

1 Einleitung

1.1 Polyglutaminerkrankungen

Polyglutaminerkrankungen sind vererbare, neurodegenerative Krankheiten, die zur Familie der Trinukleotidexpansionserkrankungen gehören und im fortgeschrittenen Alter auftreten [1]. Sämtliche Mitglieder der Familie der Trinukleotidexpansionserkrankungen zeichnen sich durch eine intragenische Expansion eines Basentriplets im krankheitsauslösenden Gen aus. Sie werden in 2 Klassen unterteilt, wobei die Klasse 1 die Krankheiten beinhaltet, bei denen sich die Verlängerung des Trinukleotidabschnittes in der kodierenden Region des betroffenen Gens befindet. Die Familie der Polyglutaminerkrankungen ist zu dieser Klasse zu zählen. Zur Klasse 2 gehören solche Krankheiten, bei denen die Expansion im nicht-kodierenden Genbereich liegt. Die Expansion wird damit nicht translatiert und ist nicht in der Proteinsequenz vorhanden.

Die Familie der Polyglutaminerkrankungen umfasst derzeit die folgenden neun Krankheiten: die Huntington-Krankheit (HD), die Spinozerebellaren Ataxien Typ 1 (SCA1), Typ 2 (SCA2), Typ 3 (SCA3/MJD), Typ 6 (SCA6), Typ 7 (SCA7) und Typ 17 (SCA17), die Spinale and Bulbäre Muskuläre Atrophie (SBMA) und die Dentatorubrale Phallidoluysiane Atrophie (DRPLA) [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Die Expansion in den entsprechenden krankheitsauslösenden Genen besteht aus Wiederholungen des Basentriplets CAG, welches für die Aminosäure Glutamin kodiert, woher sich auch der Name "Polyglutaminerkrankungen" für diese Krankheitsfamilie ableitet. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich wird, gestaltet sich der Bereich der Expansion der Trinukleotidregion in der gesunden Bevölkerung polymorph. Des Weiteren ist auch die Anzahl der Wiederholungen des Tripletts im Gen, die zur jeweiligen Krankheit führen, sehr variabel. Im Falle von SCA6 wirkt eine Verlängerung der Expansion auf 20 - 21 CAG krankheitsauslösend, während bei SCA2, HD, SCA7 und SBMA eine Elongation des Bereichs auf 33 - 38 CAG zum Ausbruch der Krankheit führt; SCA17, SCA1, DRPLA und SCA3/MJD hingegen werden bei einer Verlängerung der Expansion

auf 47 - 61 CAG ausgelöst [7]. Die insgesamt erreichbaren Längen der CAG-Triplett-Wiederholungen variieren dabei stark zwischen den verschiedenen krankheitsauslösenden Genen (siehe Tabelle 1).

Die Länge des expandierten Trinukleotidbereiches weist eine entgegengesetzte Korrelation im Bezug auf den Zeitpunkt des Ausbruchs der ersten Krankheitssymptome auf, während die Stärke der Symptome positiv mit der Länge der Expansion korreliert. Dieses bedeutet, dass eine extrem große Verlängerung der CAG-Expansion zu einem früheren Krankheitsausbruch führt, welches mit einer stärkeren Symptomatik einhergeht [1, 8].

Tabelle 1: Übersicht der bekannten Polyglutaminerkrankungen, (nach [7])

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

Des weiteren existiert eine reduzierte Penetranz intermediärer "Repeat"-Zahlen. Diese intermediären "Repeat"-Zahlen geben einen CAG-Anzahlbereich an, der nicht mehr zur "Wildtyp-Form" gezählt werden kann; jedoch ist eine "Repeat"-Länge in diesem Bereich auch nicht zwingend pathogen. Betroffene zeigen nicht zwangsläufig Symptome der entsprechenden Krankheit [4]. Außerdem weisen pathogene Expansionen eine Instabilität in ihrer Länge auf. Dabei tritt diese Instabilität sowohl somatisch, als auch in der Keimbahn

auf [9, 10]. Dies bedeutet, dass zum einen Veränderungen in Körperzellen auftreten, zum anderen führt eine Verlängerung des CAG-Bereiches eines Genes der Eltern zu einer weitergehenden Instabilität dieses Bereiches im betroffenen Gen der Kinder. Die Nachkommen von Personen mit einer intermediären "Repeat"-Zahl sind somit einem erhöhten Risiko einer Erkrankung ausgesetzt. Die Instabilität wird bei Allelen mit einem expandierenden CAG-Bereich mit einer Frequenz von fast 100 % beobachtet. Allele mit einem nicht expandierten CAG-Bereich zeigen eine solche Instabilität nur sehr selten [4, 5].

Die aufgeführten Polyglutaminerkrankungen ähneln sich in einigen hervorstechenden Merkmalen [1]. So sind alle durch progressive Neurodegeneration gekennzeichnet, die typischerweise in der Mitte des Lebens der betroffenen Personen auftritt. Diese führt zu zunehmenden neuronalen Fehlfunktionen und letztendlich zum Verlust von neuronalen Zellen. Dabei treten die Dysfunktionen jedoch nur in spezifischen Neuronen des Gehirns auf. Die bei den einzelnen Erkrankungen betroffenen Gehirnareale sind zum großen Teil unterschiedlich (siehe Abbildung 1). Während es zum Beispiel bei der Huntington-Krankheit zu einer Atrophie von Caudate und Putamen sowie einer diffusen Degeneration des Neostriatums kommt, geht SCA3/MJD mit einer Degeneration der Basalganglien, des Hirnstamms, des Rückenmarks und von Neuronen des Zerebellums einher. Auch sind die betroffenen Zelltypen bei den einzelnen Erkrankungen unterschiedlich. So kommt es zum Beispiel im Falle von SCA1, SCA2 und SCA6, nicht jedoch im Falle von SCA3/MJD, zu einem Verlust von Purkinje-Zellen im Kleinhirn von betroffenen Patienten [11]. Diese Zell-spezifität geht mit einer extremen Verlängerung des CAG-Bereiches verloren, was auch schon bei jungen Patienten zu schweren Krankheitssymptomen führt. In diesen Fällen kann eine Überlappung der phänotypischen Ausprägung der verschiedenen Krankheiten beobachtet werden.

Obwohl die Polyglutaminproteine, abgesehen von der Polyglutamin-Expansion, keine Homologien zueinander aufweisen, werden, bis auf CACNA1A, das Protein welches bei

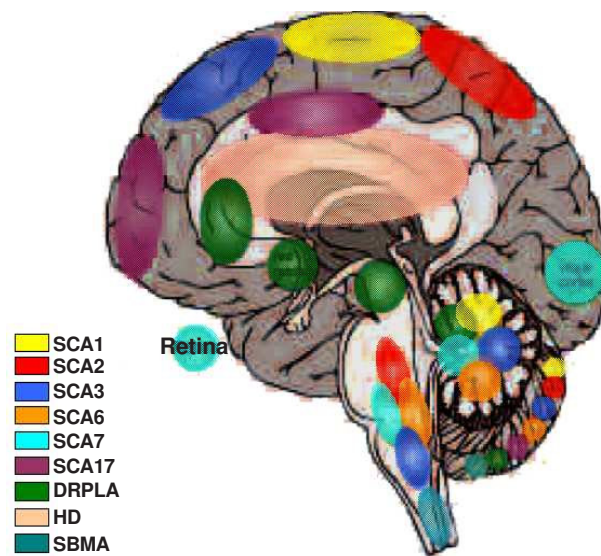


Abbildung 1: Schematische Darstellung der vorwiegend betroffenen Gehirnregionen der bisher bekannten Polyglutaminerkrankungen [11].

