf Selektionsmedium und eine Nylonmembran übertragen, um die Reporterogenaktivität analysieren zu können.



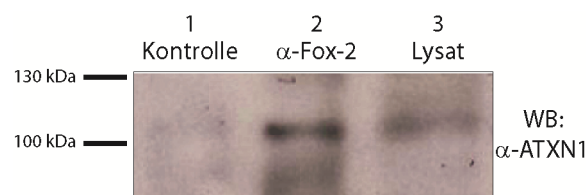
**Abbildung 29: Ataxin-1 interagiert mit den Fox-2-Varianten Fox-2<sub>V1</sub> (A) und Fox-2<sub>Cyt</sub> (B).** Der Hefestamm L40ccua wurde mit den entsprechenden Bait- und Prey-Plasmiden kotransformiert. Die Hefe-Transformanten wurden auf SDII- und SDIV-Medium sowie auf eine Nylonmembran auf SDII-Medium übertragen. Die Aktivität der Reportergene wurde über die Analyse des Wachstums auf SDIV-Medium sowie einen  $\beta$ -Galaktosidase-Test überprüft.

Wie anhand von Abbildung 29 ersichtlich wird, waren nur Hefen in der Lage auf SDIV-Medium zu wachsen, die LexA-Fox-2<sub>V1</sub> (A) bzw. LexA-Fox-2<sub>Cyt</sub> (B) sowie AD-ATXN1-NT Q30 bzw. AD-ATXN1-NT Q82 koexprimierten. Bei diesen Hefe-Transformanten war auch, mittels einer  $\beta$ -Galaktosidase-Analyse, die entsprechende  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nachzuweisen. Somit konnte innerhalb dieser Arbeit für beide Fox-2-Varianten, Fox-2<sub>V1</sub> und Fox-2<sub>Cyt</sub>, eine Interaktion mit dem N-Terminus von Ataxin-1 im Y2H-System nachgewiesen werden. Diese Interaktion scheint unabhängig von der Länge des Polyglutamin-Bereiches zu sein, da kein offensichtlicher Unterschied zwischen ATXN-NT Q30 bzw. Q82 beim Wachstum auf SDIV-Medium bzw. in der Blaufärbung der  $\beta$ -Galaktosidase-Analyse zu beobachten war.

Im Folgenden sollte die Interaktion zwischen Fox-2 und Ataxin-1 in humanen Zellen mittels Koimmunopräzipitations-Analyse validiert werden. Dafür wurden HEK293T-Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben, lysiert und Fox-2 mittels eines spezifischen  $\alpha$ -Fox-2-Antikörpers präzipitiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der nicht mit dem  $\alpha$ -Fox-2-Antikörper behandelt wurde. Im Anschluss wurden die Dynabeads aufgearbeitet und die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der immunologische Nachweis durch die Inkubation der Membran mit einem spezifischen Antikörper gegen Ataxin-1.

Wie aus Abbildung 30 ersichtlich wird, war es möglich Ataxin-1 mit einem  $\alpha$ -Fox-2-Antikörper zu präzipitieren (Spur 2). In der Kontrollprobe konnte kein unspezifisch präzipitiertes Ataxin-1 nachgewiesen werden (Spur 1), wohingegen die Expression des Proteins im eingesetzten Zelllysate in Spur 3 ersichtlich ist.

Somit konnte die Interaktion von Fox-2 und Ataxin-1 sowohl im Yeast-Two-Hybrid-System, als auch mittels Koimmunopräzipitations-Analysen bestätigt werden.



**Abbildung 30: Interaktion von Fox-2 mit Ataxin-1 in humanen Zellen.** 1 mg HEK293T-Zelllysate wurde mit 4  $\mu$ l Maus- $\alpha$ -RBM9-Antikörper (Abnova) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 30  $\mu$ l Protein G-gekoppelten-Dynabeads. Als Kontrolle diente eine Probe, der kein primärer Antikörper zugesetzt wurde. Der Nachweis von Ataxin-1 erfolgte mit einem spezifischen Antikörper (Kaninchen- $\alpha$ -ATXN1; Sigma).

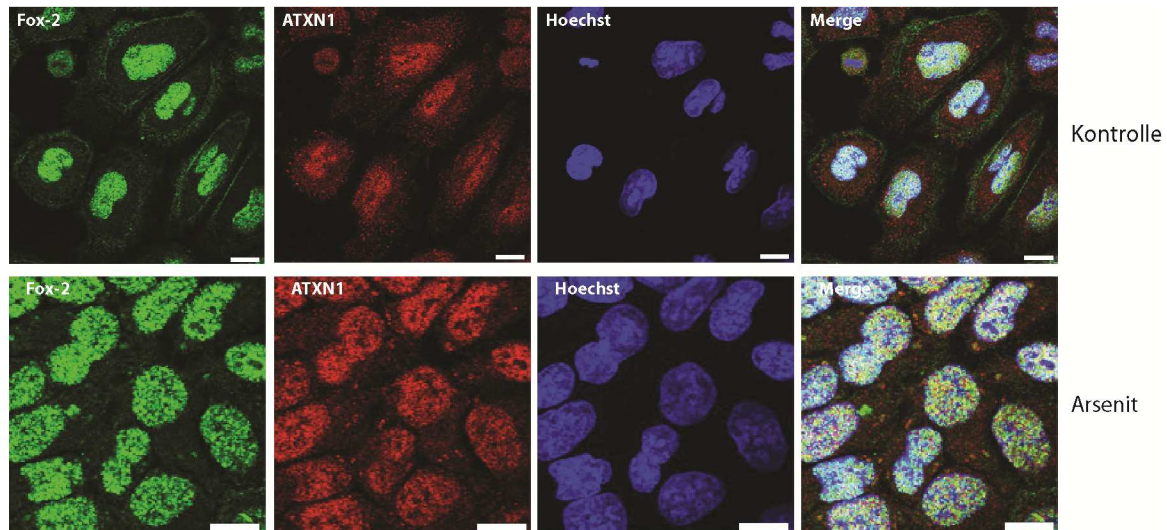
#### 4.6.2 Endogene Lokalisation von Ataxin-1 in HeLa-Zellen

Anschließend wurde die endogene Lokalisation der Interaktionspartner Fox-2 und Ataxin-1 in HeLa-Zellen untersucht. Da Fox-2 in den vorangegangenen Analysen als Komponente der „Stress Granules“ identifiziert wurde, sollte gleichzeitig auch die Lokalisation von Ataxin-1 unter Stress-Bedingungen untersucht werden.

Dazu wurden HeLa-Zellen ausgesät und kultiviert und entsprechend für eine Stunde mit Natrium-meta-Arsenit behandelt. Im Anschluss wurden die Proben für die mikroskopische Analyse vorbereitet.

Die Auswertung der mikroskopischen Analyse ergab, dass es sich bei Ataxin-1 um ein vorwiegend nukleäres Protein handelt, wobei auch eine leichte cytoplasmatische Färbung zu beobachten war (Abbildung 31 obere Reihe). Das entspricht den publizierten Daten [191]. Da Fox-2 ebenfalls eine vorwiegend nukleäre Lokalisation aufweist, konnte für beide Proteine eine Kolo-kalisation im Nukleus gezeigt werden.

In Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt waren, ist Ataxin-1 interessanterweise in cytoplasmatischen Foci zu detektieren (Abbildung 31, untere Reihe). Wie aus der Überlagerungsdarstellung in Abbildung 31 (untere Reihe) ersichtlich wird, kolokalisieren diese Strukturen zum Teil mit den Fox-2-positiven Foci. Somit besteht die Möglichkeit, dass es sich dabei um „Stress Granules“ handeln könnte. Dieser Aspekt müsste in weiteren Analysen näher untersucht werden.



**Abbildung 31: Kolokalisation von Fox-2 und Ataxin-1.** HeLa-Zellen wurden in 24-Kammerplatten ausgesät und für weitere 24 Stunden kultiviert. Die Färbung der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Fox-2 (Maus- $\alpha$ -RBM9; Abnova) und Ataxin-1 (Kaninchen- $\alpha$ -ATXN1; Sigma). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst. Maßstäbsbalken entsprechen 100  $\mu$ m.

#### 4.6.3 Fox-2 ist Bestandteil der Ataxin-1-Inklusionen

In der Arbeit von Skinner *et al.* wurde demonstriert, dass normales humanes Ataxin-1 in transgenen Mäusen im Nukleus von Purkinje-Zellen in nukleären Strukturen mit ca. 0,5  $\mu$ m Durchmesser lokalisiert, wohingegen das expandierte Protein in einer ca. 2  $\mu$ m großen Struktur akkumuliert. Weiterhin zeigten sie, dass die Überexpression von normalem und expandiertem Ataxin-1 in COS1-Zellen zu ähnlichen Strukturen im Nukleus führt, wobei hier bei expandiertem Ataxin-1 größere und weniger dieser Strukturen entstanden als bei normalem Ataxin-1 [191]. Diese Strukturen werden mit der SCA1-Pathogenese in Zusammenhang gebracht und es ist zudem bekannt, dass auch die Überexpression von normalem Ataxin-1 einen degenerativen Phänotyp in *D. melanogaster* auslöst [25]

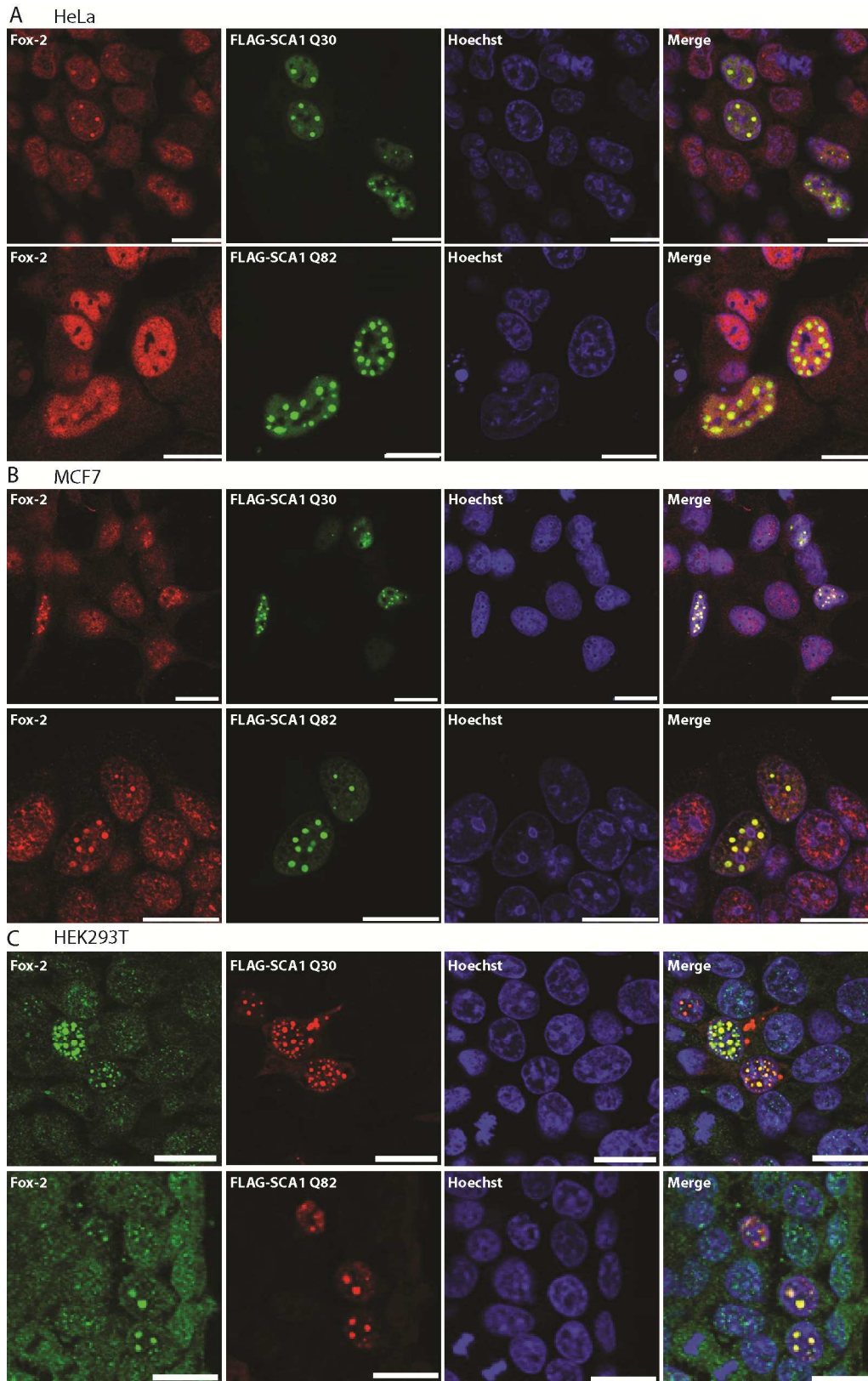
Interessanterweise werden einige Interaktionspartner von Ataxin-1, wie z.B. Ataxin-2, PML und RBM17, in diese nukleären Strukturen rekrutiert [19, 69, 78, 82, 191-192]. Aus diesem Grund sollte in den folgenden Analysen überprüft werden, wie sich die Überexpression von Ataxin-1 auf die Lokalisation seines Interaktionspartner Fox-2 auswirkt. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen in 24-Kammerplatten ausgesät, mit den Plasmiden pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 bzw. pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82 transfiziert und für weitere 48 Stunden kultiviert. Im

Anschluss wurden die Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben, für die mikroskopischen Analysen vorbereitet.

Hierbei zeigte sich, dass Fox-2 in ATXN1-exprimierenden HeLa-Zellen, unabhängig von der Länge des Polyglutamin-Bereiches, in großen Strukturen im Nukleus zu detektieren war. Diese Strukturen kolokalisieren mit den ATXN1-Inklusionen im Kern (Abbildung 32 A). Somit lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Überexpression von Ataxin-1 zu einer Rekrutierung von Fox-2 in die nukleären ATXN1-Inklusionen führt.