SCA6 von Bedeutung ist, alle aufgeführten Proteine (Tabelle 1) ubiquitär exprimiert. Die genaue biologische Funktion der Polyglutaminproteine ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Es scheint jedoch gewisse Überschneidungspunkte der zellulären Prozesse zu geben, an denen die einzelnen Polyglutaminproteine beteiligt sind. So konnten viele dieser Proteine mit transkriptioneller Regulation, der Transkriptions-Maschinerie oder dem zellulären RNA-Metabolismus in Zusammenhang gebracht werden. Das Protein Huntingtin zum Beispiel ist an transkriptioneller Regulation beteiligt. Zum einen interagiert es mit dem "CREB-binding protein" und kann über diese Interaktion in die Repression der Transkription eingreifen [12]. Zum anderen steht es mit BDNF, dem "brain-derived neurotrophic factor" in Verbindung, dessen Translation durch die Huntingtin-Aktivität gesteuert wird [13, 14, 15, 16]. Weiterhin ist der gut charakterisierte Androgen-Rezeptor, welcher einen Liganden-abhängigen nukleären Transkriptionsfaktor darstellt, unter anderem essentiell für die Entwicklung männlicher Föten und die Spermatogenese [17]. Untersuchungen über Ataxin-1 ergaben, dass

dieses Protein in transkriptioneller Modulation und RNA-Prozessierung eine Rolle spielt. Zum einen ist Ataxin-1 am nukleären Export beteiligt [18], zum anderen kann das Protein direkt RNA binden [19]. Zusätzlich dazu interagiert Ataxin-1 mit verschiedenen Proteinen, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind. Ataxin-7 ist eine Komponente des sogenannten STAGA-Komplexes [20]. Der STAGA-Komplex stellt einen Ko-Aktivator-Komplex der Transkription dar, der unter anderem die GCN5-Histon-Acetyl-Transferase beinhaltet. Ataxin-7 scheint in diesem Komplex die Rolle einer molekularen Brücke einzunehmen [21]. Dabei interagiert es mit an DNA gebundenen Aktivatoren und kann so in die Regulation spezifischer Gene eingreifen. Wie auch bei den bereits beschriebenen Polyglutaminproteinen, besitzt Ataxin-7 ebenfalls ein nukleäres Transportsignal [22, 23, 24, 25, 26]. Der STAGA-Komplex interagiert weiterhin mit dem RNA-Polymerase II-Komplex am Promotor der zu transkribierenden Gene. Ein essentieller Faktor dieses Komplexes ist das TATA-Box-Bindeprotein, auch TBP genannt. Die Funktion dieses Proteins ist von herausragender Bedeutung für den Mechanismus der RNA-Polymerase II und wird in jeder lebenden Zelle exprimiert [27, 28]. TBP besitzt normalerweise einen Polyglutaminbereich von 25 bis 42 aufeinander folgenden CAGs. Wird dieser jedoch durch Mutation verlängert (47 - 63 CAG-Triplets), kommt es zur Auslösung von SCA17 [29].

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass 7 der 9 Polyglutaminproteine mit Histon-Deacetylasen interagieren. Nur für CACNA1A und Ataxin-2 konnte eine solche Interaktion bisher nicht nachgewiesen werden [7]. Histon-Deacetylasen fungieren, durch Interaktionen mit Ko-Repressor-Komplexen und daraus resultierender Remodellierung von Chromatin, als Repressoren der Transkription [30, 31, 32]. Veränderte Interaktionen zwischen Polyglutaminproteinen und Regulatoren der Transkription könnten Mechanismen der transkriptionellen Dysregulation darstellen. Deshalb wurden in den letzten Jahren verschiedene Studien an Histon-Deacetylase-Inhibitoren durchgeführt, um therapeutische Strategien für verschiedene Polyglutaminerkrankungen zu finden [7]. Neben Interaktionen mit verschiedenen Histon-Deacetylasen, wurde Ataxin-3 mit dem

Ubiquitin-abhängigen Abbau von Proteinen in Zusammenhang gebracht. Ataxin-3 besitzt eine Deubiquitinierungs-Aktivität für Ketten mit vier oder mehr Ubiquitinen und kann so in die Regulation der Proteasom-Funktionen eingreifen [33]. Interessanterweise, kann Ataxin-3 mit einer verlängerten Polyglutamin-Region diese regulatorische Funktion nicht mehr ausüben.

Durch Interaktionsstudien konnte Huntingtin mit verschiedenen Transportvorgängen in der Zelle in Zusammenhang gebracht werden. So wurde eine Rolle des Proteins am Energie-abhängigen Transport von endozytotischen, synaptischen oder lysosomalen Lipid-Vesikeln entlang der Mikrotubuli oder dem Zellskelett diskutiert [34, 35, 36]. Des weiteren wurden Huntingtin Funktionen sowohl am frühen Endosom als auch am Endoplasmatischen Retikulum zugesprochen [37, 38, 39].

In Untersuchungen von Huntington Maus-Modellen konnte eine Verbindung dieses Proteins mit Kalzium-abhängigen Signalwegen hergestellt werden [40, 41, 42]. Eine Störung von Kalzium-gesteuerter Signalübertragung ist außerdem in SCA6 zu beobachten. CACNA1A stellt die α_{1A} -Untereinheit eines spannungsabhängigen P/Q-Kalzium-Kanals dar. Kanäle mit einer mutierten Untereinheit zeigen eine negativ verschobene spannungsabhängige Inaktivierung [43]. Dies resultiert in einer kürzeren Zeitspanne der Aktivierung und führt damit zu einer verringerten Erregbarkeit von Neuronen.

Ein weiteres gemeinsames Merkmal der Polyglutaminerkrankungen ist die Beobachtung von nukleären Proteineinschlüssen oder zytoplasmatischen Proteinaggregaten in degenerierten Neuronen der betroffenen Gehirnregionen [1]. Dabei sind die entsprechenden Proteine mit expandierten Polyglutaminbereichen in diesen Aggregationen lokalisiert. Hingegen wurden im Falle von SCA6 solche Aggregate nur im Zytoplasma der Zellen beobachtet. Für SCA2 scheint die Formation von nukleären und/oder zytoplasmatischen Einschlüssen nicht zwangsläufig mit der Pathogenität der Krankheit zu korrelieren, da Aggregate nur vereinzelt in Kleinhirnläsionen von Maus- und humanen post mortem Gehirnen gefunden werden konnten [44, 45]. Des weiteren konnten Einschlüsse zum Teil

entweder in anderen betroffenen Gehirnbereichen oder in nicht von der Degeneration betroffenen Hirnarealen nachgewiesen werden. Trotz vielzähliger *in vivo* und *in vitro* Studien konnte die Pathogenität der Aggregate für die jeweiligen Krankheiten bisher jedoch noch nicht abschließend geklärt werden.

1.2 Spinozerebellare Ataxie Typ 2

1.2.1 Symptomatik und Ursachen

Die Spinozerebellare Ataxie Typ 2 (SCA2) ist eine dominant autosomal vererbte Krankheit und gehört, wie bereits erwähnt, zu den Polyglutaminerkrankungen. 10 - 15 % aller weltweit beobachteten dominant vererbten Spinozerebellaren Ataxien werden als SCA2 diagnostiziert, wobei die Verbreitung regionalen Schwankungen unterliegt [46]. In Deutschland ist SCA2 die dritthäufigste Form von Ataxie (27 %), während in zum Beispiel Süditalien und England ca. 47 % aller diagnostizierten autosomal dominanten Ataxien SCA2 zuzuschreiben sind [46, 47, 48, 49, 50].

Zu den klinischen Symptomen von SCA2 zählt unter anderem die zerebellare Ataxie (Störungen der Bewegungskoordination und Gleichgewichtsregulation), worauf sich die Namensgebung der Krankheit begründet. Weitere Merkmale der Krankheit sind eine verlangsamte Augenfeinbewegung (Verlangsamung der Blicksakkaden), Ophthalmoparese (Beeinträchtigung der willkürlichen und unwillkürlichen Augenbewegung), Tremor (rhythmisches Muskelzittern), Amyotrophie (geringer Muskeltonus), Areflexia (reduzierte oder fehlende neurologische Reflexe an den unteren Extremitäten wie z.B. Fehlen des Knie-reflexes), periphere Neuropathie, Parkinsonismus und Demenz [46, 49, 51, 52]. Ursächlich für diese Symptome scheint ein massiver Verlust von Purkinje-Zellen im Kleinhirn zu sein [53]. Zudem kommt es auch zu einer Atrophie des Zerebellums und der Hinterstränge der Medulla spinalis [52]. Dem Verlust der Purkinje-Zellen ist dabei eine tragende Rolle für den Verlauf der Krankheit zuzurechnen, denn sie sind die größten Neuronen des Kleinhirns und stellen die alleinigen efferenten Fasern im Kleinhirn dar. Des weiteren

sind sie die einzigen Zellen im zentralen Nervensystem, die den sogenannten GluR δ 2-Rezeptor exprimieren [54]. Bei Fehlen des Rezeptors kommt es zu Störungen der synaptischen Plastizität auf zellulärer Ebene und zu Störungen der motorischen Kontrolle und des motorischen Lernens auf Verhaltensebene [55, 56]. Viele andere postsynaptische Proteine stehen in Wechselwirkung mit der GluR δ 2-Untereinheit [57]. Der GluR δ 2-Rezeptor besitzt also eine Schlüsselrolle für die Funktion des Kleinhirns, auch wenn seine Funktion und sein Wirkungsmechanismus noch ungeklärt sind. Des Weiteren sind die spinalen Leitungsbahnen, die Substantia nigra, die Olivae inferiores und der Pons von Degeneration und Neuronenverlust betroffen.

1.2.2 Das SCA2 Gen

Das SCA2 Gen wurde 1996 von drei unabhängigen Gruppen identifiziert und kloniert [58, 59, 60]. Es ist auf Chromosom 12q23-24.1 lokalisiert, besteht aus 25 Exons und umfasst eine genomische Sequenz von 130 kb [61]. Die krankheitsauslösende CAG-Region der kodierenden Sequenz des SCA2 Gens befindet sich im 5'-Bereich des ersten Exons. Ca. 90 % aller normalen SCA2 Allele enthalten 22 CAG-Wiederholungen, die von einem oder zwei CAA-Basentriplets unterbrochen werden. Weitere 6 % der normalen Allele enthalten 23 CAG-Triplets, die ebenfalls eine Unterbrechung von einem oder zwei CAA-Basentriplets beinhalten. In krankheitsauslösenden Allelen umfasst die Expansion 33 bis ca. 200 CAGs, welche nicht von einzelnen CAA-Triplets unterbrochen sind. Daher wird angenommen, dass diese CAA-Unterbrechungen in normalen Allelen eine stabilisierende Funktion bei der Vererbung einnehmen [62].

Interessanterweise ist im Falle von SCA2 eine reduzierte Penetranz bei einer Wiederholungsanzahl von 32 - 34 CAG-Triplets gegeben. Menschen mit einer solchen Expansion müssen nicht zwangsläufig erkranken, können aber SCA2-Symptome entwickeln.

Genexpressionsanalysen konnten zeigen, dass eine Transkription des SCA2-Gens ubi-

qitär stattfindet. Im Gehirn wird das *SCA2*-Gen besonders stark in der Amygdala, dem Nukleus Caudatus, dem Corpus Callosum, dem Hippocampus, dem Thalamus, der Substantia Nigra und in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns transkribiert [44, 58, 59, 60].

1.2.3 Potentieller Pathomechanismus in *SCA2*?

Wie erwähnt konnten im Falle von *SCA2* Proteinaggregate nur teilweise in Kleinhirnlesionen von humanen post mortem Gehirnen nachgewiesen werden [44, 45]. Zusätzlich dazu wurden diese vereinzelt auftretenden Akkumulationen auch in anderen betroffenen Hirnarealen beobachtet. Die Formation von Proteinaggregaten in *SCA2* scheint, auf Grund der Seltenheit dieser Beobachtungen, nicht zwangsläufig eine Rolle für die Pathogenität einzunehmen. In Gehirnen betroffener Menschen konnte jedoch eine Erhöhung der Konzentration des *SCA2*-Genprodukts Ataxin-2 (*ATXN2*) gegenüber Gehirnen gesunder Menschen nachgewiesen werden [44, 45]. Daraus könnte man auf einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären *ATXN2*-Konzentration und dem Krankheitsverlauf schließen. Interessanterweise scheint eine veränderte *ATXN2*-Konzentration zusätzlich dazu auch bei Neuroblastoma-Tumoren junger Kinder eine Rolle zu spielen. Es wurde eine signifikant verringerte Konzentration von *ATXN2* in Neuroblastoma-Tumoren gefunden, die eine Amplifikation des onkogenen Transkriptionsfaktorgens *MYCN* aufwiesen. In Tumoren die kein *MYCN* exprimierten, wurde ein vergleichsweise moderater bis hoher *ATXN2*-Level nachgewiesen. Zellkulturexperimente an Neuroblastoma-Zellen zeigten, dass eine Expression von normalem, nicht aber von expandiertem *ATXN2*, vermehrt zur Apoptose der Zellen führte [63].

Im Gegensatz dazu konnte beobachtet werden, dass die Expression von *ATXN2* mit einem Polyglutaminbereich von 58 bzw. 104 Glutaminen in Folge zu einem vermehrten Zelltod in COS-1- und PC12-Zellen führte [64]. Diese Beobachtung zeigte sich auch schon bei einer Überexpression von *ATXN2* mit 22 Glutaminen, war aber weniger stark ausgeprägt. In dieser Studie wurde weiterhin gezeigt, dass exogenes *ATXN2* mit 22

Glutaminen im Bereich des Golgi-Systems lokalisiert vorlag; welche bei Expression von ATXN2 mit einem expandierten Polyglutaminbereich jedoch gestört wurde. Des Weiteren konnten in dieser Untersuchung intranukleäre Proteineinschlüsse nur selten beobachtet werden.

Einen weiteren Untersuchungsansatz zur Klärung des Pathomechanismus von SCA2 stellten Studien an verschiedenen Mausmodellen dar. Zum einen wurde unter anderem ein Mausmodell generiert, in dem humanes ATXN2 mit 58 Glutaminen in Folge unter einem Purkinje-Zell-spezifischen Promotor exprimiert wurde [65]. Dabei zeigte sich, dass die Expression von humanem ATXN2 mit expandiertem Polyglutaminbereich zur Dysfunktion von Purkinje-Zellen und morphologischen Veränderungen in Mäusen führte. Es konnten jedoch weder nukleäre noch zytoplasmatische Aggregationen von ATXN2 festgestellt werden. In einem weiteren Mausmodell wurde humanes ATXN2 unter der Kontrolle des endogenen SCA2-Promotor in Mäusen zur Expression gebracht. Untersuchungen dieser transgenen Mäuse zeigten signifikante Differenzen in der motorischen Koordination gegenüber Kontroll-Mäusen. Des Weiteren konnte eine spezifische Degeneration von Purkinje-Zellen festgestellt werden [66].

Außerdem wurde eine ATXN2 "knock out"-Maus generiert, um zu prüfen, ob ein Verlust von ATXN2 mit einer Neurodegeneration einher geht; welches jedoch nicht gezeigt werden konnte, da Homozygote $Sca2^{-/-}$ Mäuse keine besonderen histologischen Abnormalitäten aufwiesen. Es waren jedoch signifikant weniger weibliche $Sca2^{-/-}$ Nachkommen zu beobachten. Des Weiteren konnte bei einer moderat erhöhten Zufuhr von Kalorien aus Fetten eine signifikante Gewichtszunahme der "knock out"-Mäuse verzeichnet werden, welches bei einer fettreduzierten Ernährung jedoch nicht beobachtet werden konnte [67]. Somit konnte der Pathomechanismus mit Hilfe dieser verschiedenen Untersuchungen nicht abschließend geklärt und verstanden werden.