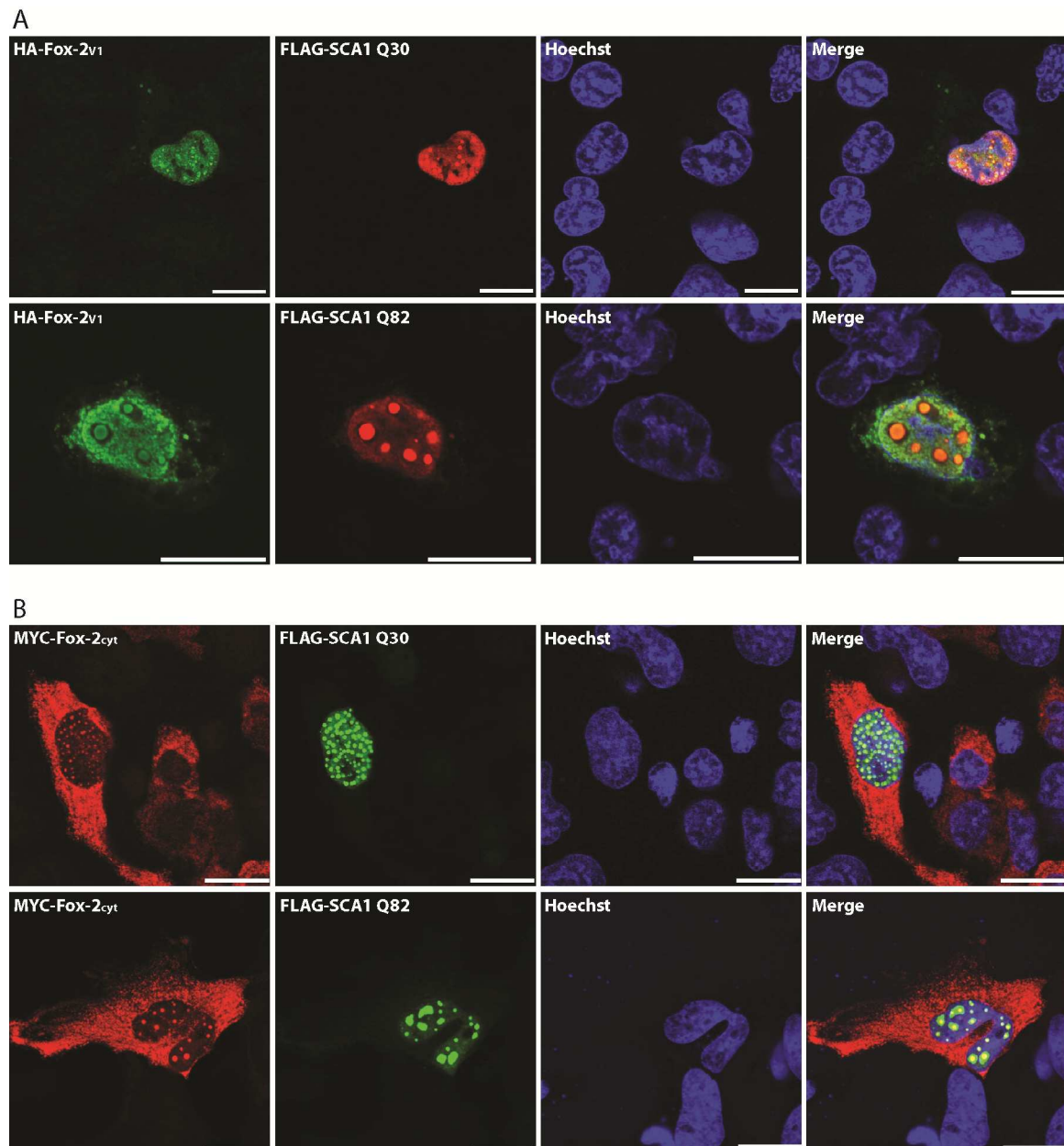
Da viele Fox-2-Isoformen existieren und diese zum Teil Zell- und gewebsspezifisch exprimiert werden [167], wurde zusätzlich überprüft, inwiefern diese Fox-2-Lokalisation in den ATXN1-Inklusionen in unterschiedlichen humanen Zelllinien zu beobachten ist. Für diese Analysen wurden ebenfalls MCF7- und HEK293T-Zellen ausgesät und mit den Plasmiden pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 bzw. pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82, wie in Material und Methoden beschrieben, transfiziert und für die Mikroskopie vorbereitet.

Die mikroskopischen Analysen ergaben, dass die Überexpression von ATXN1 Q30 bzw. Q82 sowohl in MCF7- (B) als auch in HEK293T-Zellen (C) zur Bildung nukleärer ATXN1-positiver Inklusionen führt (Abbildung 32). Wie anhand der Überlagerungsdarstellung ersichtlich wird, ist endogenes Fox-2, unabhängig von der Länge des ATXN1-Polyglutamin-Bereiches, in beiden Zelllinien in diesen Strukturen nachzuweisen (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Fox-2 lokalisiert in nukleären Ataxin-1-Strukturen.** (A) HeLa-, (B) MCF7- und (C) HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 bzw. pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82 transfiziert und für weitere 48 Stunden kultiviert. Die Färbung der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (A+B) Fox-2 (Kaninchen- $\alpha$ -RBM9; Beth. Lab) und FLAG (Maus- $\alpha$ -FLAGM2; Sigma) bzw. (C) Fox-2 (Maus- $\alpha$ -RBM9; Abnova) und FLAG (Kaninchen- $\alpha$ -FLAG; Sigma). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst. Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte überprüft werden, inwiefern nukleäre bzw. cytoplasmatische Varianten von Fox-2 in diesen Strukturen nachgewiesen werden können. Für diese Analysen wurden HeLa-Zellen ausgesät und mit den Plasmiden pCMV-HA-Fox-2<sub>v1</sub> bzw. pCMV-MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub> und pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 bzw. pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82 kotransfiziert und für weitere 48 Stunden kultiviert, um die Expression der Fusionsproteine zu ermöglichen.



**Abbildung 33: Lokalisation der Fox-2-Varianten (A) Fox-2<sub>v1</sub> und (B) Fox-2<sub>Cyt</sub> in nukleären ATXN1-Strukturen.** HeLa-Zellen wurden mit (A) pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 bzw. pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82 und pCMV-HA-Fox-2<sub>v1</sub> oder mit (B) pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 bzw. pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82 und pCMV-MYC-Fox-2<sub>Cyt</sub> kotransfiziert. Die Zellen wurden für weitere 48 Stunden kultiviert. Die Färbung der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (A) HA ( $\alpha$ -HA-Fluorescein, Roche) und FLAG (Kaninchen- $\alpha$ -FLAG; Sigma) und (B) MYC (Kaninchen- $\alpha$ -MYC; Sigma) und FLAG (Maus- $\alpha$ -FLAGM2; Sigma). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst. Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu$ m.

Wie aus Abbildung 33 A ersichtlich wird, zeigten Zellen, die ATXN1 Q30 bzw. ATXN1 Q82 und Fox-2<sub>v1</sub> koexprimierten nukleäre Strukturen, in denen beide Proteine kolokalisierten. Zudem wiesen Zellen, die ATXN1 Q30 bzw. ATXN1 Q82 und Fox-2<sub>Cyt</sub> koexprimierten, ebenfalls nukleäre Strukturen auf, in denen beide Proteine kolokalisierten (Abbildung 33 B).

Somit konnte demonstriert werden, dass Fox-2 bei Überexpression von FLAG-ATXN1 Q30, sowie von FLAG-ATXN1 Q82, eine veränderte Lokalisation aufweist, was speziell auch für die nukleäre Variante 1 und die cytoplasmatische Variante Fox-2<sub>Cyt</sub> bestätigt werden konnte. Dabei bildet es nukleäre Strukturen, die mit den ATXN1-Inklusionen kolokalisieren.

#### **4.6.4 Untersuchungen zum Einfluss einer ATXN1-Überexpression auf die Aktivität von Fox-2**

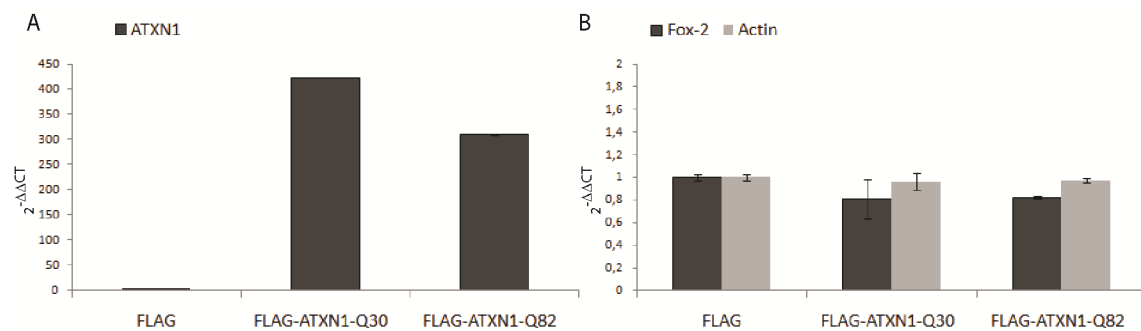
Aufgrund dieser veränderten Fox-2-Lokalisation in ATXN1-überexprimierenden Zellen, stellte sich die Frage, ob die Überexpression von Ataxin-1 einen Einfluss auf die Fox-2-Aktivität als Spleiß-Regulator ausüben könnte, und damit in einem veränderten Spleißen von Fox-2-abhängigen Ziel-mRNAs, speziell der Ataxin-2-mRNA, resultiert.

##### **4.6.4.1 Einfluss einer Ataxin-1-Überexpression auf die FOX-2-Genexpression**

Dazu wurde zunächst überprüft, inwiefern die Überexpression von Ataxin-1 *per se* einen Einfluss auf die FOX-2-Genexpression hat, da ein solcher Effekt ebenfalls in einer veränderten Fox-2-Spleiß-Aktivität resultieren würde. Für diese Analyse wurden HEK293T-Zellen ausgesät und mit den Plasmiden pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 und pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82 bzw. einem FLAG-Kontrollvektor transfiziert. Nach 48stündiger Kultivierung wurde die Gesamt-RNA der Proben isoliert und die entsprechende cDNA synthetisiert. Die Auswertung erfolgte mittels RT-qPCR, wobei die Überexpression von Ataxin-1 mit Hilfe der Oligonukleotide ATXN1\_E8\_fw und ATXN1\_E9\_rev quantifiziert wurde.

Wie aus Abbildung 34 A ersichtlich wird, führte die Überexpression von FLAG-Ataxin-1 Q30 bzw. Q82 zu einer 300-400 fachen Erhöhung des Ataxin-1-Transkriptes. Dabei zeigten Zellen, die FLAG-ATXN1 Q30 bzw. Q82 exprimierten, keine Veränderung der Fox-2-Transkriptmenge (Abbildung 34 B). Daraus lässt sich schließen, dass die Ataxin-1-Überexpression unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die FOX-2-Genexpression hatte.

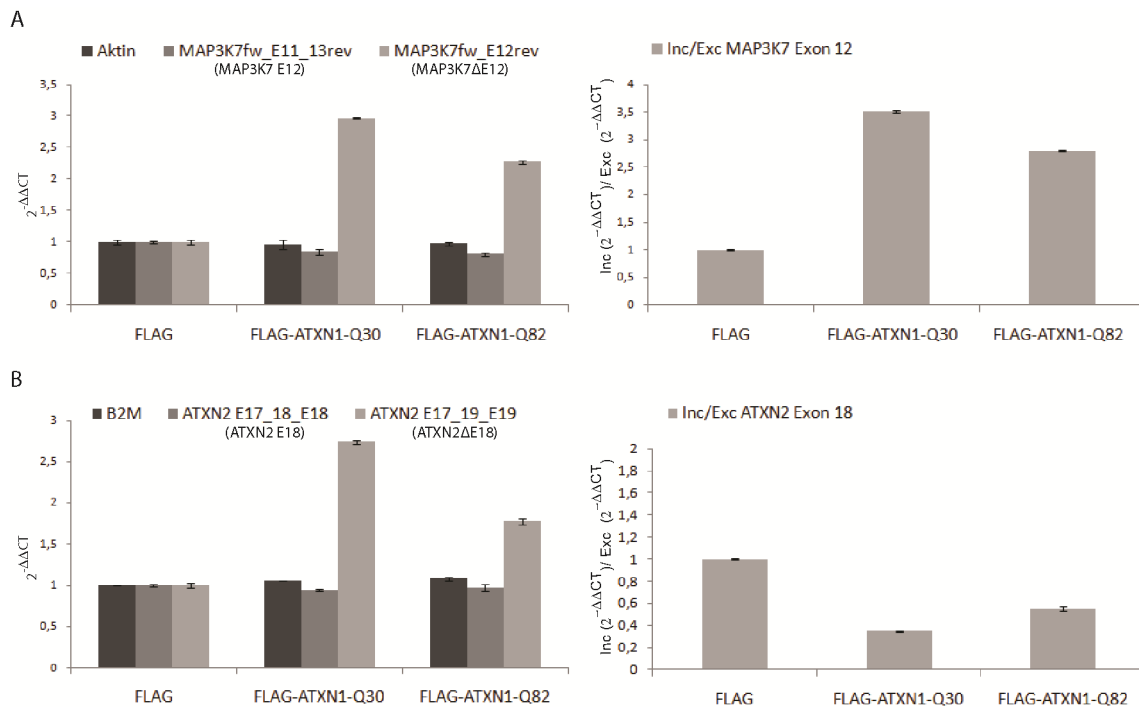




**Abbildung 34: FOX-2-Genexpression bei Überexpression von Ataxin-1.** HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 bzw. pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82 transfiziert und für 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels RT-qPCR. **(A) Nachweis der Überexpression von Ataxin-1** mittels der Oligonukleotide ATXN1\_E8\_fw und ATXN1\_E9\_rev. **(B) Quantifizierung der Transkriptmenge von Fox-2** mittels der Oligonukleotide Fox-2\_fw und Fox-2\_rev. Als Kontrollgene dienten *HPRT* und  $\beta$ -Aktin. Für die RT-qPCR-Analysen wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels  $\Delta\Delta CT$ -Methode, wobei auf *HPRT* normalisiert wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit zwei biologischen Replikaten. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

#### 4.6.4.2 Einfluss einer Ataxin-1-Überexpression auf die Aktivität des Spleiß-Regulators Fox-2

Da die Überexpression von Ataxin-1 keinen Einfluss auf die Fox-2-Transkriptmenge ausübt, wurde im Folgenden überprüft, inwiefern die Ataxin-1-Überexpression zu einem veränderten Fox-2-abhängigen Spleißen der MAP3K7- bzw. der ATXN2-prä-mRNA führt. Dafür wurden HEK293T-Zellen in 12-Kammerplatten ausgesät und mit den Plasmiden pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 und pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82, bzw. einem FLAG-Kontrollvektor transfiziert. Nach 48stündiger Expressionszeit wurde die entsprechende Gesamt-RNA aus den Proben isoliert und die cDNA synthetisiert. Um die MAP3K7-Varianten zu quantifizieren wurden RT-qPCR-Analysen mit den Oligonukleotidpaaren MAP3K7\_fw und MAP3K7\_E12\_rev bzw. MAP3K7\_fw und MAP3K7\_E11\_13\_rev durchgeführt und das Verhältnis beider Transkripte zueinander bestimmt. Für die Analyse der Transkriptvarianten ATXN2E18 und ATXN2 $\Delta$ E18 wurden die Oligonukleotidpaare ATXN2\_E17\_18\_fw und ATXN2\_18\_rev bzw. ATXN2\_E17\_19\_fw und ATXN2\_E19\_rev verwendet und ebenfalls das Verhältnis beider Transkripte zueinander bestimmt.



**Abbildung 35: Deregulation der Spleiß-Aktivität von Fox-2 bei Überexpression von Ataxin-1.** HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA1-FLAG-SCA1-Q30 bzw. pcDNA1-FLAG-SCA1-Q82 transfiziert und für 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels RT-qPCR. **(A) Verändertes Fox-2-abhängiges Spleißen von MAP3K7 Exon 12.** Für die RT-qPCR-Analyse wurden die Oligonukleotide MAP3K7\_fw und MAP3K7\_E12 bzw. MAP3K7\_fw und MAP3K7\_E11\_13 verwendet. Dargestellt ist ebenfalls das Verhältnis von Inklusion Exon 12 zu Exklusion. **(B) Verändertes Fox-2-abhängiges Spleißen von Ataxin-2 Exon 18.** Für die RT-qPCR-Analyse wurden die Oligonukleotide ATXN2\_E17\_18\_fw und ATXN2\_E18\_rev bzw. ATXN2\_E17\_19\_fw und ATXN2\_E19\_rev verwendet. Dargestellt ist ebenfalls das Verhältnis von Inklusion Exon 18 zu Exklusion. Als Kontrollgene dienten *B2M* und *HPRT*, bzw.  $\beta$ -Aktin und *HPRT*. Für die RT-qPCR-Analysen wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, wobei auf *HPRT* normalisiert wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit zwei biologischen Replikaten. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Durchschnitts (SEM).

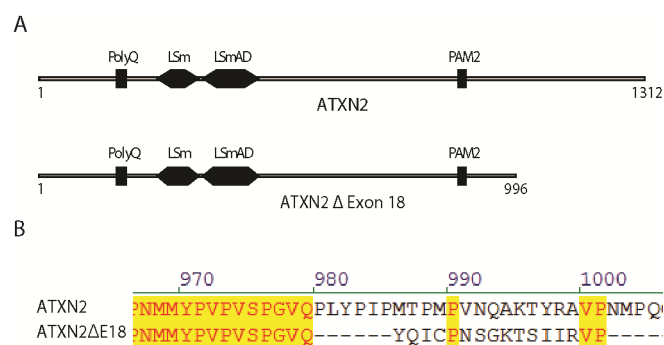
Die Überexpression von ATXN1 mit 30 bzw. 82 Glutaminen führte zu einer 2-3 fachen Zunahme an MAP3K7E12-Transkript (Abbildung 35 A, rechte Seite). Die Berechnung des Verhältnisses zwischen den beiden Spleißformen MAP3K7E12/ MAP3K7ΔE12 zeigte, dass die Überexpression von Ataxin-1 hier zu einem Anstieg führte (Abbildung 35 A, linke Seite). Dieser Anstieg des Verhältnisses fällt bei der Überexpression der normalen ATXN1-Variante mit 30 Glutaminen deutlicher aus als bei der pathogenen Variante mit 80 Glutaminen. Dies beruht wahrscheinlich auf einer geringeren Expression der pathogenen Variante, wie aus Abbildung 34 A ersichtlich wird.