1.3 Biologische Funktion von ATXN2-Homologen

Die biologische Funktion des humanen Ataxin-2-Proteins, sowie der ATXN2-Homologe in verschiedenen Organismen, ist noch nicht verstanden. Einblicke konnten jedoch bisher für die Homologe in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* gewonnen werden (Abbildung 2). Diese werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

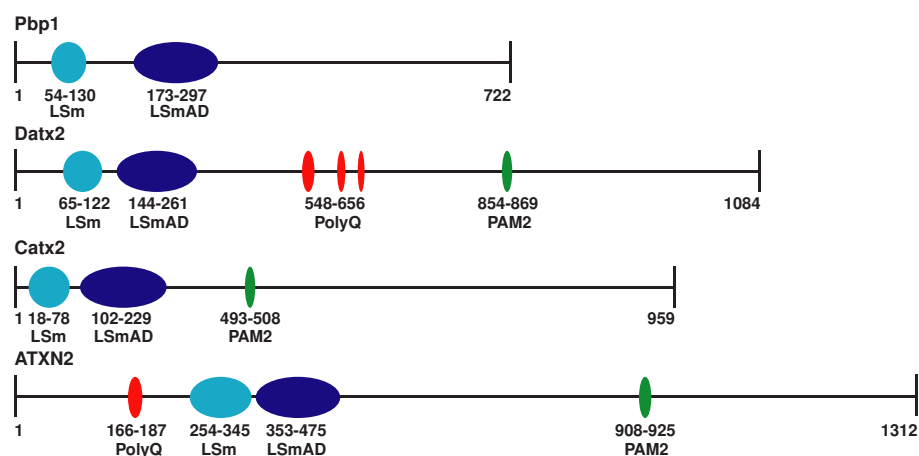


Abbildung 2: Domänenarchitektur der verschiedenen Ataxin-2 Homologe aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Homo sapiens*. Der Polyglutaminbereich (PolyQ) ist als rote Ellipse dargestellt, die LSm- und LSmAD-Domänen in hellblau bzw. blau und das PAM2 Motiv in grün. Pbp1 und Catx2 besitzen keine Polyglutamin-Region, in der mehr als 9 Glutamine aufeinander folgen. Deshalb wurde hier darauf verzichtet, einzelne Regionen mit weniger als 10 Glutaminen darzustellen. Das Ataxin-2 Homolog aus *Drosophila melanogaster* enthält mehrere glutaminreiche Regionen. Auch in diesem Falle wurden nur Bereiche mit mehr als 10 Glutaminen als PolyQ Region dargestellt. Zahlen geben die Aminosäurepositionen der Domänen und die Zahl der Aminosäuren der Proteine insgesamt an.

1.3.1 Das Ataxin-2-Homolog in *Saccharomyces cerevisiae*: Pbp1

Das Homolog des humanen ATXN2 in der Hefe stellt das "Pab1-binding protein 1", Pbp1, welches anfänglich auch als Mrs16 bezeichnet wurde, dar und ist gleichzeitig das am besten untersuchte ATXN2-Homolog. Erstmals wurde Pbp1 1993 in einem Hefe-"Screen"

in $\Delta mrs2$ Hefen, als Suppressor eines Wachstumsdefektes, gefunden [68]. Das Genprodukt von *MRS2* ist in der Hefe beteiligt am Spleissen von mitochondrialen Introns, am mitochondrialen Magnesiumtransport und stellt einen wichtigen Faktor für Homöostase der Zellen dar. Eine Deletion von *MRS2* führt sowohl in Hefen mit mitochondrialen Introns der Gruppe II, als auch ohne diese Introns zu respiratorischen Defekten in der Hefe. Diese können durch ein verändertes Wachstum auf Glycerol-Medium, dem sogenannten "petite"-Phänotyp, detektiert werden. Die Stärke der Ausprägung dieses Phänotyps ist dabei für Hefen ohne die mitochondrialen Gruppe II-Introns schwächer ausgeprägt. In dieser Untersuchung wurden, wie erwähnt, Suppressoren dieses Phänotyps gesucht. Dabei konnte der beobachtete Wachstumsdefekt in $\Delta mrs2$ Hefen ohne mitochondriale Introns der Gruppe II durch Expression von Pbp1 teilweise aufgehoben werden. Bei einer Überexpression von Pbp1 in Hefen mit mitochondrialen Gruppe II-Introns war dieser Effekt jedoch nicht zu beobachten [68].

Interessanterweise zeigte sich, dass humanes ATXN2 und Pbp1 in ihrer Domänenarchitektur Gemeinsamkeiten aufweisen (Abbildung 2). Beide Proteine beinhalten in ihrem N-terminalen Bereich sowohl die LSM- als auch die LSM/AD-Domäne, die in Proteinen, welche am zellulären mRNA-Metabolismus beteiligt sind, hochkonserviert ist; jedoch beinhaltet Pbp1 im Gegensatz zu ATXN2 keinen Glutaminbereich. Somit scheint die Polyglutamineinheit für die Funktion des Proteins nicht essentiell zu sein. Des Weiteren enthält Pbp1, im Gegensatz zum humanen Protein, auch kein PAM2 Motiv, welches ein Bindemotiv für das Poly(A)-Bindepotein darstellt.

Durch Interaktionsstudien konnte Pbp1 mit verschiedenen Schritten des zellulären mRNA-Metabolismus in Zusammenhang gebracht werden. Des Weiteren konnte ein Hefeinteraktionsnetzwerk von Pbp1 erstellt werden, welches die Verbindungen von Pbp1 mit Proteinen des mRNA-Metabolismus darstellt (Abbildung 3) [69].

Pbp1 wurde 1998 in einem "Yeast-two-Hybrid-Screen" als Interaktionspartner von Pab1, dem Hefehomolog des humanen Poly(A)-Bindepoteins (PABP) gefunden. Dabei bindet es trotz fehlendem PAM2 Motiv, an den C-terminalen Bereich von Pab1 [70, 71]. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass Pbp1-defiziente Hefen zwar korrekte 3'-Enden von pre-mRNAs aufweisen, welche aber nicht korrekt polyadenyliert sind und somit keinen vollständigen Poly(A)-Schwanz mehr aufweisen [70]. Daraus wurde geschlossen, dass Pbp1 die Polyadenylierung von pre-mRNA reguliert.

Weitere Studien haben sowohl Fir1 und Ufd1, zwei Proteine, die mit der Poly(A)-Polymerase interagieren und an der Prozessierung des 3'-Endes von mRNA beteiligt sind, als auch den Transkriptionsfaktor Dig1, als Bindepartner von Pbp1 identifiziert (siehe Abbildung 3) [72]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Pbp1 die Aktivität der Poly(A)-nuklease (PAN) durch eine Interaktion mit der Untereinheit Pan2 des Komplexes Pan2-Pan3 negativ reguliert [73].

Des Weiteren assoziiert Pbp1 mit der DEAD/H-box RNA-Helikase Dhh1. Dhh1 interagiert mit diversen Proteinen, die LSM-Domänen enthalten und ist Bestandteil von Proteinkomplexen, die am Entfernen der an der mRNA assoziierten Kappen-Struktur, der Deadenylierung und dem anschließenden Abbau von mRNA Anteil haben [74, 75, 76]. Der Abbau der mRNA in Hefen erfolgt, zumindest zum Teil, in sogenannten "processing bodies" (P-bodies) [77]. Interessanterweise ist Dhh1 ein zentrales Protein dieser Strukturen, denn $\Delta dhh1$ -Hefen weisen Defizite in der Formation der P-body-Strukturen und einen damit verbundenen gestörten mRNA-Abbau auf [78]. In diesem Zusammenhang ist auch die Interaktion von Pbp1 und LSM12 von Interesse. LSM12 ist ein Protein mit bisher unbekannter Funktion, welches aber auf Grund seiner Proteinstruktur den LSM-Proteinen zugeordnet wird. Proteine, die LSM-Domänen besitzen, sind generell, wie bereits erwähnt, an wichtigen Vorgängen im RNA-Metabolismus, wie Modifizierung, Spleissen und Abbau, beteiligt [79, 80]. Es wird spekuliert, dass LSM12 ebenfalls einen Bestandteil von P-bodies darstellt.

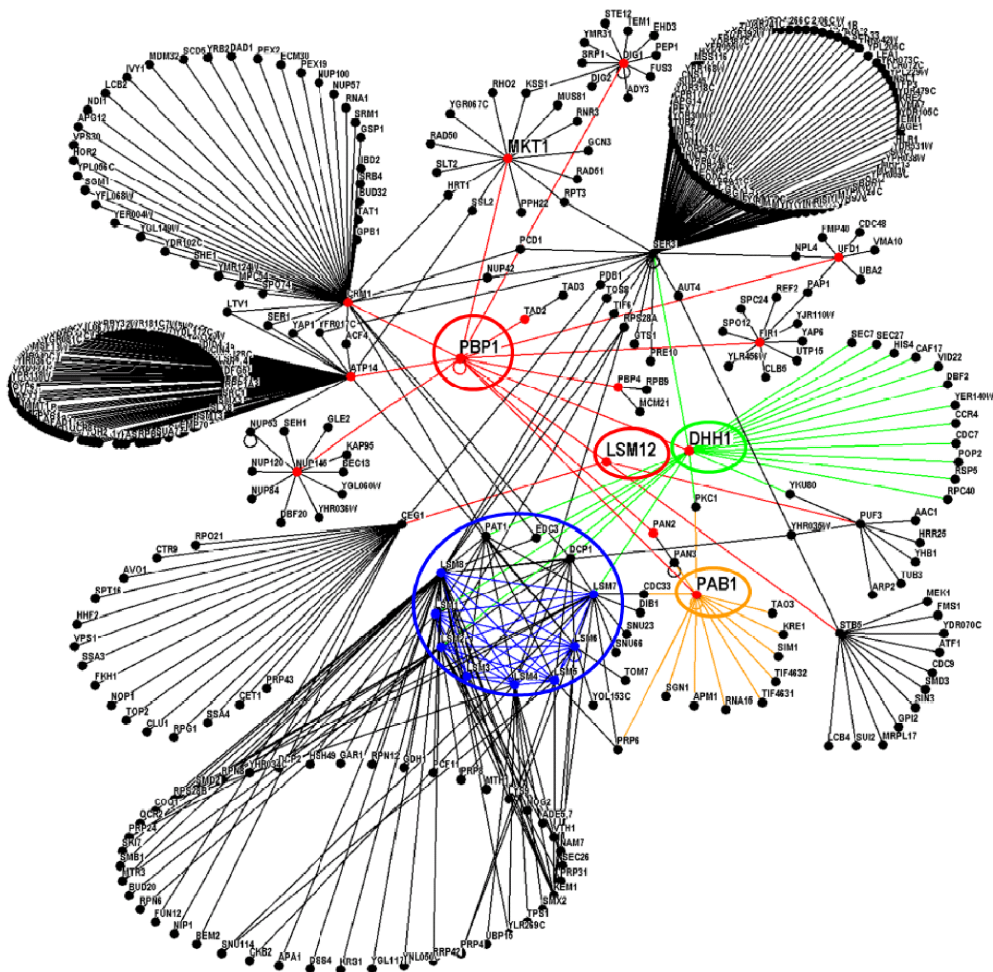


Abbildung 3: Hefeinteraktionsnetzwerk von PBP1 [69]. Jeder Punkt repräsentiert ein *Saccharomyces cerevisiae* Protein, dessen Interaktion mit einem Protein durch einen Strich dargestellt ist. Pbp1 und LSM12 wurden mit einem roten Kreis versehen und die ausgehenden Interaktionen mit roten Strichen dargestellt. Interaktionen ausgehend von Dhh1 oder Pab1 wurden grün, beziehungsweise orange markiert. Das dichte Interaktionsnetzwerk der LSM1-8 Proteine wurde mit einem blauen Kreis und blauen Verbindungen hervorgehoben (aus [69]).

1.3.2 Das Ataxin-2-Homolog in *Drosophila melanogaster*: Datx2

Das *Drosophila melanogaster* ATXN2-Homolog Datx2 wurde 2002 von Satterfield et. al. durch Sequenzvergleiche identifiziert [81]. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, besitzen

ATXN2 und Datx2 eine vergleichbare Domänenarchitektur. Beide Proteine beinhalten sowohl die LSm- und die LSmAD-Domäne als auch das PAM2 Motiv zur Interaktion mit der PABC Domäne verschiedener Proteine. Datx2 besitzt mehrere Polyglutaminbereiche, welche jedoch nicht zusammenhängend, und in der Mitte des Proteins lokalisiert sind.

Die biologische Funktion von Datx2 ist bisher noch nicht geklärt, doch es gibt erste Hinweise darauf, dass Datx2 einen dosisabhängigen Regulator der Aktin-Filament-Formation darstellt [81]. Sowohl Mutationen, die die Datx2-Aktivität reduzieren, als auch eine transgene Überexpression führen zur Sterilität der weiblichen Fliegen, anormaler Morphologie der Sinnesborsten, Verlust oder Degeneration verschiedener Gewebe und erhöhter Sterblichkeit. Diese Phänotypen scheinen aufgrund von Defekten in der Aktin-Filament Formation aufzutreten, die der Synthese von Aktin nachgeschaltet sind. Da Datx2 nicht direkt mit Aktin interagiert wurde gefolgert, dass eine mögliche Beeinflussung der Aktin Synthese durch Datx2 indirekt stattfindet. Dies könnte eventuell durch Kontrolle von Stabilität, Translation oder Lokalisation von mRNAs die für Proteine kodieren, die an der Polymerisation von Aktin beteiligt sind, geschehen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass Datx2 mit Polysomen assoziiert und somit an Translationsvorgängen beteiligt ist. Diese Verbindung wird sowohl über die LSm/LSmAD-Domäne als auch das PAM2 Motiv des Proteins vermittelt, mit welcher Datx2 mit dem Poly(A)-Bindepotein (dPABP) interagiert [82].

1.3.3 Das Ataxin-2-Homolog in *Caenorhabditis elegans*: Catx2

Das ATXN2-Homolog aus *Caenorhabditis elegans*, Catx2, enthält, wie auch Pbp1, keinen Polyglutaminbereich, bei dem mehr als 9 Glutamine aufeinander folgen. Des weiteren beinhaltet Catx2, wie auch ATXN2 und Datx2, das PAM2 Motiv. Im Gegensatz zu ATXN2 und Datx2 ist dieses Motiv jedoch nicht im C-terminalen Bereich, sondern in der Mitte des Proteins lokalisiert.

Interessanterweise wurde Catx2 in Komplexen zusammen mit Cpb1 gefunden [83], und

scheint an der Regulation von translationalen Prozessen beteiligt zu sein. Mittels RNAi ("RNA interference") Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Verminderung des Catx2 Expressionslevels verschiedene Defekte in der postembryonalen Entwicklung der Keimbahn auslöst, da die Proliferation der Keimzellen bei einer reduzierten Konzentration von Catx2 fehlerhaft ist. Des Weiteren hat eine verminderte Expression von Catx2 in *C.elegans* einen starken Einfluss auf die frühe embryonale Entwicklung [83] und führt zu Störungen in der Geschlechts-Determination in den Gonaden von *C.elegans* [84]. Zusätzlich verhindert Catx2 eine verfrühte Meiose in der Keimbahn von *C.elegans* [84].

1.3.4 Das humane Ataxin-2-Homolog: ATXN2

Wie bereits erwähnt, ist die biologische Funktion von ATXN2 noch nicht geklärt. Auf Grund struktureller Belege, scheint dieses Protein, wie auch seine Homologe, eventuell eine Rolle im zellulären RNA-Metabolismus einzunehmen. Das humane ATXN2 ist aus 1312 Aminosäuren (aa) aufgebaut und besitzt eine kalkulierte molekulare Masse von 140 kDa [58, 59, 85]. Die Glutaminregion, die in ca. 90 % der Bevölkerung 22 aufeinanderfolgende Glutamine enthält, wird von Prolin- und Serin-reichen Regionen umgeben. Wie in Abbildung 2 dargestellt, liegt der Polyglutaminbereich im N-terminalen Bereich des Proteins (aa166-187). Insgesamt ist das Protein basisch, enthält jedoch auch eine saure Region, die aus den Aminosäuren 254-475 besteht. In diesem Bereich befinden sich 2 konservierte, globuläre Domänen, die LSm- ("like Sm") und die LSmAD- ("like Sm associated domain") Domäne. Strukturell gesehen wird die LSmAD-Domäne aus α -Helices aufgebaut [86]. Innerhalb der LSmAD-Domäne befinden sich zudem ein Clathrin-vermitteltes trans-Golgi-Signal (aa 414-416) und ein Endoplasmatisches-Retikulum-Ausgangs-Signal ("ER exit signal"; ERD; aa 426-428), sowie eine putative Caspase-3-Schnittstelle (aa 396-399) [65]. Im C-terminalen Bereich des Proteins ist das sogenannte PAM2-Motiv (aa 908-925) lokalisiert, welches ein hochkonserviertes Bindemotiv für Interaktionen mit Proteinen darstellt, die, wie zum Beispiel PABP, eine

PABC-Domäne enthalten [87, 88], und in verschiedenen Proteinen wie zum Beispiel Paip1, Paip2 und RF3 enthalten ist [86].