Ein ähnlicher Anstieg des Verhältnisses von MAP3K7E12 zu MAP3K7ΔE12 konnte bei einer reduzierten Fox-2-Menge beobachtet werden (Abbildung 26 B), so dass die Fox-2-Aktivität in FLAG-ATXN1-exprimierenden Zellen vermindert zu sein scheint.

Die Analyse des Spleißens der ATXN2-prä-mRNA ergab, dass die Überexpression von Ataxin-1 auch hier zu einem veränderten Spleißen der ATXN2-prä-mRNA bezüglich Exon 18 führt. Hier war 1,5-2,5mal mehr ATXN2ΔE18-Transkript in den ATXN1-Überexpressionsproben

zu detektieren, als in der Kontrollprobe (Abbildung 35 B, rechte Seite), womit auch das Verhältnis von ATXN2E18 zu ATXN2ΔE18 merklich abnahm (Abbildung 35 B, linke Seite). Dies stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen überein, die bei einer Reduktion von Fox-2 erhalten wurden (Abbildung 26 A). Auch hier fällt auf, dass dieser Effekt bei der pathogenen Variante von Ataxin-1 schwächer ausfiel als bei der nichtpathogenen Variante mit 30 Glutaminen, was wahrscheinlich auf der geringeren Expression der pathogenen Variante beruht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression von Ataxin-1 zu einer Lokalisationsänderung von Fox-2 und zu einer verminderten Aktivität von Fox-2 als Spleiß-Regulator führt. Dies führt interessanterweise zu einem veränderten Verhältnis von ATXN2E18 zu ATXN2ΔE18. Da innerhalb dieser Arbeit demonstriert werden konnte, dass das ATXN2ΔE18-Transkript offensichtlich nicht über den „nonsense-mediated mRNA decay“ abgebaut wird, ist davon auszugehen, dass das entsprechende Transkript translatiert wird. Dafür spricht, dass bei Ensembl seit Juni 2011 ein proteinkodierendes ATXN2ΔE18-Transkript (ENST00000550104) annotiert ist. Eine Translation der ATXN2ΔE18-mRNA würde demnach in einem verkürzten Protein resultieren, welches zudem eine veränderte C-terminale Region aufweist (Abbildung 36 A) und in Ataxin-1-überexprimierenden Zellen verstärkt exprimiert wird. Ein Vergleich der Domänenstruktur von ATXN2 und ATXN2Δ18 zeigt, dass die bekannten Domänen auch in ATXN2ΔE18 wiederzufinden wären. Wie aus Abbildung 36 B ersichtlich wird, besitzt ATXN2ΔE18 am äußersten C-Terminus 16 Aminosäuren, die nicht in der ursprünglichen ATXN2-Sequenz zu finden sind.



**Abbildung 36: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ATXN2 und ATXN2ΔE18.** (A) Dargestellt sind die Polyglutamin-Domäne, die LSM- und LSM-assoziierte Domäne und das PAM2-Motiv. (B) Proteinsequenz-Alignment der C-terminalen Regionen von ATXN2 und ATXN2ΔE18. In Gelb dargestellt sind identische Aminosäuren.

Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es sehr interessant in zukünftigen Arbeiten diese ATXN2ΔE18-Isoform näher zu charakterisieren. Dabei wäre ein spannender Aspekt zu untersuchen, ob bekannte ATXN2-Interaktionen auch mit dieser Variante stattfinden. Außerdem wäre zudem von Interesse, in welchen Geweben diese Isoform exprimiert wird und welche subzelluläre Lokalisation dieses Protein aufweist, da es Hinweise gibt, dass Ataxin-2 auch im Nukleus lokalisiert ist [19, 66]. Unter dem Gesichtspunkt das ein dereguliertes Fox-2-abhängiges

Spleißen sowohl in der Pathogenese der SCA2 als auch der SCA1 eine Rolle spielen könnte, wäre es zudem von Interesse zu untersuchen, inwieweit unterschiedliche Spleiß-Varianten von Ataxin-2 zur Pathogenese beider Erkrankungen beitragen könnten.

## 5 Diskussion

Die zelluläre Funktion des Proteins Ataxin-2, welches verantwortlich ist für die Ausprägung der SCA2, ist bislang noch nicht vollständig verstanden. Erste Hinweise innerhalb der Arbeitsgruppe wiesen aber darauf hin, dass Ataxin-2 möglicherweise mit dem neuronalen Spleiß-Regulator Fox-2 interagiert. Diese Interaktion konnte in der vorliegenden Arbeit, mittels Yeast-Two-Hybrid- und Koimmunopräzipitations-Analysen, bestätigt werden und wurde weitergehend funktionell untersucht, wobei abschließend ein besonderes Augenmerk auf der Rolle dieser Interaktion für die Pathogenese der SCA2 lag. Da Fox-2 auf zellulärer Ebene noch nicht vollständig charakterisiert worden ist, wurde dieses im Zuge dieser Arbeit zunächst eingehender untersucht.

### 5.1 Die Fox-Proteine

Fox-2 gehört zur Familie der Fox-Proteine, welche, wie bereits erwähnt, über das Vorhandensein eines einzelnen spezifischen RNA-Bindemotivs, der RRM-Domäne, definiert werden und mit dem „feminizing on X“ (Fox) Genprodukt in *C. elegans* verwandt sind [169-170]. Zu den humanen Fox-Proteinen werden bisher drei Proteine gezählt, A2BP1 (Ataxin-2-Bindeprotein 1; Fox-1), RBM9 (RNA-binding motif protein 9; Fox-2) und NeuN (Fox-3), denen eine Funktion als gewebsspezifische Regulatoren des alternativen Spleißens zugewiesen wird [167].

Eine Transkription der *FOX*-Gene resultiert in diversen Transkripten und Protein-Isoformen, da gewebespezifische Promotoren verwendet und die Transkripte zudem alternativ gespleißt werden [179, 193-194]. Dabei entstehen Fox-Proteine mit unterschiedlichen N- und C-terminalen Regionen und unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen [193-195].

Diese Spleiß-Varianten der Fox-Proteine weisen aber trotz allem eine konservierte Domänen-Struktur auf. Die RRM-Domäne befindet sich in der zentralen Region der Proteine und ist für die Funktion als Regulatoren des Spleißens essentiell. Die N-terminalen bzw. C-terminalen Regionen sind nicht so stark konserviert. C-terminal besitzen einige Isoformen ein familienspezifisches hydrophobes PY-nukleäres Lokalisationssignal (hPY-NLS), welche die Konsensussequenz RF(A/T)PY besitzt. Konsistent damit lokalisieren viele Isoformen der humanen Fox-Proteine bei Überexpression im Nukleus, wohingegen Leserasterverschiebungen durch alternatives Spleißen in den C-terminalen Regionen zu Proteinen führen, die vorzugsweise im Cytoplasma lokalisiert sind. Inwiefern sich die Funktionen dieser unterschiedlichen Spleiß-Varianten unterscheiden ist bisher allerdings noch nicht wirklich verstanden [181, 193, 196]. Fox-2 besitzt zudem in seiner C-terminalen Region zusätzliche RNA-Bindemotive, die sogenannten RGG-Boxen [179].

Das „RNA recognition motiv“ (RRM) ist eines der häufigsten RNA-Bindemodule und ist in ca. 1% der humanen Gene kodiert [197]. Die RRM-Domäne der Fox-Proteine bindet dabei spezifisch an ein Fox-Bindemotiv, dem RNA-Hexamer UGCAUG [198-199]. Interessanterweise weisen die humanen Fox-Proteine 1 und 2 eine identische RRM-Domäne auf und auch die von Fox-3 (NeuN) unterscheidet sich nur in 4 Aminosäuren. Zudem ist diese Fox-RRM-Domäne in vielen Spezies konserviert [180, 184, 198-199]. Eine globale Computervorhersage auf Grundlage dieses spezifischen Bindemotivs, resultierte in einem Spleiß-Netzwerk der Fox-Proteine, indem mehr als tausend Fox-Zielgene vorhergesagt wurden, von denen viele in neuronalen und muskulären Prozessen involviert sind [168].

Im Einklang damit wurde eine Expression von Fox-1 bisher ausschließlich im Gehirn, im Skelett- und im Herzmuskel nachgewiesen, wohingegen eine Fox-3-Expression nur in Neuronen detektiert werden konnte. Auch Fox-2 wird verstärkt in Neuronen und in Muskelzellen exprimiert, weist aber generell ein breiteres Expressionsmuster als seine Paraloge auf [167, 181, 196, 200]. Speziell im Gehirn werden alle Fox-Proteine ausschließlich in Neuronen exprimiert, wobei für die murinen Homologe mFox-1 und mFox-2 demonstriert werden konnte, dass sie stark in den Purkinjezellen exprimiert werden, die hingegen keine Expression von Fox-3 aufweisen [171, 181].

Mutationen bzw. veränderte Expressionsmuster des Fox-1-Gens werden interessanterweise mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen, wie z.B. schwerer mentaler Retardierung, Epilepsie und Autismus in Zusammenhang gebracht [201-204]. Für Fox-2 ist ein solcher Zusammenhang bisher nicht beschrieben worden.

## ***5.2 Zelluläre Lokalisation von Fox-2***

Innerhalb dieser Arbeit wurde zunächst die subzelluläre endogene Lokalisation von Fox-2 in den Zelllinien MCF-7 und HeLa analysiert. Da unterschiedliche Fox-2-Varianten, wie bereits erwähnt, über verschiedene N- und C-terminale Regionen verfügen, wurden für die endogenen Analysen innerhalb dieser Arbeit zwei Antikörper verwendet (Bethyl Lab. und Abnova), die die N-terminale Region der annotierten Fox-2-Varianten 1, 3 und 4 erkennen, wobei der Antikörper von Bethyl Laboratories zusätzlich Variante 2 erkennt. Aufgrund einer differentiellen N-terminalen Region in den Varianten 5 und 6, werden diese von den beiden hier verwendeten Antikörpern nicht erkannt (Varianten der NCBI-Datenbank).

Bei den mikroskopischen Analysen stellte sich heraus, dass endogenes Fox-2 primär eine nukleäre Lokalisation aufwies, wobei aber auch eine leichte cytoplasmatische Färbung zu beobachten war. Im Nukleus wies Fox-2 in allen Zelllinien eine punktuelle Struktur auf. Konsistent mit seiner Funktion als Regulator des prä-mRNA-Spleißens [181] konnte hier demonstriert werden, dass es sich bei einem Teil dieser punktuellen Strukturen um nukleäre „Speckles“ handelt, da in den mikroskopischen Analysen eine Kolo-kalisation mit den SR-

Proteinen nachgewiesen werden konnte. Nukleäre „Speckles“ liegen in den Interchromatinregionen des Nukleoplasmas vor und werden eingeteilt in zwei unterschiedliche Strukturen, den „Interchromatin Granule Clusters“ (IGC) und den Perichromatin-Fibrillen. Mikroskopisch erscheinen sie daher als irreguläre, punktuelle Strukturen, die in Form und Größe uneinheitlich sind.

Bei den IGCs handelt es sich um dynamische nukleäre Strukturen, in denen Regulatoren des prä-mRNA-Spleißens und die Proteine der Spleiß-Maschinerie angereichert sind und in denen zudem die Bildung von Spleiß-Komplexen ermöglicht wird. Nach Zusammensetzung der „Spliceosomen“ verlassen diese die IGC und werden zu den Perichromatin-Fibrillen rekrutiert, in denen das ko-transkriptionelle Spleißen stattfindet. [172, 174, 205]. Da Fox-2 eine Rolle in der Regulation des Spleißens spielt, ist eine Lokalisation in diesen Strukturen konsistent mit dieser Funktion. Für das Fox-3-Protein, einem Paralog von Fox-2, wurde zudem in Neuronen ebenfalls eine endogene nukleäre Lokalisation mit Aufkonzentrierungen in nukleären „Speckles“ beschrieben [206].

Bei dem Versuch Variante 1 von Fox-2 zu klonieren wurde innerhalb der Arbeitsgruppe eine neue Variante von Fox-2 identifiziert, Fox-2<sub>Cyt</sub>, die sich durch das Vorhandensein des Exons ENSE00001553845 von Variante 1 unterscheidet. Innerhalb dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass dieses Exon ENSE00001553845 zwischen Exon 12 und Exon 13 in Fox-2-Transkripten der Zelllinien HEK293T-, HeLa- und SW620-Zellen exprimiert wird. Diese Insertion von 32 Nukleotiden resultiert in einer Leserasterverschiebung, wodurch eine alternative C-terminale Region generiert wird. Interessanterweise besitzt das daraus resultierende Protein das familienspezifische hydrophobe RF(A/T)PY-Motiv nicht mehr, welches in Fox-2<sub>v1</sub> vorhanden ist. Einhergehend damit konnte demonstriert werden, dass beide Varianten bei Überexpression verschiedene subzelluläre Lokalisationen aufweisen, wobei Fox-2<sub>Cyt</sub> überwiegend cytoplasmatisch und Fox-2<sub>v1</sub> überwiegend nukleär lokalisiert ist. Wie schon erwähnt ist diese neue Variante in dieser Form nicht bei Ensembl annotiert, wobei die annotierten Varianten (ENST00000359369) und (ENST00000338644) ebenfalls dieses Exon besitzen, aber noch nicht eingehender charakterisiert wurden und zudem eine andere N-terminale Region besitzen. Auch hier führt die Insertion zu einer Leserasterverschiebung und der Generierung dieser alternativen C-terminalen Region. Innerhalb der Arbeit von Papin *et al.* wurde zudem eine Fox-2-Isoform aus einer humanen embryonalen cDNA-Bibliothek amplifiziert, die durch die Inklusion eines Exons, dieselbe differente C-terminale Region aufweist wie Fox-2<sub>Cyt</sub> [207]. Zusätzlich dazu wird z.B. in Fox-2 Variante 4 (ENST00000414461) diese C-Terminale Region durch die Exklusion von Exon 12 generiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie eine konservierte Sequenz unterschiedlicher Fox-2-Varianten darstellt.

Ein ähnlicher Mechanismus zur Generierung eines differentiellen C-Terminus ist für murines Fox-1 beschrieben worden. Dabei führt die Insertion des Exons A53 zu einer

Leserasterverschiebung und zu einem Verlust der C-terminalen NLS. Einhergehend damit lokalisierten die entsprechenden Isoformen von Fox-1 nicht mehr primär im Nukleus und weisen zudem eine geringere Aktivität im alternativen Spleißen von prä-mRNA auf [193]. Daher stellt sich die Frage, ob diese vorwiegend cytoplasmatischen Varianten von Fox-2, neben der Regulation des Spleißens von prä-mRNA, möglicherweise zusätzliche Funktionen im mRNA-Metabolismus aufweisen.

Bekannt ist, dass viele RNA-Bindeproteine und Regulatoren des alternativen Spleißens nicht ausschließlich im Nukleus vorliegen, sondern ebenfalls im Cytoplasma und außerdem neben der Regulation des Spleißens an anderen RNA-Prozessen beteiligt sind, wie z.B. dem mRNA-Transport, der mRNA-Stabilität und in der Kontrolle der Translation [208-211]. So konnte z.B. für einige Spleiß-Regulatoren der SR- und der hnRNP-Familie, sowie für TIA-1 und TIAR gezeigt werden, dass sie sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma vorkommen [208, 212-213]. Dabei sind die SR-Proteine SRp20, und 9G8 am Export intronloser RNA beteiligt [174, 214]. Das SR-Protein SF2/ASF wiederum liegt in Assoziation mit den Polyribosomen vor und ist an der Translations-Regulation beteiligt, so dass generell eine cytoplasmatische Funktion für Proteine der SR-Familie diskutiert wird [215]. hnRNP-Proteine spielen ebenfalls eine Rolle im nukleo/cytoplasmatischen Transport von mRNA und besitzen darüber hinaus Funktionen in der Regulation der Translation [209, 216-217]. Die RRM-Proteine TIA-1 und TIAR, welche im Nukleus am prä-mRNA-Spleißen beteiligt sind, spielen im Cytoplasma ebenfalls eine Rolle in der Repression der Translation unter Stress-Bedingungen indem sie ARE- (AU-rich elements) Sequenzen im 3'UTR bestimmter mRNAs binden und diese in die entstehenden „Stress Granules“ sortieren [143, 218-219].