Aufgrund des Vorhandenseins der LSm- und LSmAD-Domänen und des PAM2-Motivs wird vermutet, dass ATXN2 am zellulären RNA-Metabolismus beteiligt sein könnte. Die LSm-Domäne ist, wie bereits erwähnt, hoch konserviert und enthält die durch einen Linker verbundenen SM-Motive SM1 und SM2 [86]. Alle bisher bekannten Sm/LSm-Proteine sind an wesentlichen RNA-Prozessierungsfunktionen, wie Modifikation, Spleissen und Abbau, beteiligt. Sie können in grossen Komplexen lokalisieren, die verschiedene Aufgaben im Nukleus oder im Zytoplasma erfüllen. Zum Beispiel führt ein nukleärer Komplex der LSm2-8 Proteine Funktionen im pre-mRNA-Spleißen aus, während der zytosolische LSm1-7-Komplex am mRNA-Abbau beteiligt ist [79, 80]. Daher geht man davon aus, dass auch ATXN2 eine ähnliche Rolle im RNA-Metabolismus spielen könnte. Ein weiterer Hinweis auf eine Rolle von ATXN2 im RNA-Metabolismus ist durch die Interaktion von Ataxin-2 mit A2BP1 (Ataxin-2 Bindeprotein 1) gegeben, welches eine RNA-Erkennungssequenz (RNP-Motiv), aufgebaut aus 2 hochkonservierten Konsensus-Sequenzen, RNP-1 und RNP-2, besitzt [89].

Des Weiteren wurde eine Kolo-kalisation von endogenem ATXN2 mit dem Golgi-System der Zelle festgestellt. Diese Beobachtung konnte ebenfalls mit exogenem ATXN2 mit 22 Glutaminen bestätigt werden. Eine Überexpression von ATXN2 mit einem Polyglutaminbereich von 58 bzw. 104 Glutaminen führte in dieser Studie zu einer Dislokation des exogenen ATXN2 [64].

Zusätzlich konnte in einer *Drosophila melanogaster*-Studie eine Assoziation von humanem ATXN2 mit Polysomen gezeigt werden [82]. Diese Bindung kommt zum einen über die PAM2 vermittelte Interaktion von ATXN2 mit dem Polysom-gebundenen PABP zustande, zum anderen ist ATXN2 durch seine LSm/LSmAD-Domäne in der Lage direkt an mRNA zu binden. Daraus wurde gefolgert, dass ATXN2 direkt an translationeller Regulation bestimmter mRNAs beteiligt ist.

Die Untersuchungen über ATXN2 und seine Homologe zeigen, dass diese Proteine ähnliche Funktionen in den verschiedenen Organismen einnehmen. Zentrale Feststellungen dabei sind zum einen die Interaktion aller Homologe mit dem jeweiligen Poly(A)-Bindeprotein des Organismus und zum anderen die strukturellen Gemeinsamkeiten der Proteine, speziell in Form der LSM-Domäne. Wie erwähnt spielen Proteine, die LSM-Domänen aufweisen, grundsätzlich eine Rolle im mRNA-Metabolismus der Zellen.

Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass auch ATXN2 am zellulären mRNA-Metabolismus beteiligt ist und in Vorgängen wie zum Beispiel Stabilisierung, Spleissen oder Degradation von RNA beteiligt sein könnte.

1.4 Zentrale zelluläre Strukturen des mRNA-Metabolismus

Essentielle Schritte in der Kontrolle der Genexpression eukaryotischer Zellen sind die Regulation der Translation und Degradation von mRNA. Dabei stellt die Abspaltung des Poly-A-Schwanzes der mRNA den initialen Schritt dar, um mRNA dem Abbau zuzuführen. Hierfür existieren zwei Hauptabbauwege in eukaryotischen Zellen [90, 91, 92, 93]. In einem Weg wird die deadenylierte mRNA von einem zytoplasmatischen Protein-Komplex, dem Exosom, abgebaut. Dabei wird die mRNA von, im Exosom lokalisierten, Exonukleasen mit 3'-5'-Aktivität degradiert [94]. Hingegen im zweiten Hauptabbauweg folgt nach der Deadenylierung der mRNA die Abtrennung der Kappen-Struktur durch die "decapping"-Proteine DCP1 und DCP2 [90, 94]. Diese am 5'-Ende der RNA lokalisierte Struktur besteht aus einem 7-Methyl-GTP-Rest und schützt die mRNA durch Interaktion mit verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren vor unkontrollierter Degradation. Der Abbau der mRNA erfolgt anschließend durch die Exoribonuklease XRN1 in 5'-3'-Richtung. Alle Proteine, die an diesem Weg beteiligt sind, kolokalisieren in zytoplasmatischen Strukturen, den sogenannten "processing-bodies" (P-bodies) die auch DCP1- bzw. GW182-bodies genannt werden [95, 96].

P-bodies wurden bisher am besten in Hefe-Zellen studiert und charakterisiert. In den

letzten Jahren erfolgte jedoch vermehrt die Untersuchung dieser Strukturen in Säugetierzellen, wobei vergleichbare Zusammensetzungen dieser zytoplasmatischen Strukturen zwischen Hefe und Säugetierzellen gefunden wurden. P-bodies enthalten, neben den angesprochenen Proteinen, Faktoren wie CCR4, welches an der Deadenylierung der mRNA beteiligt ist und die LSM1-7 Proteine, die als Aktivatoren des "decapping" angesehen werden [97, 98, 99, 100, 101]. Weitere Komponenten dieser zytoplasmatischen Strukturen sind das RNA-assoziierte Protein 55, hEDC3, Hedls und Faktoren des RISC-Komplexes [102, 103, 104, 105]. Zusätzlich dazu ist die DEAD/H-Box-RNA-Helikase DDX6, auch bekannt als RCK/p54, in P-bodies lokalisiert [96]. DDX6, wie auch sein Hefehomolog Dhh1, wurde als Schlüsselkomponente der RNA-Degradation identifiziert. Zudem stellen P-bodies dynamische und reversible zelluläre Strukturen dar, da ihre Zahl und Größe als Antwort auf verschiedene zelluläre Bedingungen variiert, und Proteine und mRNA reversibel in P-bodies lokalisieren [106]. Es besteht eine reziproke Beziehung zwischen der Translation und der Anzahl der P-bodies in Zellen, denn wird die Translationsinitiation blockiert, steigt die Zahl dieser zytoplasmatischen Strukturen. Im Gegensatz dazu führt eine Inhibition der Translationselongationsphase zu einer Auflösung der P-bodies [96]. Des Weiteren verändern sich Anzahl und Größe der P-bodies auch mit dem Zellzyklus. Während sie in der späten S- und G2-Phase größer und zahlreich vorhanden sind, können sie in mitotischen Zellen nicht detektiert werden [98, 107]. Verschiedene Untersuchungen belegen, dass ihr Zusammenschluss von translationell inaktiver mRNA abhängt und auf der Verfügbarkeit von mRNA basiert, welche dem "decapping" unterzogen wird [108, 109]. Des Weiteren wurde postuliert, dass in P-bodies auch translationale Repression stattfindet, da zwar translational arretierte mRNA in P-bodies akkumuliert, ribosomale Untereinheiten und Translationsfaktoren jedoch nicht in diesen Strukturen enthalten sind [108, 109]. Interessanterweise konnte in Hefen gezeigt werden, dass mRNA dort unter bestimmten Bedingungen in P-bodies gespeichert werden und anschließend wieder in die Translation eintreten kann [110].

Neben den P-body-Strukturen, Orten der Degradation, wurden in höheren organisierten Organismen, im Gegensatz zur Hefe, weitere punktförmige zytoplasmatische Strukturen gefunden, die allerdings nach Stresseinwirkung auf Zellen akkumulieren und demzufolge als "Stress Granules" (SG) bezeichnet werden. Wie P-bodies, stellen auch SGs dynamische Ribonukleoprotein-Strukturen dar, die ebenfalls in einem Equilibrium mit Polysomen stehen [111, 112].

Anfänglich wurden SGs im Zytoplasma hitzestresser Tomatenzellen beschrieben [113, 114]. Später folgte die Beschreibung ähnlicher Strukturen in Zellen von Tieren als Folge von Stressbehandlungen [115, 116, 117, 118]. Des Weiteren wurden SGs auch in Geweben von gestressten Tieren detektiert [119, 120], und somit wurde belegt, dass SGs nicht als *in vitro*-Artefakte von Zellkulturexperimenten anzusehen sind, sondern einen integralen Bestandteil der Stressantwort von Organismen darstellen.