Unter diesem Aspekt ist es äußerst interessant, dass Varianten der Fox-Proteine, wie z.B. Fox-2<sub>Cyt</sub>, existieren, die keine NLS besitzen und deren primäre Lokalisation das Cytoplasma ist [167]. Aufgrund dieser Tatsachen ist anzunehmen, dass Fox-2 eine Rolle neben der Regulation des Spleißens besitzt. In diesem Zusammenhang konnte für das *Xenopus laevis*-Homolog von Fox-2 (XRbm9), welches hauptsächlich im Cytoplasma der Oozyten vorliegt, eine Interaktion mit der cytoplasmatischen atypischen Poly(A)-Polymerase XGld2 beschrieben werden. Beide Proteine sind Bestandteil des cytoplasmatischen Polyadenylierungskomplexes. Hier scheint XRbm9 eine Rolle in der Aktivierung der Translation zu besitzen, indem es die mRNA-Spezifität des Komplexes bestimmt [207].

### ***5.3 Fox-2 ist eine Komponente von „Stress Granules“ und interagiert mit Ataxin-2***

Ein weiterer Hinweis für eine cytoplasmatische Funktion des Proteins ist seine Lokalisation unter Stress-Bedingungen in den cytoplasmatischen „Stress Granules“. Diese Lokalisation von Fox-2 in den „Stress Granules“ konnte dabei auch speziell für die vorwiegend



nukleäre Fox-2-Variante, Fox-2<sub>v1</sub>, gezeigt werden und spricht dafür, dass auch nukleäre Fox-2-Varianten in der Lage sind ins Cytoplasma zu translozieren. Unter diesem Aspekt ist es interessant, dass auch andere Spleiß-Regulatoren wie z.B. TIA-1, TIAR, hnRNP A1 und einige SR-Proteine, unter Stress-Bedingungen Komponenten dieser Strukturen sind [175, 212, 218, 220].

„Stress Granules“ sind cytoplasmatische Strukturen, die unter Stress-Bedingungen in der Zelle gebildet werden und translationell reprimierte mRNA beinhalten. Ihre Bildung wird ausgelöst durch bestimmte Stress-Stimuli, wie z.B. oxidativen, genotoxischen, hyperosmotischen und Hitzeschock, Bedingungen unter denen es zu einem globalen und transienten translationellen Arrest kommt. Dabei existieren unterschiedliche Mechanismen der SG-Bildung. Speziell für osmotischen und Arsenitstress wurde gezeigt, dass eIF2 $\alpha$ , welcher an der Bildung des Translations-Präinitiationskomplexes beteiligt ist, phosphoryliert wird. Dadurch akkumulieren nichtfunktionelle Translations-Initiationskomplexe, welche in den Stress Granules gespeichert werden. Somit wird die Translation inhibiert und „Stress Granules“ entstehen [221].

Unter der Annahme, dass cytoplasmatische Fox-2-Varianten, wie für XRbm9 demonstriert, eine Rolle in der Aktivierung der Translation bestimmter mRNAs spielen könnten, würde eine Rekrutierung Fox-2-beinhaltenen mRNP-Komplexe in diese Strukturen dazu beitragen, die Translation der entsprechenden mRNAs zu reprimieren. Da bekannt ist, dass Fox-2 über seine RRM-Domäne an das spezifische RNA-Hexamere UGCAUG bindet, wäre somit eine Beteiligung an der translationellen Repression UGCAUG-enthaltener Transkripte unter Stress-Bedingungen möglich. Diese These sollte in zukünftigen Analysen weitergehend untersucht werden.

Unter diesem Aspekt ist die hier identifizierte Interaktion von Ataxin-2, einem vorwiegend cytoplasmatischen Protein, und Fox-2, ein weiteres Indiz für eine Rolle von Fox-2 in cytoplasmatischen Prozessen, wie z.B. wie der Translations-Regulation, da wahrscheinlich auch das Polyglutamin-Protein Ataxin-2 in der translationellen Regulation involviert ist und zudem eine essentielle Komponente der „Stress Granules“ darstellt [95, 119, 127].

Die Interaktions-Analysen innerhalb dieser Arbeit ergaben, dass sowohl cytoplasmatische, als auch nukleäre Isoformen von Fox-2 mit Ataxin-2 interagieren, wobei aber offensichtlich unterschiedliche Regionen innerhalb des ATXN2-Proteins die Interaktion mit den unterschiedlichen Isoformen von Fox-2 vermitteln. Hierbei wurde festgestellt, dass Fox-2<sub>Cyt</sub> mit der C-terminalen Region von Ataxin-2 interagiert, welche das PAM2-Motiv beinhaltet. Im Gegensatz dazu, weist die nukleäre Variante Fox-2<sub>v1</sub> primär eine Interaktion mit einem ATXN2-Fusionsprotein im Y2H auf, das die LSm/LSm-assoziierte Domäne von Ataxin-2 umfasst.

Bei dieser Domäne handelt es sich um ein RNA-Bindemotiv, das aber auch an der Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. Einige Studien konnten demonstrieren, dass neben der vorwiegend cytoplasmatischen Lokalisation von Ataxin-2, dieses auch zu einem gewissen Grad im Nukleus der Zelle vorliegt [19, 66, 111, 222], so dass eine Interaktion im

Nukleus möglich wäre. Zudem wurde eine Rolle für Ataxin-2 im Spleißen von prä-mRNA diskutiert, da es diese LSm-Domäne besitzt, die sich aus den Motiven Sm1 und Sm2 zusammensetzt [131]. Sm-Proteine sind z.B. an der Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen über diese Motive beteiligt, welche essentiell für den Aufbau der snRNPs, Komponenten des „Spliceosoms“, sind [131]. Unter diesem Aspekt könnte nukleäres Ataxin-2 mit Fox-2<sub>V1</sub> im Nukleus eine Funktion in der Regulation des prä-mRNA-Spleißens besitzen.

Bemerkenswerterweise wurde auch festgestellt, dass die Überexpression von Fox-2<sub>V1</sub> einen Einfluss auf die Bildung der „Stress Granules“ und damit auch auf die subzelluläre Lokalisation seines Interaktionspartners Ataxin-2 aufweist. Dies lässt sich bei Überexpression der cytoplasmatischen Fox-2-Variante nicht beobachten. Da beide Fox-Varianten mit unterschiedlichen Domänen von Ataxin-2 interagieren, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die Fox-2<sub>V1</sub>-Interaktionsdomäne von Ataxin-2, die Lsm/LsmAD, für die Rekrutierung von Ataxin-2 in die „Stress Granules“ essentiell ist. So könnte man vermuten, dass die Überexpression von Fox-2<sub>V1</sub> zu einer vermehrten Bindung an Ataxin-2 über diese Domäne führt. Dabei konnte in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe schon gezeigt werden, dass Ataxin-2 essentiell für die Bildung dieser Strukturen ist, da eine Reduktion an Ataxin-2 zu einer verminderten Bildung der „Stress Granules“ führt [119, 127]. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Überexpression von Fox-2<sub>V1</sub> und die damit einhergehende verstärkte Interaktion mit Ataxin-2 dazu führt, dass dieses nicht mehr in die „Stress Granules“ rekrutiert werden kann, was folglich zu einer beeinträchtigten Bildung dieser Strukturen führen könnte.

#### ***5.4 Untersuchungen zum Einfluss einer erhöhten Ataxin-2-Menge auf Fox-2***

Wie bereits erwähnt wurde in SCA2-Patienten eine erhöhte Konzentration an Ataxin-2 in den von der Degeneration betroffenen Hirnbereichen festgestellt, so dass dies für die SCA2-Pathogenese von Relevanz zu sein scheint [115, 117]. Zudem konnte für Ataxin-2 eine Rolle als transkriptioneller Koregulator beschrieben werden [66]. Daher wurde innerhalb dieser Arbeit mittels Überexpressionsanalysen überprüft, ob Ataxin-2 eine Rolle in der transkriptionellen Regulation der FOX-2-Expression haben könnte. Zudem wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie der Einfluss einer Ataxin-2-Überexpression auf die subzelluläre Lokalisation seines Interaktionspartners Fox-2 untersucht.

Diese Untersuchungen ergaben, dass die Überexpression sowohl der normalen als auch der expandierten Ataxin-2-Variante im Zellkulturmodell keinen Einfluss auf die Genexpression von Fox-2 aufwies. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Überexpression von Ataxin-2 in HeLa-Zellen zu einer vermehrten cytoplasmatischen Lokalisation von Fox-2 führte. Dies könnte z.B. darauf beruhen, dass nukleäres Fox-2 durch die Überexpression seines Interaktionspartners Ataxin-2 in das Cytoplasma rekrutiert wird. Eine weitere Möglichkeit wäre es, dass vermehrt

cytoplasmatische Fox-2-Varianten exprimiert werden, und damit die Ataxin-2-Überexpression einen Einfluss auf das Spleißen des Fox-2-Transkriptes ausüben könnte. Die RT-qPCR-Analyse ergab keine Erhöhung der *FOX-2*-Genexpression, wobei durch das gewählte Oligonukleotidpaar hierbei allerdings keine Aussagen über die Expression bestimmter Fox-2-Spleiß-Varianten gemacht werden konnte. Somit wäre es in Zukunft interessant zu überprüfen, inwiefern veränderte Ataxin-2-Mengen einen Einfluss auf die Expression unterschiedlicher Fox-2-Varianten besitzt, oder ob es dabei zu einer Rekrutierung nukleärer Fox-2-Varianten ins Cytoplasma kommt.

Dieses Ergebnis könnte für die Pathogenese der SCA2 relevant sein, da hier erhöhte Mengen an Ataxin-2 in den Purkinjezellen beobachtet werden konnten [115, 117]. So könnte die Translokation von nukleärem Fox-2 in das Cytoplasma dazu führen, dass dieses nicht mehr in die Regulation des Spleißens eingreifen kann. Zudem geht aus den Studien von Nakahata *et al.* hervor, dass unterschiedliche Fox-2-Spleißvarianten differente Spleiß-Aktivitäten aufweisen [193], so dass ebenfalls ein verändertes Verhältnis von Fox-2-Spleißvarianten zueinander einen starken Einfluss auf die Regulation Fox-2-abhängiger Spleiß-Ereignisse ausüben würde. Daher sollte dieser Aspekt in Bezug auf die SCA2-Pathogenese weitergehend untersucht werden.

Für das Fox-2-Paralog Fox-1 wurde beschrieben, dass eine Reduktion dieses Proteins einen Einfluss auf die *SCA2*-Genexpression hat [178]. Zudem gibt es Hinweise, dass Fox-2 an der Regulation der Transkription beteiligt ist, da es als negativer Koregulator des Östrogenrezeptors identifiziert wurde [179]. Daher wurde in diesem Zusammenhang auch überprüft, inwiefern veränderte Mengen an Fox-2 einen Einfluss auf die *SCA2*-Expression ausüben. Diese Analysen ergaben keine signifikante Veränderung der *SCA2*-Genexpression bei einer Reduktion der endogenen Fox-2-Konzentration im Zellkulturmodell.

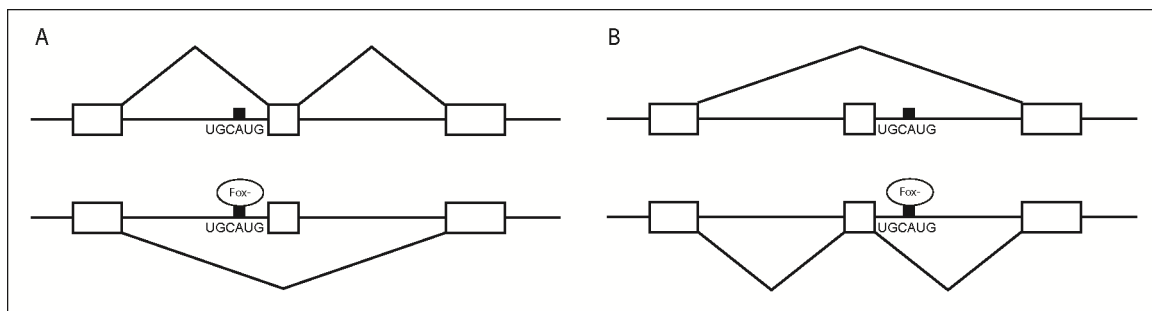
### ***5.5 ATXN2-prä-mRNA besitzt Fox-2-Bindemotive***

Das alternative Spleißen von prä-mRNA ist einer der zentralen Mechanismen, um die Genexpression in Eukaryonten zu regulieren. Dabei werden aus einer prä-mRNA eine Reihe unterschiedlicher mRNAs und damit Protein-Isoformen generiert. Es wird geschätzt, dass ca. 40-60% aller humanen Gene alternativ gespleißt werden, wobei diese Ereignisse oft zelltyp-, gewebe- und entwicklungsabhängig sind [223-226].

Die Familie der Fox-Proteine gehört zu trans-agierenden Regulatoren des Spleißens, die an das cis-regulative Element UGCAUG der prä-mRNA binden. Dabei ist dieses Motiv z.B. involviert in die gewebsspezifische oder entwicklungsspezifische Regulation des alternativen Spleißens, wobei eine starke Anreicherung von UGCAUG in den „downstream“ intronischen flankierenden (DIF) Regionen vieler Hirn- und Muskel-spezifischen Exone gefunden wurde [183, 185]. So wurde z.B. für das neuronenspezifische Exon N30 des NMHC- (non-muscle myosin II

heavy chain-B) Transkriptes bzw. für das Exon N1 des c-src-Transkriptes eine Regulation über dieses Hexanukleotid nachgewiesen [181, 227].

Interessanterweise konnte innerhalb einer genomweiten Analyse zur Identifizierung von Genen, die mindestens ein Fox-Bindemotiv enthalten, ebenfalls das *SCA2*-Gen als Träger dieses hexameren Sequenzelements identifiziert werden [168]. Wie im Ergebnis-Teil beschrieben, ergab die Analyse des *SCA2*-Gens, dass dieses 30 Fox-Bindemotive besitzt. Die Fox-Proteine regulieren die Exklusion bzw. Inklusion spezifischer Exone in Abhängigkeit von der Lokalisation des UGCAUG-Elements in den „upstream“ bzw. „downstream“ intronischen flankierenden (UIF bzw. DIF) Regionen der entsprechenden Exone (Abbildung 37) [167-168, 181, 184]. Die Bindung der Fox-Proteine bewirkt dabei die Exklusion der entsprechenden Exone (Abbildung 37 A), wenn die UGCAUG-Elemente in den UIF-Regionen vorliegen, wohingegen die Inklusion über UGCAUG-Elemente in den DIF-Regionen vermittelt wird (Abbildung 37 B) [167].



**Abbildung 37 : Schematische Darstellung der Fox-2-abhängigen Spleiß-Regulation. (A) Spleiß-Repression durch die Fox-Proteine.** Die Bindung der Fox-Proteine in den UIF-Regionen führt zur Repression des Exon-Spleißens. **(B) Spleiß-Aktivierung durch die Fox-Proteine.** Die Bindung der Fox-Proteine in den DIF-Regionen führt zur Aktivierung des Exon-Spleißens.

Von den 30 hier identifizierten Fox-Bindemotiven befinden sich sechs innerhalb von 250 Nucleotiden in den intronischen flankierenden Sequenzen der Exone 11, 19, 21 und 22.

Innerhalb dieser Arbeit wurde analysiert, inwiefern die zwei UGCAUG-Elemente in der DIF-Region von *ATXN2* Exon 18 einen Einfluss auf den Einbau dieses Exons in das *ATXN2*-Transkript besitzen. Dabei konnte interessanterweise ein Fox-2-abhängiges Spleiß-Ereignis der *ATXN2*-prä-mRNA bezogen auf Exon 18 identifiziert werden. Das entsprechende *ATXN2*ΔE18-Transkript konnte innerhalb dieser Arbeit mittels PCR-Analyse in unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen werden. Ebenso konnte demonstriert werden, dass eine Reduktion der endogenen Fox-2-Konzentration in HEK293T- und HeLa-Zellen zu einer vermehrten Exklusion von *ATXN2* Exon 18 führt, so dass anzunehmen ist, dass es sich hier normalerweise, bedingt durch die UGCAUG-Elemente im DIF-Bereich von Exon 18, um ein Fox-2-vermitteltes Spleiß-Ereignis handelt.

Um sicher zu gehen, dass das Spleißen von Exon 18 im *ATXN2*-Transkript auf einer direkten Bindung von Fox-2 an diese UGCAUG-Elementen beruht, sollte diese Bindung in

zukünftigen Versuchen über RNA ChIP- Analysen validiert werden. Zudem könnte durch Mutationsexperimente in den Fox-Bindemotiven der ATXN2-mRNA untersucht werden, ob dieses einen Einfluss auf die Regulation von Exon 18 besitzt.

Unter diesem Gesichtspunkt ist es interessant, dass bereits Ataxin-2- Spleißvarianten beschrieben wurden. Dabei ist das selektive Spleißen von Exon 10, 11 bzw. 21 identifiziert worden. Exon 21 der humanen ATXN2-prä-mRNA wird alternativ gespleißt, wobei dieses Transkript ubiquitär exprimiert wird (Isoform IV). Die Exklusion von Exon 10 der ATXN2-prä-mRNA konnte von Sahba *et al.* identifiziert werden. Das ATXN2 $\Delta$ E10-Transkript (Isoform II) wird in nichtneuronalen Geweben in ähnlichem Ausmaß wie Isoform I exprimiert wird. Im Hirn dagegen wird diese Isoform II stärker exprimiert als Isoform I und dies betrifft auch speziell das Zerebellum [116]. Diese beiden alternativen ATXN2-Spleiß-Varianten konnten auch in Mäusen identifiziert werden. Hier wurde zusätzlich dazu noch eine Variante gefunden, in der zusätzlich zu Exon 10 noch Exon 11 exkludiert war [107-108, 116]. Eine funktionelle Analyse dieser Spleiß-Varianten ist bis *dato* noch nicht durchgeführt worden. Das hier identifizierte Fox-2-vermittelte Spleiß-Ereignis des ATXN2-Transkripts ist besonders in der Hinsicht bemerkenswert, dass murines Fox-2, wie auch Ataxin-2, stark in den zerebellären Purkinjezellen exprimiert wird [167, 171]. Somit sollte in zukünftigen Analysen überprüft werden, inwiefern diese ATXN2 $\Delta$ E18-Variante im Gehirn, und hier speziell in den Purkinjezellen, exprimiert wird.

Im Vergleich mit anderen Geweben, scheint speziell im Gehirn alternatives Spleißen vermehrt zur Proteom-Diversität beizutragen [76]. So werden z.B. die prä-mRNAs unterschiedlicher Rezeptorklassen, wie z.B. Serotonin-, Dopamin- und GABA-Rezeptoren, alternativ gespleißt, wodurch deren Aktivität oder zelluläre Lokalisation stark beeinflusst wird [228]. Eine Deregulation dieser Prozesse kann zu zellulären Dysfunktionen und Erkrankungen führen [229-231]. Man geht inzwischen davon aus, dass 50% aller krankheitsverursachenden Mutationen das Spleißen betreffen [231]. Dabei sind sowohl cis-regulative Elemente betroffen, so dass die entsprechende prä-mRNA differentiell gespleißt wird, als auch trans-agierende Faktoren, die das Spleißen mehrerer Transkripte regulieren [231]. Unter diesem Aspekt könnte eine veränderte Regulation Fox-2-abhängiger Spleiß-Ereignisse, und speziell des ATXN2-Transkriptes, zur Pathogenese der SCA2-Erkrankung beitragen. So wird diskutiert, dass in SCA2-Patienten eine erhöhte Menge an ATXN2 vorliegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass eine ATXN2-Überexpression in einer vermehrt cytoplasmatischen Lokalisation von Fox-2 resultierte. Dabei ist bekannt, dass Fox-2-Varianten unterschiedliche Aktivitäten im Spleißen von prä-mRNAs aufweisen [193]. Aus diesem Grund könnte diese Lokalisationsänderung zu einer verringerten Fox-2-Aktivität führen und z.B. vermehrt ATXN2 $\Delta$ E18-Transkripte exprimiert werden. Dieser Aspekt sollte weitergehend untersucht werden.

### 5.5.1 *ATXN2A Exon 18 wird nicht über den NMD abgebaut*

Das Spleißen bestimmter Exone kann zur Einführung eines speziellen vorzeitigen Stop-Codons (PTC) führen. Diese Transkripte werden normalerweise über den „nonsense-mediated mRNA decay“ abgebaut. Dies kann einen autoregulativen Mechanismus der Zellen darstellen, um die Genexpression zu regulieren [182, 190]. Andererseits führt aber auch abberantes Spleißen durch Mutationen in cis-Elementen bzw. in trans-agierenden Proteinen zur Einführung dieser PTCs [190]. Somit stellt der NMD auch einen zellulären Überwachungsmechanismus dar, der PTC-enhaltene mRNAs erkennt und sie dem Abbau zuführt, so dass keine C-terminal verkürzten Proteine, die zum Teil dominant negative Effekte oder veränderte Protein-Eigenschaften aufweisen können, exprimiert werden [190, 232].

Da die Exklusion dieses Exons 18 zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stop-Codon führt, wurde ebenfalls untersucht, inwiefern dieses ATXN2 $\Delta$ E18-Transkript über den NMD abgebaut wird.

Die Reduktion von UPF1, einer essentiellen Komponente des NMD, hat dabei keinen positiven Einfluss auf die Stabilität des ATXN2 $\Delta$ E18-Transkriptes. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das entsprechende Transkript normalerweise nicht über den NMD degradiert wird und wahrscheinlich translatiert wird. Dafür spricht auch, dass in der letzten Aktualisierung von Ensembl (Juni 2011) eine proteinkodierende ATXN2 $\Delta$ E18-Transkriptvariante annotiert wurde.

Eine Translation dieses ATXN2 $\Delta$ E18-Transkriptes würde zu einer verkürzten Ataxin-2-Variante (995 AS) führen, die einen differentiellen C-Terminus aufweisen würde. Die bisher bekannten Domänen, die Polyglutamin-Domäne, die LSM/LSM-assoziierte Domäne und das PAM2-Motiv, wären in dieser Variante weiterhin enthalten. Allerdings führt die Exklusion von Exon 18 zu einer Leserasterverschiebung, so dass ein Protein entsteht, welches 16 differente Aminosäuren in der äußersten C-terminalen Region besitzt. Um nachzuweisen, dass diese ATXN2-Variante wirklich translatiert wird, sollte in zukünftigen Analysen mittels Massenspektrometrie das Protein selbst in humanen Zellen nachgewiesen werden. Zudem wäre es aufschlussreich zu untersuchen, ob die bisher bekannten Interaktionspartner von Ataxin-2 auch mit der  $\Delta$ E18-Variante interagieren. Dabei wären die z.B. Proteine Fox-1 (A2BP1) und Fox-2<sub>Cyt</sub> von besonderem Interesse, da diese beiden Proteine mit der C-terminalen Region von Ataxin-2 interagieren, die in der neuen Variante stark verkürzt ist.

Da Fox-2 oft neuronenspezifische Spleiß-Ereignisse reguliert und es zudem stark im Nukleus von Purkinje-Zellen exprimiert wird [167, 171], sollte zudem untersucht werden, inwiefern die ATXN2 $\Delta$ E18-Isoform im Vergleich zur ATXN2E18-Isoform in unterschiedlichen Neuronenpopulationen exprimiert wird. Außerdem wäre es interessant zu untersuchen, ob in den Purkinje-Zellen von SCA2-Patienten Unterschiede im Verhältnis beider Varianten zu einander

verzeichnet werden können, da die ATXN2-Überexpressionanalysen nahelegen, dass es unter diesen Bedingungen zu einer veränderten Lokalisation bzw. unterschiedlichen Expression von Fox-2-Varianten kommt, was eine veränderte Fox-2-Aktivität in der SCA2-Pathogenese bedeuten würde. Dieser Aspekt wird zukünftig in Patientenmaterial eingehender analysiert.

## ***5.6 Untersuchungen zur Interaktion von Fox-2 und Ataxin-1***

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Ataxin-1, dem auslösenden Protein der Spinocerebellären Ataxie Typ 1 [233]. Da das Polyglutamin-Protein Ataxin-1 in einem funktionellen Zusammenhang mit Ataxin-2 steht und Ataxin-2 zudem einen Einfluss auf die Pathogenese der SCA1 besitzt [19], wurde innerhalb dieser Arbeit, die, von Lim *et al.* vorhergesagte Interaktion, zwischen Fox-2 und Ataxin-1 zunächst validiert. Ein weiterer Focus lag darin zu überprüfen, ob Fox-2, wie es für weitere Ataxin-1-Interaktionspartner schon beschrieben wurde, auch in die nukleären ATXN1-Inklusionen rekrutiert wird. Zudem sollte überprüft werden, ob der beschriebene modifizierende Effekt von Ataxin-2 in der SCA1-Pathogenese in einem Zusammenhang mit den beobachteten Ergebnissen stehen könnte.

### ***5.6.1 Fox-2 interagiert mit Ataxin-1***

Wie bereits erwähnt, weisen bisherige Untersuchungen dem Protein Ataxin-1 eine Rolle in der transkriptionellen Regulation und der Regulation des Spleißens zu [51, 69-70]. Neben seiner N-terminalen Polyglutamin-Domäne besitzt das Protein eine AXH-Domäne, bei der es sich um ein RNA-Bindemotiv handelt, über die aber auch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden. Das ATXN1-Paralog, BOAT (brother of ataxin-1), und einige transkriptionelle Regulatoren, wie SMRT (Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor), Gfi1 (Growth factor independent protein 1), Capicua und der ROR $\alpha$ /Tip60-Komplex interagieren über die AXH-Domäne mit Ataxin-1 [46].

Die Interaktion zwischen Fox-2 und Ataxin-1 konnte innerhalb dieser Arbeit mittels direkter Yeast-2-Hybrid- und Koimmunopräzipitations-Analyse bestätigt werden, so dass offensichtlich Fox-2 sowohl mit Ataxin-2 als auch mit Ataxin-1 interagiert. Vermittelt wird die Interaktion von der N-terminalen Region von Ataxin-1, wobei sie sowohl mit 30 als auch mit 82 Glutaminen nachzuweisen war. Inwiefern die Interaktion durch einen verlängerten Polyglutamin-Bereich beeinträchtigt bzw. verstärkt ist, konnte mit Hilfe der hier verwendeten Analysen nicht überprüft werden, da diese keine Quantifizierung der Interaktionsstärke erlaubte. Dieser Aspekt sollte aber in weiterführenden Analysen eingehender untersucht werden, da veränderte Interaktionen in der Pathogenese der SCA1 eine Rolle zu spielen scheinen. So interagiert die expandierte Form von Ataxin-1 z.B. verstärkt bzw. abgeschwächt mit LANP (leucine-rich acidic nuclear protein), USP7 (ubiquitin specific protein 7), Capicua und RBM17 [78, 234-235]. Zudem ist es bekannt, dass eine Expansion im Polyglutamin-Bereich auch Auswirkungen auf andere

regulative Bereiche von Ataxin-1 besitzt. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese einen Einfluss auf die Interaktion von Fox-2 und Ataxin-1 besitzen. So weiß man z.B. dass die Phosphorylierung eines bestimmten Serinrestes von Ataxin-1 (S776) für die Pathogenese von Bedeutung ist und auch einen Einfluss auf bestimmte Interaktionen besitzt. Dabei kommt es im Falle von RBM17 zu einer verstärkten Interaktion mit phosphoryliertem Ataxin-1, wohingegen die Interaktion mit U2AF65 (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2) bei Phosphorylierung dieses Serinrestes reduziert ist [69]. Dieser putative Einfluss anderer Bereiche des Ataxin-1-Proteins auf die Interaktion mit Fox-2, konnte mit dem hier verwendeten Yeast-Two-Hybrid-System ebenfalls nicht analysiert werden.

Ein weiterer Aspekt ist die Interaktion von Ataxin-1 mit der cytoplasmatischen Fox-2-Variante Fox-2<sub>Cyt</sub>. Innerhalb dieser Arbeit wurde die subzelluläre endogene Lokalisation von Ataxin-1 in HeLa-Zellen eingehender untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Ataxin-1 zum größten Teil im Nukleus nachzuweisen war, indem es mit seinem Interaktionspartner Fox-2 kolokalisierte. Zusätzlich dazu konnte aber ebenfalls eine leichte cytoplasmatische Färbung des Proteins in HeLa-Zellen beobachtet werden. Irwin *et al.* konnten in diesem Zusammenhang ebenfalls demonstrieren, dass überexprimiertes Wildtyp-Ataxin-1 ein vorwiegend nukleäres Protein ist, welches aber zu einem gewissen Grad im Cytoplasma der Zellen vorliegt [78].

Somit besteht die Möglichkeit, dass cytoplasmatische Varianten von Fox-2 in diesem Kompartiment mit Ataxin-1 interagieren und Ataxin-1 eine bisher unbekannt Funktion im Cytoplasma besitzt. Interessanterweise ist bereits bekannt, dass expandiertes Ataxin-1 nicht mehr in der Lage ist in das Cytoplasma zu translozieren [78], so dass dies einen Einfluss auf die Interaktion von Ataxin-1 und cytoplasmatischen Fox-2-Varianten ausüben dürfte. Dies könnte für die Pathogenese der SCA1-Erkrankung relevant sein und müsste weitergehend analysiert werden.

Zudem konnte in den mikroskopischen Analysen festgestellt werden, dass Ataxin-1 wahrscheinlich auch eine Komponente der cytoplasmatischen „Stress Granules“ ist, da es unter Stress-Bedingungen mit Fox-2 in cytoplasmatischen granulären Strukturen kolokalisierte. Dies müsste in weiterführenden Analysen aber noch mit klassischen „Stress-Granule“-Markerproteinen wie z.B. TIA-1, TIAR oder PABP überprüft werden.

### **5.6.2 Fox-2 akkumuliert in den nukleären Ataxin-1-Inklusionen**

Ein Charakteristikum der SCA1-Pathogenese ist das Vorhandensein intranukleärer Inklusionen in Neuronen der Patienten [191]. Diese entstehen sowohl bei Überexpression der normalen als auch der expandierten Variante von Ataxin-1 in Zellkultur- und Tiermodellen. Ein interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass die Überexpression der normalen Variante von Ataxin-1 ebenfalls toxisch ist und in einem Fliegenmodell zu einer Degeneration von Neuronen führt [25, 236]. Daher wird diskutiert, ob es sich bei diesen Inklusionen überhaupt um klassische Polyglutamin-Aggregate handelt [80, 191]. Die Bildung der Ataxin-1-Inklusionen ist RNA-



abhängig und abhängig von aktiver Transkription. Sowohl Wildtyp-Ataxin-1 als auch expandiertes liegen in diesen Strukturen nicht statisch vor, sondern bewegen sich zwischen diesen Strukturen und dem Nukleoplasma [69, 78-80]. Irwin *et al.* stellten die Vermutung auf, dass es sich bei den nukleären ATXN1-Inklusionen nicht um Protein-Aggregate *per se*, bestehend aus fehlgefalteten Protein, handelt, sondern um Orte hoher lokaler Ataxin-1-Konzentrationen, die mit einer hohen Transkriptionsaktivität assoziiert sind. Eine mögliche Funktion von Ataxin-1 könnte somit in der Prozessierung oder dem Transport von spezifischen mRNAs von den Orten der Transkription bestehen [78]. Dabei besitzt expandiertes Ataxin-1 veränderte RNA-Binde-Eigenschaften [79].