Die Induktion von SGs erfolgt durch eine Reihe von Stressbedingungen wie zum Beispiel nach Hitzebehandlung, Induktion von oxidativem Stress durch verschiedene Agenzien oder durch UV-Behandlung von Zellen [118]. SGs setzen sich aus der mRNA von sogenannten "housekeeping" Genen und verschiedenen Proteinen zusammen. Im allgemeinen führen Stress-Bedingungen zu veränderten Anforderungen an die Zelle, denn Stress bedingt vermehrt die Schädigung von Proteinen in Form von Fehlfaltungen oder Denaturierung. Diese nicht mehr funktionstüchtigen Proteine werden dann entweder abgebaut, oder mit Hilfe von Hitzeschockproteinen (HSPs) neu gefaltet [121, 122]. Daher besteht ein vermehrter Bedarf an HSPs, die unter diesen veränderten Bedingungen in der Zelle neu synthetisiert werden müssen, während die Translation von normalerweise gebildeten Proteinen gedrosselt und deren mRNA in SGs gelagert wird. Die mRNAs von Hitzeschockproteinen sind daher aus diesen zellulären Strukturen ausgeschlossen [123].

Unter normalen Wachstums-Bedingungen vollzieht sich der Start der Translation in aufeinanderfolgenden Schritten, wie in Abbildung 4 (Schritt 1 - 6) dargestellt. Dabei

formen eIF1, eIF1a und eIF3 in einem ersten Schritt zusammen mit der ribosomalen 40S-Untereinheit den sogenannten 43S-Präinitiationskomplex [124, 125, 126, 127]. Dieser kann an eine mRNA binden, die an ihrem 5'-Ende eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe, assoziiert mit verschiedenen Initiationsfaktoren, wie eIF4E und eIF4G, trägt. An ihrem 3'-Ende befindet sich der Poly(A)-Schwanz der mRNA, an den das Poly(A)-bindeprotein (PABP) gebunden vorliegt (Schritt 1). In einem zweiten Schritt wird der sogenannte ternäre Komplex aktiviert. Dabei ist eIF5 zusammen mit eIF2 und der Start-tRNA^{Met} komplexiert. eIF2 ist zusätzlich noch mit einem GDP verbunden. Dieses GDP wird mit Hilfe von eIF2B in ein GTP gewandelt und eIF2-GTP-tRNA^{Met} entsteht (Schritt 2). In diesem Zustand kann der aktivierte ternäre Komplex an den 43S-Präinitiationskomplex binden (Schritt 3) und den 48S-Komplex formen. Dieser 48S-Komplex wandert nun den nicht-translatierten 5'-Bereich (UTR) des mRNA-Transkriptes entlang und stoppt am Initiationskodon, welches typischerweise ein AUG ist (Schritt 4). Die Erkennung dieses Startkodons führt zur Hydrolyse des eIF2 gebundenen GTP, katalysiert durch eIF5. Daraufhin dissoziieren die Initiationsfaktoren eIF1, eIF1a, eIF2-GDP, eIF3 und eIF5 von der mRNA, und die 60S-Ribosomale Untereinheit kann gebunden werden, um ein funktionelles 80S-Ribosom zu bilden (Schritt 5). Wird dieser Vorgang einige Male durchlaufen, formt sich ein Polysom. Ein Kreisschluss der mRNA wird durch PABP ermöglicht, welches zum einen an den Poly(A)-Schwanz der mRNA bindet und zum anderen mit der Kappen-Struktur assoziiert. Dabei interagiert PABP direkt über eIF4G mit dem Translationsinitiationskomplex. eIF4G assoziiert außerdem mit eIF4A, eIF3, die beide mit der 40S-Untereinheit des Ribosoms verbunden vorliegen, und eIF4E, welches mit der Kappenstruktur der mRNA interagiert. Die Verbindung zwischen PABP und eIF4G führt zur Ringbildung, dem sogenannten "closed loop", der mRNA (Schritt 6).

Unter Stress-Bedingungen hingegen kommt es zur Bildung von SGs. Dabei ist der genaue Weg der Formation dieser zytoplasmatischen Strukturen bisher jedoch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Das derzeit gängige Modell zur Entstehung von SGs

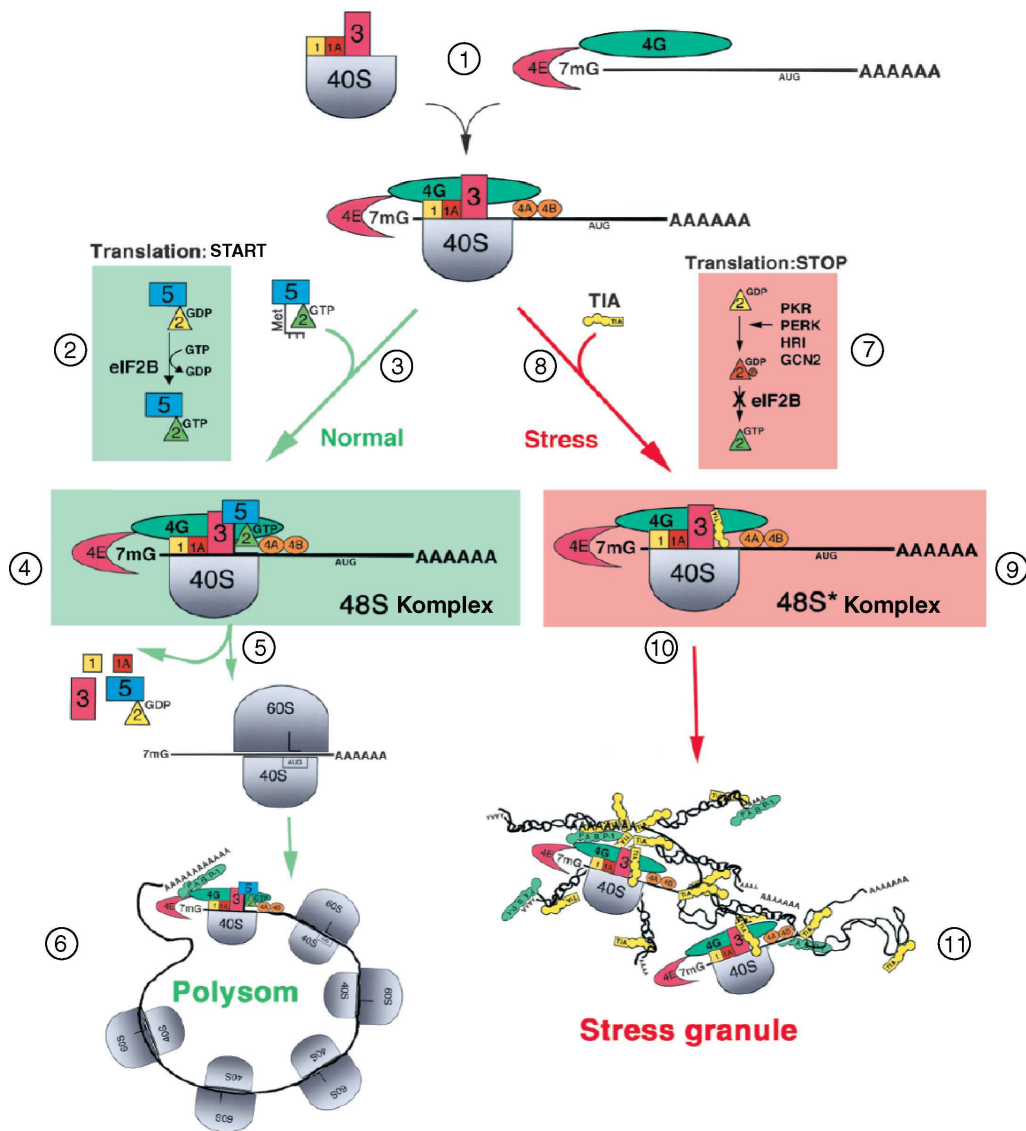


Abbildung 4: Schema zur Translation unter normalen und Stress-Bedingungen in Säugerzellen. Schema nach [128].

ist ebenfalls in Abbildung 4 dargestellt (Schritte 1, 7 - 11). In diesem Modell spielt die Phosphorylierung von eIF2 α die zentrale Rolle. Im ersten Schritt wird wiederum der 43S-Komplex aus der mRNA und der an die Initiationsfaktoren eIF1, eIF1a und eIF3

assoziierte ribosomale 40S-Untereinheit gebildet (Schritt 1). Im Gegensatz zu normalen Wachstums-Bedingungen kann der ternäre Komplex unter Stress-Bedingungen nicht mehr aktiviert werden, da die α -Untereinheit von eIF2 das Ziel einer Familie von Kinasen darstellt, die durch verschiedene Formen von Stress aktiviert werden. Zu dieser Familie zählen unter anderem PKR, PERK-PEK, GCN2 und HRI, wobei zum Beispiel PKR durch Hitze, UV-Licht oder virale Infektionen aktiviert wird [129, 130]. Jede dieser Stress-aktivierten Kinasen phosphoryliert eIF2 α an Serin 51, und erhöht dadurch die Affinität von eIF2 zu eIF2B. eIF2B ist der GDP-GTP-Austauschfaktor, der unter normalen Bedingungen, den ternären Komplex aktiviert. Phosphoryliertes eIF α wirkt jedoch als Inhibitor von eIF2B und bewirkt somit eine Reduktion des frei verfügbaren ternären Komplexes, der die Initiator tRNA auf den 43S-Komplex lädt (Schritt 7). Unter diesen Umständen kann kein 48S-Komplex mehr entstehen und die Translation wird unterbrochen. Gleichzeitig akkumulieren die unter normalen Bedingungen nukleär lokalisierten Proteine "T-cell intracellular antigen-1" (TIA-1) und "TIA-1 related" (TIA-R) im Zytoplasma der Zelle (Schritt 8). Es wird angenommen, dass TIA-1 den Platz des aktiven ternären Komplexes einnimmt und dann mit RNA und den Initiationsfaktoren einen inaktiven 48S*-Komplex bildet (Schritt 9). Die Initiationsfaktoren können nicht freigesetzt werden, und TIA-1- und TIA-R-Moleküle binden an die mRNA, welche mit PABP assoziiert ist (Schritt 10). Dies führt zu einer Formation von SGs, die sowohl TIA-1 und TIA-R, als auch Initiationsfaktoren, ribosomale Untereinheiten, mRNA und PABP enthalten (Schritt 11) [123, 131].

Kürzlich ergaben jedoch Untersuchungen, dass es, neben dem hier beschriebenen Weg zur Bildung von SGs, Wege der SG-Formation gibt, die unabhängig von der Phosphorylierung von eIF2 α -GDP sind [132, 133]. Es konnte gezeigt werden, dass auch eine Störung der Aktivität von eIF4A durch Agenzien wie Pateamin A oder Hippuristanol zur Bildung von SGs führt. EIF4A ist eine RNA-Helikase, die während der Rekrutierungsphase der Ribosomen bei der Translationsinitiation eine Rolle spielt. Eine Störung

der Aktivität von eIF4A verhindert jedoch nicht die Möglichkeit der Phosphorylierung von eIF2 α -GDP unter Stress-Bedingungen. Weiterhin zeigte sich, dass die Formation von SGs auch durch Inhibition der Kappen-abhängigen Translation nach einer Poliovirus-Infektion stattfinden kann.

SGs können demnach entweder durch die Phosphorylierung von eIF2 α und der daraus resultierenden verringerten Verfügbarkeit des ternären Komplexes entstehen, oder durch eine Störung der Translationsinitiation ausgelöst werden. Die genauen Wege zur Formation von SGs müssen jedoch durch weitergehende Untersuchungen aufgeklärt werden.

P-bodies in Hefen und SGs in Säugetierzellen weisen einige gemeinsame Proteinkomponenten auf [111]. So sind verschiedene an der Translation beteiligte Proteine (z.B. eIF4E), Proteine, die die mRNA-Stabilität regulieren (z.B. TTP) und die Exonuclease XRN1, sowohl in P-bodies als auch in SGs enthalten [111]. Daher wurde postuliert, dass diese Strukturen vergleichbare Funktionen in den verschiedenen Organismen übernehmen.

Des Weiteren ist bekannt, dass unter Stress-Bedingungen eine Anlagerung von P-bodies und SGs zu beobachten ist [134, 135]. Während ein SG relativ statisch an einer Position im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist, konnte in "real time"-Fluoreszenzaufnahmen gezeigt werden, dass P-bodies sehr mobil sind. P-bodies lagern unter Stress-Bedingungen an SGs an und werden dadurch für einige Minuten immobilisiert. Nach dieser Zeit kann sich ein P-body wieder von dem gebundenen SG ablösen und gewinnt seine Mobilität zurück. Diese Interaktionen zwischen P-bodies und SGs wird durch mRNA-destabilisierende Faktoren wie Tristetraprolin (TTP) und "butyrate response factor-1" (BRF1) gefördert [111]. Es wird vermutet, dass mRNA, die durch diese Proteine markiert wurde, in P-bodies überführt und anschließend degradiert wird. Diese Vermutung spricht für eine Rolle von SGs als Zwischenglied zwischen Polysomen und P-bodies, in

der SGs die vermehrt auftretende mRNA unter Stress-Bedingungen sortieren und den veränderten Anforderungen an die Zelle anpassen [111]. Die nahe Verwandtschaft zwischen SGs und P-bodies in Säugerzellen wird durch einen dynamischen Link zwischen mRNA-Translation und mRNA-Abbau in der Hefe wiedergespiegelt. Es konnte ein Mechanismus der translationalen Repression nachgewiesen werden, welcher im mRNA-Abbau und in der translationalen Kontrolle eine Rolle spielt [136].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die biologischen Funktionen des Polyglutaminproteins ATXN2, sowie zellulären Mechanismen, welche zur Pathogenität von SCA2 beitragen, sind bislang nicht bekannt und verstanden. Untersuchungen an ATXN2 und seinen Homologen in *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* ergaben jedoch unter anderem erste Hinweise darauf, dass diese Proteine am zellulären mRNA-Metabolismus beteiligt sind. Durch vorangegangene Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ATXN2 und sein entsprechendes Hefe-Homolog Pbp1, funktionell verwandt sind. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde ein Pbp1-Interaktionsnetzwerk erstellt, welches dieses Protein mit dem RNA-Metabolismus in Zusammenhang bringt, wie auch in der Abbildung 3 dargestellt.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die funktionelle Verwandtschaft von Pbp1 und ATXN2, in Form von Übertragung einzelner Interaktionen des Hefenetzwerkes auf das humane System, weiter zu untersuchen. In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, konnten unter anderem die Interaktionen zwischen Pbp1 und Pab1 sowie Pbp1 und Dhh1 für deren humanen Homologe, PABP und DDX6, in "Yeast-two-Hybrid-Analysen" und verschiedenen Voruntersuchungen in Säugetierzellen bestätigt werden. Diese Interaktionen sollten in dieser Arbeit näher funktionell charakterisiert werden. Da sowohl PABP als auch DDX6 unter Stress-Bedingungen in SGs lokalisieren und DDX6 zusätzlich unter normalen Wachstumsbedingungen eine Komponente von P-bodies darstellt, sollte ein

spezielles Augenmerk dieser Arbeit auf der Rolle und Beteiligung von ATXN2 an diesen zellulären, am mRNA-Metabolismus beteiligten, Strukturen liegen. Zur Klärung dieser Fragestellung sollten zum einen "knock down"-Studien von ATXN2 durchgeführt werden, da mit Hilfe einer Reduktion der endogenen Expression von Proteinen wertvolle Einblicke in die Wirkungsweisen dieser Proteine gewonnen werden können. Zum anderen sollten Überexpressionsstudien durchgeführt werden, um die zellulären Auswirkungen eines erhöhten ATXN2-Expressionslevels auf die zelluläre Homöostase zu untersuchen. Dieser Aspekt ist von Interesse, da erhöhte ATXN2-Konzentrationen in Gehirnen von SCA2-Patienten nachgewiesen werden konnten. Dies läßt auf einen eventuellen Einfluss von erhöhten ATXN2-Levels in der Pathogenese von SCA2 schließen. Daher könnten Untersuchungen zur Auswirkung einer erhöhten ATXN2-Konzentration auf verschiedene zelluläre Prozesse, tiefe Einblicke in den noch nicht geklärten Pathomechanismus von SCA2 geben.