Bemerkenswerterweise führt die Überexpression von normalem und expandiertem Ataxin-1 in mehreren humanen Zelllinien auch zu einer Rekrutierung von Fox-2 in diese Strukturen. Dieses Ergebnis konnte auf die nukleäre Variante Fox-2<sub>v1</sub> und die cytoplasmatische Variante Fox-2<sub>cyt</sub> ausgeweitet werden. Dabei konnte auch für weitere Interaktionspartner von Ataxin-1, wie z.B. RBM17, TAP/NXF1 (nuclear RNA export factor 1), ATXN2, U2AF65 und Cu/Zn-SOD (Cu/Zn-superoxide dismutase) schon eine Rekrutierung in die nukleären Ataxin-1-Inklusionen beobachtet werden [19, 69, 78, 82, 191-192].

Da es sich bei RBM17 und U2AF65 ebenfalls um Regulatoren des prä-mRNA-Spleißens handelt, stellte sich somit die Frage, ob es zu einer generellen Rekrutierung von Komponenten dieses RNA-Prozessierungsweges kommt. Innerhalb der Studie von Skinner *et al.* wurde die Lokalisation des Spleiß-Regulators SC35 überprüft, für den gezeigt werden konnte, dass er nicht in diesen Strukturen lokalisierte [191]. Zudem konnte innerhalb meiner Arbeitsgruppe von Christian Kaehler demonstriert werden, dass andere Spleiß-Regulatoren, wie z.B. TIAR und TIA-1, ebenfalls nicht in diesen Strukturen nachzuweisen sind (Welzel *et al.*, eingereicht). Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese veränderte Fox-2-Lokalisation auf einer Interaktion mit Ataxin-1 beruht.

Ein bemerkenswerter Aspekt ist es, dass eine veränderte Aktivität der, mit Ataxin-1 interagierenden, Spleiß-Regulatoren für die SCA1-Erkrankung diskutiert wird. So konnte für das RNA-Binde-Protein RBM17, welches eine Rolle im alternativen Spleißen von prä-mRNA spielt [81], eine verstärkte Interaktion mit expandiertem Ataxin-1 beobachtet werden, wodurch es offensichtlich in diese Strukturen rekrutiert wird. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass eine Deregulation RBM17-abhängiger Spleiß-Ereignisse zur Pathogenese der SCA1 beiträgt [69]. Im Einklang mit dieser Vermutung konnte auch beobachtet werden, dass eine Überexpression von RBM17 in einem SCA1-Fliegenmodell zu einem schwereren Verlauf der Erkrankung führt [69]. Ein weiterer Aspekt der annehmen lässt, dass eine Deregulation des Spleißens in der SCA1-Pathogenese involviert ist, ist die Interaktion von Ataxin-1 mit U2AF65, einer Komponente des „Spliceosoms“ [82]. Hierbei führt die Überexpression von Wildtyp-Ataxin-1 zu einem verstärkten U2AF65-abhängigen Spleißen, wohingegen expandiertes Ataxin-1 diesen Effekt nicht hervorrief

[82]. Somit scheint es auch hier wahrscheinlich, dass eine veränderte Interaktion des expandierten Proteins mit U2AF65 zur Pathogenese der SCA1-Erkrankung beiträgt [82].

Da die Überexpression von Ataxin-1 auch zu einer veränderten Lokalisation seines Interaktionspartners Fox-2 führte, wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, inwiefern Fox-2-abhängiges Spleißen auch von dieser Mislokalisierung verändert ist.

Die Analyse des Fox-2-abhängigen Spleißens bei ATXN1-Überexpression ergab, dass sowohl die Überexpression von normalen als auch von pathogenen Ataxin-1 dazu führte, dass das Fox-2-abhängige Spleißen von MAP3K7 Exon 12 eingeschränkt ist. Da ein Fox-2-abhängiges Spleiß-Ereignis der ATXN2-prä-mRNA identifiziert und bestätigt werden konnte, wäre daher zu erwarten, dass der Funktionsverlust von Fox-2 in ATXN1-überexprimierenden Zellen auch zu einem veränderten Spleißen von ATXN2-prä-mRNA führt. Dies konnte interessanterweise innerhalb dieser Arbeit auch bestätigt werden, da die ATXN1-Überexpression zu einer vermehrten Exklusion von Exon 18 in der ATXN2-mRNA führte.

Somit konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die Überexpression von Wildtyp-Ataxin-1 als auch von expandiertem einen negativen Einfluss auf die Aktivität des Spleiß-Regulators Fox-2 besitzt. Dabei könnte sich die Interaktion beider Proteine regulativ auf die Funktion von Fox-2 auswirken, so dass die Überexpression von Ataxin-1 einen Einfluss auf die Fox-2-Aktivität besitzt. Andererseits könnte aber auch die Rekrutierung von Fox-2 in diese Strukturen *per se* zu einem Funktionsverlust führen, da Fox-2 nicht mehr im Nukleoplasma-Pool zur Verfügung steht.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine Fehlfunktion von Fox-2 ebenfalls zur Pathogenese der SCA1-Erkrankung beitragen könnte. Daher sollte dieser Aspekt in zukünftigen Analysen weiter untersucht werden.

### ***5.7 Spleiß-Defekte in Spinozerebellären Ataxien***

Wie aus der vorliegenden Arbeit deutlich wird, besteht ein funktioneller Zusammenhang von Fox-2 mit den beiden Ataxie-auslösenden Proteinen Ataxin-2 und Ataxin-1. Wie schon erwähnt, wird murines Fox-2 im Gehirn ausschließlich in Neuronen exprimiert, wobei es interessanterweise in den Purkinjezellen eine sehr starke Expression aufweist [167, 171, 181, 196, 200]. Diese Neuronenpopulation ist in den spinozerebellären Ataxien Typ 1 und 2 am stärksten von der Neurodegeneration betroffen [3, 7]. Unter diesem Aspekt, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass Fox-2-abhängiges Spleißen an der Pathogenese beider Erkrankungen beteiligt sein könnte. Dabei könnte die veränderte Funktion dieses RNA-Bindeproteins viele alternativ gespleißte Transkripte betreffen, aber auch speziell das ATXN2-Transkript.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zudem darauf hin, dass dieses ATXN2 $\Delta$ E18-Transkript wahrscheinlich translatiert wird. Unter dem Aspekt, dass Ataxin-2 im SCA1-

Fliegenmodell und in pontinen Neuronen von SCA1-Patienten vermehrt im Nukleus nachgewiesen werden konnte [19], könnte man spekulieren, dass andere Spleiß-Varianten von Ataxin-2 vorwiegend im Nukleus lokalisieren. Dafür spricht, dass selbst bei einer Überexpression der Isoform I von Ataxin-2, dieses ausschließlich zu einer cytoplasmatischen Lokalisation des Proteins führt, obwohl endogene Daten zeigen, dass Ataxin-2 auch nukleär lokalisiert ist und zudem eine Komponente eines nukleären Transkriptionskomplexes ist [66]. Damit wäre es eine Möglichkeit, dass alternativ gespleißte Isoformen andere subzelluläre Lokalisationen und Funktionen aufweisen. Da auch in den Purkinjezellen von SCA2-Patienten eine teilweise nukleäre Lokalisation beobachtet wurde [115, 117], sollte sowohl im Falle der SCA1 und als auch der SCA2 die veränderte Expression von ATXN2-Spleiß-Varianten eingehender untersucht werden.

Bemerkenswerterweise konnte auch ein modifizierender Effekt von Ataxin-2 auf die SCA3-Pathogenese in einem *Drosophila*-Modell beobachtet werden [163-164]. Dabei konnte auch hier Ataxin-2 in den SCA3-Inklusionen im Nukleus nachgewiesen werden, so dass auch in dieser Erkrankung eine mögliche Beteiligung unterschiedlicher Ataxin-2-Varianten eine Rolle spielen könnte [163-164]. Zudem weist das SCA3-Genprodukt, Ataxin-3, selbst eine hohe Variabilität in seinen Genprodukten auf, da die Ataxin-3-prä-mRNA alternativ gespleißt wird [79, 237]. Dabei konnte von Harris *et al.* demonstriert werden, dass diese unterschiedlichen Isoformen des deubiquitinierenden Proteins ähnliche enzymatische Aktivitäten aufweisen, aber signifikante Unterschiede in den Aggregationseigenschaften besitzen, was zur Pathogenese der SCA3 beitragen dürfte [238]. Auch im Falle der spinocerebellären Ataxie Typ 7 wurde eine neue Spleiß-Variante des SCA7-Transkripts nachgewiesen. Das daraus resultierende Protein Ataxin-7b wird dabei überwiegend im ZNS exprimiert [239].

Das SCA6-Polyglutamin-Protein CACNA1A weist ebenfalls verschiedene alternative Spleiß-Varianten auf. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei dem Protein CACNA1A um eine porenformende  $\alpha_1$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalziumkanals  $Ca_v2.1$ , der im gesamten Gehirn und im Rückenmark exprimiert wird. Die CACNA1A-mRNA wird alternativ gespleißt, so dass unterschiedliche Isoformen des Kanals generiert werden, die verschiedene neuronale Expressionsmuster und subzelluläre Lokalisationen aufweisen. Ein wichtiger Aspekt dabei ist es, dass nicht alle CACNA1A -Spleiß-Varianten den C-terminalen Polyglutamin-Bereich besitzen. Die entsprechenden Isoformen mit und ohne Polyglutamin-Domäne werden in den von der Degeneration betroffenen Purkinje-Zellen exprimiert, wobei eine Expression von expandierten Formen einen Einfluss auf das Spleißen der eigenen mRNA hat, so dass vermehrt Varianten exprimiert werden, die den C-terminalen Glutaminbereich besitzen [240-241].

Somit sollte in zukünftigen Arbeiten zur Pathogenese der Polyglutamin-Erkrankungen vermehrt die unterschiedlichen Spleiß-Varianten der ursächlichen Proteine mit einbezogen werden. Auch könnten Spleiß-Varianten einiger Polyglutaminproteine, wie z.B. Ataxin-2, einen

Einfluss auf die Pathogenese anderer Polyglutamin-Erkrankungen oder auch anderer neurodegenerativer Erkrankungen aufweisen.

Dafür spricht z.B. die direkte Interaktion von Ataxin-2 mit TDP-43. TDP-43 gehört zur Familie der hnRNP-Proteine und ist ebenfalls ein Spleiß-Regulator [242-243]. Wie schon erwähnt, sind Mutationen im TDP-43-Gen die Ursache einiger familiärer ALS-Erkrankungen [244]. Da dieses Protein mit weiteren neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurde, führten Sephton *et al.* eine Studie zur Identifizierung von neuronalen Ziel-RNAs dieses RNA-Bindeproteins durch. Dabei wurden erstaunlicherweise auch die mRNAs von Ataxin-1 und Ataxin-2 als Ziele von TDP-43 identifiziert, so dass auch hier eine Deregulation im Spleißen dieser mRNAs zur Pathogenese der ALS beitragen könnte [150, 245-246]. Wie schon erwähnt konnte für Ataxin-2 zudem ein Einfluss auf die TDP-43-vermittelte Toxizität in einem *Drosophila*-Modell identifiziert werden, was diese Möglichkeit zusätzlich bestärkt [161].

## 6 Zusammenfassung

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2) gehört zu den Polyglutamin-Erkrankungen und wird durch eine exonische CAG-Expansion im *SCA2*-Gen verursacht. Die Funktion des *SCA2*-Genprodukts Ataxin-2 ist bis *dato* noch nicht vollständig verstanden. Aufgrund bisheriger Daten scheint Ataxin-2 jedoch in der Endozytose und in RNA-Prozessen eine Rolle zu spielen und ist zudem eine Komponente der cytoplasmatischen „Stress Granules“, die an der translationellen Repression unter Stress-Bedingungen beteiligt sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die putative Interaktion von Ataxin-2 mit dem neuronalen Spleiß-Faktor Fox-2 zu untersuchen. Nach der erfolgten Validierung dieser Interaktion wurde diese eingehender charakterisiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Fox-2 eine Komponente der „Stress Granules“ ist. Bemerkenswerterweise führt die Überexpression einer nukleären Fox-2-Variante unter Stress-Bedingungen zu einer beeinträchtigten Bildung dieser Strukturen.

Desweiteren konnte eine Veränderung der subzellulären Fox-2-Lokalisation bei der Überexpression von Ataxin-2 beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen war Fox-2 vermehrt im Cytoplasma der Zellen nachzuweisen, was mit seiner Funktion als Spleiß-Regulator interferieren könnte; ein Aspekt der auch für die Pathogenese der SCA2 von Bedeutung sein könnte, da hier erhöhte Ataxin-2-Konzentrationen eine Rolle zu spielen scheinen.

Zudem zeigte sich, dass die *ATXN2*-prä-mRNA zwei Fox-Bindemotive in der flankierenden Region von Exon 18 beinhaltet. Dabei konnte innerhalb dieser Arbeit demonstriert werden, dass Fox-2 an der Regulation des Spleißens von Exon 18 beteiligt ist.

Ein weiterer Focus dieser Arbeit lag in der Validierung und Charakterisierung der Interaktion von Fox-2 und Ataxin-1, einem Polyglutaminprotein das für die Ausbildung der Spinozerebellären Ataxie Typ 1 verantwortlich ist. Dieser Aspekt ist von Interesse, da Ataxin-2 direkt mit Ataxin-1 interagiert und zudem einen modifizierenden Effekt auf die *SCA1*-Pathogenese besitzt.

Die Interaktion zwischen Fox-2 und Ataxin-1 konnte validiert werden. Zudem stellte sich heraus, dass die Überexpression von Ataxin-1 in einer veränderten Lokalisation von Fox-2 resultierte. Bemerkenswerterweise führt diese Mislokalisierung von Fox-2 zu einem veränderten Fox-2-abhängigen Spleißen des *MAP3K7*- und *ATXN2*-Transkripts.

Somit besteht die Möglichkeit, dass eine veränderte Aktivität des neuronalen Spleiß-Regulators Fox-2 einen Einfluss auf die Pathogenese der SCA2 sowie der SCA1 besitzt.

## 7 Summary

Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) belongs to the family of polyglutamine disorders and is caused by an exonic CAG-expansion in the *SCA2* gene. The cellular function of the *SCA2* gene product ataxin-2 is not yet completely understood, but it is likely to play a role in endocytosis and RNA- processing. In addition, ataxin-2 is a component of cytoplasmatic stress granules, which are sites where untranslated mRNA is stored during stress conditions.

The aim of this work was to analyze the putative interaction of ataxin-2 with the neuronal splicing regulator Fox-2. In this work, the interaction of Fox-2 and ataxin-2 was validated and characterized. In this line, Fox-2 was identified as a novel component of the cytoplasmic stress granules. Notably, overexpression of a nuclear Fox-2 variant affected the assembly of stress granules under stress conditions.

Furthermore, an increased expression of ataxin-2, a condition existing in brain tissue of SCA2 patients, influenced the subcellular localization of Fox-2. Under these conditions, the cytoplasmic localization of Fox-2 was more evident. Thus, this aspect could have an impact on the SCA2 pathogenesis.

Analysis of intronic sequences of the *SCA2* gene revealed two FOX-2 binding motives in the flanking region of exon 18. In this line, it could be demonstrated that Fox-2 is indeed involved in the splicing regulation of exon 18.

Another aspect of this work was to validate the predicted interaction between Fox-2 and ataxin-1, the disease-causing protein of the spinocerebellar ataxia type 1. This was of interest as a direct interaction between ataxin-2 and ataxin-1 was demonstrated. Additionally, ataxin-2 was found to be a modifier of SCA1 pathology.

Moreover, overexpression of ataxin-1 causes an altered Fox-2 localization. Interestingly, this mislocalization led to a modified splicing of Fox-2 target mRNAs, namely MAP3K7 and ataxin-2.

Therefore, an altered Fox-2 activity is likely to contribute to the pathogenesis of SCA2 as well as SCA1.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Bauer, P.O. and N. Nukina, *The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies*. J Neurochem, 2009. **110**(6): p. 1737-65.
2. Reddy, P.S. and D.E. Housman, *The complex pathology of trinucleotide repeats*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(3): p. 364-72.
3. Cummings, C.J. and H.Y. Zoghbi, *Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. **1**: p. 281-328.
4. Li, L.B. and N.M. Bonini, *Roles of trinucleotide-repeat RNA in neurological disease and degeneration*. Trends Neurosci, 2010. **33**(6): p. 292-8.
5. Kumar, R., et al., *Role of the androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer, and spinal and bulbar muscular atrophy*. Life Sci, 2011. **88**(13-14): p. 565-71.
6. Schols, L., et al., *Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis*. Lancet Neurol, 2004. **3**(5): p. 291-304.
7. Hands, S.L. and A. Wytttenbach, *Neurotoxic protein oligomerisation associated with polyglutamine diseases*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(4): p. 419-37.
8. Schols, L., et al., *Spinocerebellar ataxia type 6: genotype and phenotype in German kindreds*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1998. **64**(1): p. 67-73.
9. Matilla-Duenas, A., et al., *Cellular and molecular pathways triggering neurodegeneration in the spinocerebellar ataxias*. Cerebellum, 2010. **9**(2): p. 148-66.
10. Bates, G., *Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease*. Lancet, 2003. **361**(9369): p. 1642-4.
11. Davies, S.W., et al., *Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation*. Cell, 1997. **90**(3): p. 537-48.
12. DiFiglia, M., et al., *Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain*. Science, 1997. **277**(5334): p. 1990-3.
13. Ross, C.A. and M.A. Poirier, *Protein aggregation and neurodegenerative disease*. Nat Med, 2004. **10** Suppl: p. S10-7.
14. Imarisio, S., et al., *Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies*. Biochem J, 2008. **412**(2): p. 191-209.
15. Koyano, S., et al., *Paradoxical absence of nuclear inclusion in cerebellar Purkinje cells of hereditary ataxias linked to CAG expansion*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002. **73**(4): p. 450-2.
16. Mallik, M. and S.C. Lakhotia, *Modifiers and mechanisms of multi-system polyglutamine neurodegenerative disorders: lessons from fly models*. J Genet, 2010. **89**(4): p. 497-526.
17. Chou, A.H., et al., *Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation*. Neurobiol Dis, 2008. **31**(1): p. 89-101.
18. Ren, J., et al., *A Drosophila model of the neurodegenerative disease SCA17 reveals a role of RBP-J/Su(H) in modulating the pathological outcome*. Hum Mol Genet, 2011.
19. 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.
20. Kiehl, T.R., et al., *Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p. 17-24.
21. Lastres-Becker, I., et al., *Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(10): p. 1465-81.

22. Watase, K., et al., *Spinocerebellar ataxia type 6 knockin mice develop a progressive neuronal dysfunction with age-dependent accumulation of mutant CaV2.1 channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(33): p. 11987-92.
23. Burchette, E.N., et al., *SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat*. Cell, 1995. **82**(6): p. 937-48.
24. 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.
25. Fernandez-Funez, P., et al., *Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 101-6.
26. Chan, H.Y., et al., *Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in Drosophila*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(19): p. 2811-20.
27. Li, S.H., et al., *Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(5): p. 1277-87.
28. Cummings, C.J., et al., *Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 148-54.
29. Warrick, J.M., et al., *Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in Drosophila*. Cell, 1998. **93**(6): p. 939-49.
30. McCampbell, A., et al., *CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(14): p. 2197-202.
31. 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.
32. Dunah, A.W., et al., *Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease*. Science, 2002. **296**(5576): p. 2238-43.
33. 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.
34. Schaffar, G., et al., *Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation*. Mol Cell, 2004. **15**(1): p. 95-105.
35. Bence, N.F., R.M. Sampat, and R.R. Kopito, *Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation*. Science, 2001. **292**(5521): p. 1552-5.
36. Apostol, B.L., et al., *A cell-based assay for aggregation inhibitors as therapeutics of polyglutamine-repeat disease and validation in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5950-5.
37. Nagai, Y., et al., *Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in Drosophila*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(11): p. 1253-9.
38. Bennett, E.J., et al., *Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation*. Mol Cell, 2005. **17**(3): p. 351-65.
39. 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.
40. Kim, T.W. and R.E. Tanzi, *Neuronal intranuclear inclusions in polyglutamine diseases: nuclear weapons or nuclear fallout?* Neuron, 1998. **21**(4): p. 657-9.
41. Arrasate, M., et al., *Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 805-10.
42. Kopito, R.R., *Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(12): p. 524-30.
43. Ross, C.A. and S.J. Tabrizi, *Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment*. Lancet Neurol, 2011. **10**(1): p. 83-98.
44. Sanchez, I., C. Mahlke, and J. Yuan, *Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 373-9.



45. Klement, I.A., et al., *Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice*. Cell, 1998. **95**(1): p. 41-53.
46. Zoghbi, H.Y. and H.T. Orr, *Pathogenic mechanisms of a polyglutamine-mediated neurodegenerative disease, spinocerebellar ataxia type 1*. J Biol Chem, 2009. **284**(12): p. 7425-9.
47. Martindale, D., et al., *Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates*. Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 150-4.
48. Shimohata, T., O. Onodera, and S. Tsuji, *Interaction of expanded polyglutamine stretches with nuclear transcription factors leads to aberrant transcriptional regulation in polyglutamine diseases*. Neuropathology, 2000. **20**(4): p. 326-33.
49. Shah, A.G., et al., *Transcriptional dysregulation of TrkA associates with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 17*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(21): p. 4141-52.
50. Chen-Plotkin, A.S., et al., *Decreased association of the transcription factor Sp1 with genes downregulated in Huntington's disease*. Neurobiol Dis, 2006. **22**(2): p. 233-41.
51. Goold, R., et al., *Down-regulation of the dopamine receptor D2 in mice lacking ataxin 1*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(17): p. 2122-34.
52. Shimohata, T., et al., *Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 29-36.
53. Jimenez, J.S., *Protein-DNA interaction at the origin of neurological diseases: a hypothesis*. J Alzheimers Dis, 2010. **22**(2): p. 375-91.
54. Friedman, M.J., et al., *Polyglutamine expansion reduces the association of TATA-binding protein with DNA and induces DNA binding-independent neurotoxicity*. J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8283-90.
55. Friedman, M.J., et al., *Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIB interaction: implications for its normal function and neurodegeneration*. Nat Neurosci, 2007. **10**(12): p. 1519-28.
56. Irvine, R.A., et al., *Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(2): p. 267-74.
57. Mhatre, A.N., et al., *Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy*. Nat Genet, 1993. **5**(2): p. 184-8.
58. Nakajima, H., et al., *Transcriptional activation by the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy*. J Neurol Sci, 1996. **142**(1-2): p. 12-6.
59. Tut, T.G., et al., *Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(11): p. 3777-82.
60. Buchanan, G., et al., *Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(16): p. 1677-92.
61. Harjes, P. and E.E. Wanker, *The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(8): p. 425-33.
62. 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.
63. Zuccato, C., et al., *Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes*. Nat Genet, 2003. **35**(1): p. 76-83.
64. 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.
65. Wang, L. and C.C. Tsai, *Atrophin proteins: an overview of a new class of nuclear receptor corepressors*. Nucl Recept Signal, 2008. **6**: p. e009.

66. Hallen, L., et al., *The KRAB-containing zinc-finger transcriptional regulator ZBRK1 activates SCA2 gene transcription through direct interaction with its gene product, ataxin-2*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(1): p. 104-14.
67. Helmlinger, D., et al., *Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(12): p. 1257-65.
68. Chou, A.H., et al., *Polyglutamine-expanded ataxin-7 causes cerebellar dysfunction by inducing transcriptional dysregulation*. Neurochem Int, 2010. **56**(2): p. 329-39.
69. Lim, J., et al., *Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1*. Nature, 2008. **452**(7188): p. 713-8.
70. Lee, S., et al., *Ataxin-1 occupies the promoter region of E-cadherin in vivo and activates CtBP2-repressed promoter*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 713-22.
71. Cvetanovic, M., et al., *The role of LANP and ataxin 1 in E4F-mediated transcriptional repression*. EMBO Rep, 2007. **8**(7): p. 671-7.
72. Lin, X., et al., *Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1*. Nat Neurosci, 2000. **3**(2): p. 157-63.
73. Serra, H.G., et al., *Gene profiling links SCA1 pathophysiology to glutamate signaling in Purkinje cells of transgenic mice*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(20): p. 2535-43.
74. Tang, T.S., et al., *Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1*. Neuron, 2003. **39**(2): p. 227-39.
75. Chen, X., et al., *Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3*. J Neurosci, 2008. **28**(48): p. 12713-24.
76. Licatalosi, D.D. and R.B. Darnell, *Splicing regulation in neurologic disease*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 93-101.
77. Jiang, Y.J., et al., *Interaction with polyglutamine expanded huntingtin alters cellular distribution and RNA processing of huntingtin yeast two-hybrid protein A (HYPA)*. J Biol Chem, 2011.
78. Irwin, S., et al., *RNA association and nucleocytoplasmic shuttling by ataxin-1*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 1): p. 233-42.
79. 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.
80. 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.
81. Corsini, L., et al., *U2AF-homology motif interactions are required for alternative splicing regulation by SPF45*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(7): p. 620-9.
82. de Chiara, C., et al., *Phosphorylation of S776 and 14-3-3 binding modulate ataxin-1 interaction with splicing factors*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8372.
83. Harding, A.E., *The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth'*. Brain, 1982. **105**(Pt 1): p. 1-28.
84. Harding, A.E., *Clinical features and classification of inherited ataxias*. Adv Neurol, 1993. **61**: p. 1-14.
85. Bradford, J.W., S. Li, and X.J. Li, *Polyglutamine toxicity in non-neuronal cells*. Cell Res, 2010. **20**(4): p. 400-7.
86. Riess, O., et al., *SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients*. Neurogenetics, 1997. **1**(1): p. 59-64.
87. 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.
88. Moseley, M.L., et al., *Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families*. Neurology, 1998. **51**(6): p. 1666-71.

89. Velazquez-Perez, L., et al., *A Comprehensive Review of Spinocerebellar Ataxia Type 2 in Cuba*. Cerebellum, 2011.
90. Orozco, G., et al., *Dominantly inherited olivopontocerebellar atrophy from eastern Cuba. Clinical, neuropathological, and biochemical findings*. J Neurol Sci, 1989. **93**(1): p. 37-50.
91. Geschwind, D.H., et al., *The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(4): p. 842-50.
92. Lu, C.S., et al., *The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 2*. Arch Neurol, 2004. **61**(1): p. 35-8.
93. Payami, H., et al., *SCA2 may present as levodopa-responsive parkinsonism*. Mov Disord, 2003. **18**(4): p. 425-9.
94. Estrada, R., et al., *Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2): morphometric analyses in 11 autopsies*. Acta Neuropathol, 1999. **97**(3): p. 306-10.
95. Lastres-Becker, I., U. Rub, and G. Auburger, *Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2)*. Cerebellum, 2008. **7**(2): p. 115-24.
96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. Gispert, S., et al., *Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1*. Nat Genet, 1993. **4**(3): p. 295-9.
100. Cancel, G., et al., *Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: a study of 32 families*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(5): p. 709-15.
101. Babovic-Vuksanovic, D., et al., *Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA 2) in an infant with extreme CAG repeat expansion*. Am J Med Genet, 1998. **79**(5): p. 383-7.
102. Mao, R., et al., *Childhood-onset ataxia: testing for large CAG-repeats in SCA2 and SCA7*. Am J Med Genet, 2002. **110**(4): p. 338-45.
103. van de Warrenburg, B.P., et al., *Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: a study in a Dutch-French cohort*. Ann Neurol, 2005. **57**(4): p. 505-12.
104. Pulst, S.M., et al., *Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset*. Brain, 2005. **128**(Pt 10): p. 2297-303.
105. Hayes, S., et al., *CAG repeat length in RAI1 is associated with age at onset variability in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2)*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(12): p. 1753-8.
106. Simon, D.K., et al., *Mitochondrial complex I gene variant associated with early age at onset in spinocerebellar ataxia type 2*. Arch Neurol, 2007. **64**(7): p. 1042-4.
107. Affaitati, A., et al., *Identification of alternative splicing of spinocerebellar ataxia type 2 gene*. Gene, 2001. **267**(1): p. 89-93.
108. Nechiporuk, T., et al., *The mouse SCA2 gene: cDNA sequence, alternative splicing and protein expression*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(8): p. 1301-9.
109. 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.
110. 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.

111. 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.
112. 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.
113. 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.
114. van de Loo, S., et al., *Ataxin-2 associates with rough endoplasmic reticulum*. Exp Neurol, 2009. **215**(1): p. 110-8.
115. Koyano, S., et al., *Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study*. Neurosci Lett, 1999. **273**(2): p. 117-20.
116. 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.
117. Ishida, C., et al., *An autopsy case of an aged patient with spinocerebellar ataxia type 2*. Neuropathology, 2010.
118. Albrecht, M., et al., *Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3*. Eur J Biochem, 2004. **271**(15): p. 3155-70.
119. 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.
120. 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.
121. Maine, E.M., et al., *Caenorhabditis elegans atx-2 promotes germline proliferation and the oocyte fate*. Genetics, 2004. **168**(2): p. 817-30.
122. 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.
123. 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.
124. Kiehl, T.R., H. Shibata, and S.M. Pulst, *The ortholog of human ataxin-2 is essential for early embryonic patterning in C. elegans*. J Mol Neurosci, 2000. **15**(3): p. 231-41.
125. Waldherr, M., et al., *A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast*. Curr Genet, 1993. **24**(4): p. 301-6.
126. Nonis, D., et al., *Ataxin-2 associates with the endocytosis complex and affects EGF receptor trafficking*. Cell Signal, 2008. **20**(10): p. 1725-39.
127. 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.
128. 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.
129. Kambach, C., et al., *Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs*. Cell, 1999. **96**(3): p. 375-87.
130. Seraphin, B., *Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs*. EMBO J, 1995. **14**(9): p. 2089-98.
131. Neuwald, A.F. and E.V. Koonin, *Ataxin-2, global regulators of bacterial gene expression, and spliceosomal snRNP proteins share a conserved domain*. J Mol Med, 1998. **76**(1): p. 3-5.

132. Albrecht, M. and T. Lengauer, *Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases*. FEBS Lett, 2004. **569**(1-3): p. 18-26.
133. Wilusz, C.J. and J. Wilusz, *Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(12): p. 1031-6.
134. Hermann, H., et al., *snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions*. EMBO J, 1995. **14**(9): p. 2076-88.
135. Kulkarni, M., S. Ozgur, and G. Stoecklin, *On track with P-bodies*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(Pt 1): p. 242-51.
136. Parker, R. and U. Sheth, *P bodies and the control of mRNA translation and degradation*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 635-46.
137. Franks, T.M. and J. Lykke-Andersen, *The control of mRNA decapping and P-body formation*. Mol Cell, 2008. **32**(5): p. 605-15.
138. Matsui, T., et al., *Structural insight of human DEAD-box protein rck/p54 into its substrate recognition with conformational changes*. Genes Cells, 2006. **11**(4): p. 439-52.
139. 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.
140. Anderson, P. and N. Kedersha, *Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation*. Cell Stress Chaperones, 2002. **7**(2): p. 213-21.
141. Gilks, N., et al., *Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5383-98.
142. Buchan, J.R. and R. Parker, *Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation*. Mol Cell, 2009. **36**(6): p. 932-41.
143. Kedersha, N., et al., *Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling*. J Cell Biol, 2005. **169**(6): p. 871-84.
144. Anderson, P. and N. Kedersha, *RNA granules*. J Cell Biol, 2006. **172**(6): p. 803-8.
145. Wilczynska, A., et al., *The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 981-92.
146. Buchan, J.R., D. Muhrad, and R. Parker, *P bodies promote stress granule assembly in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 2008. **183**(3): p. 441-55.
147. 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.
148. Kozlov, G., et al., *Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4409-13.
149. Pestova, T.V., et al., *Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7029-36.
150. Wilson, A.C., et al., *TDP-43 in aging and Alzheimer's disease - a review*. Int J Clin Exp Pathol, 2011. **4**(2): p. 147-55.
151. Mangus, D.A., et al., *Identification of factors regulating poly(A) tail synthesis and maturation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4196-206.
152. Reutens, A.T. and C.G. Begley, *Endophilin-1: a multifunctional protein*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(10): p. 1173-7.
153. Sittler, A., et al., *SH3GL3 associates with the Huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polyGln-containing protein aggregates*. Mol Cell, 1998. **2**(4): p. 427-36.
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. Wiedemeyer, R., et al., *Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells*. Oncogene, 2003. **22**(3): p. 401-11.

156. Huynh, D.P., et al., *The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(20): p. 2587-97.
157. Imai, Y., et al., *An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin*. Cell, 2001. **105**(7): p. 891-902.
158. 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.
159. Liu, J., et al., *Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 2*. J Neurosci, 2009. **29**(29): p. 9148-62.
160. 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.
161. Elden, A.C., et al., *Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS*. Nature, 2010. **466**(7310): p. 1069-75.
162. Colombrita, C., et al., *RNA-binding proteins and RNA metabolism: a new scenario in the pathogenesis of Amyotrophic lateral sclerosis*. Arch Ital Biol, 2011. **149**(1): p. 83-99.
163. 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.
164. Uchihara, T., et al., *Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias--triple-labeling immunofluorescence study*. Acta Neuropathol, 2001. **102**(2): p. 149-52.
165. Jardim, L., et al., *Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype*. Acta Neurol Scand, 2003. **107**(3): p. 211-4.
166. 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.
167. Kuroyanagi, H., *Fox-1 family of RNA-binding proteins*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(24): p. 3895-907.
168. Zhang, C., et al., *Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2*. Genes Dev, 2008. **22**(18): p. 2550-63.
169. Hodgkin, J., J.D. Zellan, and D.G. Albertson, *Identification of a candidate primary sex determination locus, fox-1, on the X chromosome of Caenorhabditis elegans*. Development, 1994. **120**(12): p. 3681-9.
170. Nicoll, M., C.C. Akerib, and B.J. Meyer, *X-chromosome-counting mechanisms that determine nematode sex*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 200-4.
171. Kim, K.K., et al., *Fox-3 and PSF interact to activate neural cell-specific alternative splicing*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(8): p. 3064-78.
172. Lamond, A.I. and D.L. Spector, *Nuclear speckles: a model for nuclear organelles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(8): p. 605-12.
173. Huang, S. and D.L. Spector, *U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 305-8.
174. Shepard, P.J. and K.J. Hertel, *The SR protein family*. Genome Biol, 2009. **10**(10): p. 242.
175. Delestienne, N., et al., *The splicing factor ASF/SF2 is associated with TIA-1-related/TIA-1-containing ribonucleoproteic complexes and contributes to post-transcriptional repression of gene expression*. FEBS J, 2010. **277**(11): p. 2496-514.
176. Busa, R., R. Geremia, and C. Sette, *Genotoxic stress causes the accumulation of the splicing regulator Sam68 in nuclear foci of transcriptionally active chromatin*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(9): p. 3005-18.
177. Thomas, M.G., et al., *RNA granules: the good, the bad and the ugly*. Cell Signal, 2011. **23**(2): p. 324-34.

178. Ma, L., et al., *Evaluation of A2BP1 as an obesity gene*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2837-45.
179. Norris, J.D., et al., *A negative coregulator for the human ER*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(3): p. 459-68.
180. Auweter, S.D., et al., *Molecular basis of RNA recognition by the human alternative splicing factor Fox-1*. EMBO J, 2006. **25**(1): p. 163-73.
181. Underwood, J.G., et al., *Homologues of the Caenorhabditis elegans Fox-1 protein are neuronal splicing regulators in mammals*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(22): p. 10005-16.
182. McGlincy, N.J., et al., *Expression proteomics of UPF1 knockdown in HeLa cells reveals autoregulation of hnRNP A2/B1 mediated by alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 565.
183. Huh, G.S. and R.O. Hynes, *Regulation of alternative pre-mRNA splicing by a novel repeated hexanucleotide element*. Genes Dev, 1994. **8**(13): p. 1561-74.
184. Yeo, G.W., et al., *An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(2): p. 130-7.
185. Brudno, M., et al., *Computational analysis of candidate intron regulatory elements for tissue-specific alternative pre-mRNA splicing*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(11): p. 2338-48.
186. Sugnet, C.W., et al., *Unusual intron conservation near tissue-regulated exons found by splicing microarrays*. PLoS Comput Biol, 2006. **2**(1): p. e4.
187. Das, D., et al., *A correlation with exon expression approach to identify cis-regulatory elements for tissue-specific alternative splicing*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(14): p. 4845-57.
188. Kalsotra, A., et al., *A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(51): p. 20333-8.
189. McGlincy, N.J. and C.W. Smith, *Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense?* Trends Biochem Sci, 2008. **33**(8): p. 385-93.
190. Maquat, L.E., *Nonsense-mediated mRNA decay in mammals*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 9): p. 1773-6.
191. Skinner, P.J., et al., *Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures*. Nature, 1997. **389**(6654): p. 971-4.
192. Kim, S.J., et al., *Polyglutamine-expanded ataxin-1 recruits Cu/Zn-superoxide dismutase into the nucleus of HeLa cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(3): p. 660-5.
193. Nakahata, S. and S. Kawamoto, *Tissue-dependent isoforms of mammalian Fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(7): p. 2078-89.
194. Lee, J.A., Z.Z. Tang, and D.L. Black, *An inducible change in Fox-1/A2BP1 splicing modulates the alternative splicing of downstream neuronal target exons*. Genes Dev, 2009. **23**(19): p. 2284-93.
195. Yang, G., et al., *Regulated Fox-2 isoform expression mediates protein 4.1R splicing during erythroid differentiation*. Blood, 2008. **111**(1): p. 392-401.
196. Kiehl, T.R., et al., *Identification and expression of a mouse ortholog of A2BP1*. Mamm Genome, 2001. **12**(8): p. 595-601.
197. Clery, A., M. Blatter, and F.H. Allain, *RNA recognition motifs: boring? Not quite*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(3): p. 290-8.
198. Jin, Y., et al., *A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG*. EMBO J, 2003. **22**(4): p. 905-12.
199. Ponthier, J.L., et al., *Fox-2 splicing factor binds to a conserved intron motif to promote inclusion of protein 4.1R alternative exon 16*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12468-74.

200. Kim, K.K., R.S. Adelstein, and S. Kawamoto, *Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors*. J Biol Chem, 2009. **284**(45): p. 31052-61.
201. Martin, C.L., et al., *Cytogenetic and molecular characterization of A2BP1/FOX1 as a candidate gene for autism*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2007. **144B**(7): p. 869-76.
202. Lale, S., S. Yu, and A. Ahmed, *Complex Congenital Heart Defects in Association with Maternal Diabetes and Partial Deletion of the A2BP1 Gene*. Fetal Pediatr Pathol, 2011.
203. Hamshere, M.L., et al., *Genetic utility of broadly defined bipolar schizoaffective disorder as a diagnostic concept*. Br J Psychiatry, 2009. **195**(1): p. 23-9.
204. Bhalla, K., et al., *The de novo chromosome 16 translocations of two patients with abnormal phenotypes (mental retardation and epilepsy) disrupt the A2BP1 gene*. J Hum Genet, 2004. **49**(6): p. 308-11.
205. Cremer, T., et al., *Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function*. Biol Cell, 2004. **96**(8): p. 555-67.
206. Dent, M.A., et al., *NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix*. FEBS Lett, 2010. **584**(13): p. 2767-71.
207. Papin, C., C. Rouget, and E. Mandart, *Xenopus Rbm9 is a novel interactor of XGld2 in the cytoplasmic polyadenylation complex*. FEBS J, 2008. **275**(3): p. 490-503.
208. Caceres, J.F., G.R. Sreaton, and A.R. Krainer, *A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm*. Genes Dev, 1998. **12**(1): p. 55-66.
209. Dreyfuss, G., V.N. Kim, and N. Kataoka, *Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 195-205.
210. Cassola, A., G. Noe, and A.C. Frasch, *RNA recognition motifs involved in nuclear import of RNA-binding proteins*. RNA Biol, 2010. **7**(3): p. 339-44.
211. Pinol-Roma, S. and G. Dreyfuss, *Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm*. Nature, 1992. **355**(6362): p. 730-2.
212. Guil, S., J.C. Long, and J.F. Caceres, *hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(15): p. 5744-58.
213. Zhang, T., et al., *Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 23): p. 5453-63.
214. Huang, Y. and J.A. Steitz, *Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA*. Mol Cell, 2001. **7**(4): p. 899-905.
215. Sanford, J.R., et al., *A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation*. Genes Dev, 2004. **18**(7): p. 755-68.
216. Svitkin, Y.V., et al., *General RNA binding proteins render translation cap dependent*. EMBO J, 1996. **15**(24): p. 7147-55.
217. Ostareck, D.H., et al., *mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end*. Cell, 1997. **89**(4): p. 597-606.
218. Kedersha, N.L., et al., *RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules*. J Cell Biol, 1999. **147**(7): p. 1431-42.
219. Mazan-Mamczarz, K., et al., *Translational repression by RNA-binding protein TIAR*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(7): p. 2716-27.
220. Kedersha, N. and P. Anderson, *Mammalian stress granules and processing bodies*. Methods Enzymol, 2007. **431**: p. 61-81.
221. Kedersha, N., et al., *Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 195-210.



222. 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.
223. Graveley, B.R., *Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world*. Trends Genet, 2001. **17**(2): p. 100-7.
224. Maniatis, T. and B. Tasic, *Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 236-43.
225. Black, D.L. and P.J. Grabowski, *Alternative pre-mRNA splicing and neuronal function*. Prog Mol Subcell Biol, 2003. **31**: p. 187-216.
226. Black, D.L., *Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 291-336.
227. Kawamoto, S., *Neuron-specific alternative splicing of nonmuscle myosin II heavy chain-B pre-mRNA requires a cis-acting intron sequence*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17613-6.
228. Lee, C.J. and K. Irizarry, *Alternative splicing in the nervous system: an emerging source of diversity and regulation*. Biol Psychiatry, 2003. **54**(8): p. 771-6.
229. Lopez-Bigas, N., et al., *Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease?* FEBS Lett, 2005. **579**(9): p. 1900-3.
230. Wang, G.S. and T.A. Cooper, *Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(10): p. 749-61.
231. Ward, A.J. and T.A. Cooper, *The pathobiology of splicing*. J Pathol, 2010. **220**(2): p. 152-63.
232. Bhuvanagiri, M., et al., *NMD: RNA biology meets human genetic medicine*. Biochem J, 2010. **430**(3): p. 365-77.
233. Banfi, S., et al., *Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia*. Nat Genet, 1994. **7**(4): p. 513-20.
234. Matilla, A., et al., *The cerebellar leucine-rich acidic nuclear protein interacts with ataxin-1*. Nature, 1997. **389**(6654): p. 974-8.
235. Kang, S. and S. Hong, *Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 1 disease*. Mol Cells, 2009. **27**(6): p. 621-7.
236. Matilla, A., et al., *Mice lacking ataxin-1 display learning deficits and decreased hippocampal paired-pulse facilitation*. J Neurosci, 1998. **18**(14): p. 5508-16.
237. Bettencourt, C., et al., *Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3)*. Neurogenetics, 2010. **11**(2): p. 193-202.
238. Harris, G.M., et al., *Splice isoforms of the polyglutamine disease protein ataxin-3 exhibit similar enzymatic yet different aggregation properties*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13695.
239. Einum, D.D., et al., *A novel central nervous system-enriched spinocerebellar ataxia type 7 gene product*. Arch Neurol, 2003. **60**(1): p. 97-103.
240. Pietrobon, D., *CaV2.1 channelopathies*. Pflugers Arch, 2010. **460**(2): p. 375-93.
241. Tsou, W.L., et al., *Splice isoform-specific suppression of the Ca(V)2.1 variant underlying spinocerebellar ataxia type 6*. Neurobiol Dis, 2011.
242. Buratti, E., et al., *Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping*. EMBO J, 2001. **20**(7): p. 1774-84.
243. Mercado, P.A., et al., *Depletion of TDP 43 overrides the need for exonic and intronic splicing enhancers in the human apoA-II gene*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(18): p. 6000-10.
244. Vance, C., et al., *Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6*. Science, 2009. **323**(5918): p. 1208-11.
245. Seidel, K., et al., *Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(4): p. 449-60.
246. Sephton, C.F., et al., *Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes*. J Biol Chem, 2011. **286**(2): p. 1204-15.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

AR:	Androgen-Rezeptor
ARE:	AU-rich elements
ATM:	Ataxia telangiectasia
ATN1:	Atrophin-1
ATXN:	Ataxin
ALS:	amyotrophe Lateralsklerose
AS:	Aminosäure
B2M:	$\beta$ -2-Mikrotubulin
BOAT:	“Brother of ataxin-1”
CACNA1A:	„calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit”
CBP:	„CREB (cAMP-response-element-binding-protein)-binding protein”
Cu/Zn-SOD:	Cu/Zn-superoxide dismutase
DRPLA:	Dentatorubrale Pallidolysiane Atrophie
FTDP-17:	“frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17”
Fox-2:	“feminizing on X”
Fxh:	Fox-2 Homolog
Gfi1:	”Growth factor independent protein 1”
HD:	„Huntington`s disease“
HDAC3:	“Histon-Deacetylase 3”
HPRT:	“hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1”
Htt:	Huntingtin-Protein
HYPA:	“Huntingtin yeast partner A”
IGC:	“Interchromatin Granule Clusters“

InsP <sub>3</sub> R1:	1 Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptor
LANP:	“Leucine-rich acidic nuclear protein”
LSm:	Like-Sm
LSmAD:	LSm-assozierte Domäne
NES:	nukleäres Exit-Signal
NMD:	„nonsense mediated mRNA decay“
NLS:	nukleäres Lokalisations-Signal
PABP:	“Poly(A)-Bindeprotein”
PAM2:	Poly(A)-Bindeprotein (PABP)-Interaktionsmotiv
PCAF:	“P300/CBP-associated factor”
P-Body:	“Processing Body”
Pbp1:	“pab1p-binding protein 1”
PTC	“premature translation termination codon”
PQBP1:	“polyglutamine binding protein 1”
RBM9:	“RNA binding motif protein 9”
RBM17:	“RNA binding motif protein 17”
RRM:	“RNA recognition motif”
rpm:	“rounds per minute”
SBMA:	Spinobulbäre Muskelatrophie
SCA:	spinozerebelläre Ataxie
SEM:	„standard error of the mean“
SMRT:	“Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor”
SR-Protein:	Serin/Arginin-reiches Protein
SP1:	specificity protein 1
TAF <sub>II</sub> 130:	“Transcription initiation factor TFIID 130 kDa subunit”

TAP/NXF1:	“nuclear RNA export factor 1 ”
TBP:	„TATA box binding protein“
TDP-43:	„TAR DNA binding protein“
TFIIB:	“general transcription factor IIB”
TIA-1:	“T-cell-restricted intracellular antigen-1”
TIAR:	“TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1”
U2AF65:	“U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2”
UHM:	“U2AF-homology motif”
ULM:	UHM-Liganden-Motif
UTR:	untranslatierte Region
UPF1:	Up-frameshift suppressor 1 homolog
UPS:	Ubiquitin-Proteasom-System
Y2H:	Yeast-Two-Hybrid
ZNS:	zentrales Nervensystem
ZBRK1:	“Zinc finger and BRCA1-interacting protein with a KRAB domain 1”





**10 Publikationen**

- 02/2007 „Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P- bodies and stress granules“ Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, Yaspo ML, Lehrach H, Krobitch S, Mol Biol Cell. 2007 Apr;18(4):1385-96.
- 07/2011 „Fox-2 dependent splicing of ataxin-2 transcript is affected by ataxin-1 expression“ Welzel F, Kaehler C, Isau M, Hallen L, Lehrach H, Krobitch S, eingereicht bei Hum Mol Genet.