

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Agar	Becton, Dickinson
Agarose	Invitrogen
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Benzonase	Merck
Betaine	Sigma-Aldrich
Bisbenzimidazole (Hoechst)	Sigma-Aldrich
Brilliant Blue	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Cycloheximid	Roth
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck

Hefe-Extrakt	Difko
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KHH_2PO_4)	Merck
Magermilchpulver	Uelzena
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck
Methanol	Merck
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck
Natriumazid (NaN_3)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck/Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
Natrium- <i>meta</i> -Arsenit (NaAsO_2)	Merck
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma-Aldrich
NP-40	Merck
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom AG
Pepton	Difko
p-Phenylendiamin (PDA)	Sigma-Aldrich
Puromycin	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor (Complete PI Cocktail Tablets)	Roche
Protease Inhibitor (Complete PI Cocktail Tablets) mit EDTA	Roche
Rinderserum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Rotiphorese (Acrylamid 30%)	Roth
SuperSignal West Femto	Pierce

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Invitrogen
Tris (Trizema Base)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Merck
0,25 % (v/w)Trypsin/1 mM EDTA	Biochrom AG
Tween 20	Roth
Western Lightning	PerkinElmer Life Sciences
X-Phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich
Xylenzyanolblau	Roth

2.1.2 Lösungen

Name	Zusammensetzung
10x PBS	80 g NaCl ₂ 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l H ₂ O
10x TBS	0,2 M Tris-HCl, pH 7,5 5 M NaCl
Proteaseinhibitor-Stocklösung	1 Tablette in 2 ml Wasser
Lysepuffer (Säugerzellen)	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton-X 1 µl/10 ml Benzonase 1:25 Proteaseinhibitor

Name	Zusammensetzung
Lysepuffer (Mausgehirn)	50 mM HEPES-KOH, pH 7 150 mM NaCl 10 % Glyzerin 1 % NP-40 1 mM EGTA, pH 7 20 mM NaF 1 mM DTT 1,5 mM MgCl ₂ 1:5 Proteaseinhibitor EDTA frei
5x Laemmli-puffer	250 mM Tris, pH 6,8 10 % SDS 0,5 % Bromphenolblau 50 % Glyzerin 10 % DTT
10x SDS-PAGE Laufpuffer	250 mM Tris 1920 mM Glyzin 1 % SDS
Sammelgelpuffer, pH 6,8	125 mM Tris 0,1 % SDS
4x Trenngelpuffer, pH 8,8	375 mM Tris 0,1 % SDS
Coomassie-Lösung	1,2 g Brilliant Blue 300 ml Methanol 60 ml Essigsäure 140 ml H ₂ O

Name	Zusammensetzung
Entfärbelösung	50 % Vol. Methanol 7 % Vol. Essigsäure 43 % H ₂ O
5x Blotpuffer	240 mM Tris 200 mM Glyzin 0,185 % SDS
1x Blotpuffer	20 % 5x Blot Puffer 20 % Methanol
Blockpuffer	5 % Magermilchpulver in 1x PBS
NBT	50 mg/ml in 70 % DMF
X-Phosphat	20 mg/ml in H ₂ O
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
5x SQ-Lösung	2,7 M Betain 6,7 mM DTT 6,7 % DMSO 55 µg/ml BSA
10x classic TAQ Puffer, pH 8,8	650 mM Tris-HCl 166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 31 mM MgCl ₂ 0,1 % (v/v) Tween 20
Vent-Polymerase-Puffer, pH 8,8	1 mM KCl 1 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 mM Tris 0,01 % Triton X-100

Name	Zusammensetzung
RNaseIII-Reaktionspuffer, pH 7,9	20 mM Tris 0,5 mM EDTA 5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 140 mM NaCl 2,7 mM KCl
Ladepuffer (Agarosegel)	4 % Glycerin 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylenzyanolblau
TAE-Puffer	10 mM Tris 5 mM Eisessig 0,5 mM EDTA
2 % Paraformaldehyd	2 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS
10x p-Phenylendiamin	10 mg/ml p-Phenylendiamin in Wasser
Mounting-Medium	90 μ l 90 % Gyzerin in PBS (ca. pH 8) 10 μ l 10x p-Phenylendiamin

2.1.3 Materialien und Geräte

Agarosegelkammer	Eigenbau der MPI Werkstatt
Analysenwaage AT 250	Mettler Analytik
Brutschränke	Heraeus
Deckgläser	Roth
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Fluoreszenzmikroskop LSM510 Meta	Zeiss
Flüssigstickstoff-Tank K Serie	SY Lab
Glasplatten	Eigenbau der MPI Werkstatt/Bio Rad

Heizblock	Eppendorf
Kryo Einfrierkontainer und Röhren	Nalgene
Kunststoffküvetten	Roth
Magnetrührer	IKA-Combimag-REO
Nano Drop ND-1000	NanoDrop Technologies
Netzgerät Power Pac	Bio Rad
Nitrozellulose Membran	Schleicher und Schuell
Objektträger	Menzel-Gläser
Parafilm®	American National Can Company
Pasteurpipetten	Brand
PCR-Maschine PTC-200	MJ Research
Petrischalen und Zellkulturtestplatten	Biochrom
Pipetten, einstellbar	Gilson
Präzisionswaage PM 3000	Mettler
Protean II System	Bio Rad
Reaktionsgefäße (1,5 & 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 & 50 ml)	Greiner Bio-one
Röntgenfilme X-OMAT AR	Kodak
Schüttler (Rocky)	CTF Labortechnik Scientific
Spektral Photometer Ultraspec 3000	Amersham Pharmacia
Sterile Pipetten (2 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning incorporated
Tiefkühler -20°C	Bosch
Tiefkühler -80°C	Forma Scientific
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Wasserbad	Haake S
Whatman Papier (3 mm)	Whatman
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Biochrom

2.1.4 Verwendete Bakterienstämme und Medium

Der Stamm *Escherichia coli* XL1-blue (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)]) wurde für Transformationen und die Produktion von Plasmid-DNA verwendet.

Für die Anzucht von *E. coli* XL1-blue wurde Luria-Bertani-Medium (LB), pH 7 verwendet. Das LB-Medium bestand aus 1 % Bakto-Pepton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl. Die Herstellung von Festmedien erfolgte durch Zugabe von 17 g Bakto-Agar pro Liter Medium. Zur Sterilisation wurde das Medium autoklaviert. Für die Selektion von Bakterien, transformiert mit Plasmiden mit Antibiotika-Resistenzen, wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt.

2.1.5 Verwendete Säugetierzelllinien und Zellkulturmedium

Name	Organismus	Organ	ATCC®-Nummer
COS-1	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Niere	CRL-1650™
DU145	<i>Homo sapiens</i>	Prostata	HTB-81™
HEK293T	<i>Homo sapiens</i>	Niere	CRL-1573™
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Gebärmutterhals	CCL-2™
SH-SY5Y	<i>Homo sapiens</i>	Gehirn	CRL-2266™

Zur Kultivierung der verwendeten Zelllinien wurde DMEM-Zellkulturmedium (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) verwendet. Es enthielt 1 g/l Glukose und L-Glutamin. Vor der Verwendung wurden jeweils 10 % Hitze-inaktiviertes FBS und 1 % Penicillin (50 U/ml) sowie Streptomycin (50 µg/ml) zu 500 ml DMEM-Medium zugegeben.

2.1.6 Plasmide

Die in dieser Studie verwendeten Plasmide wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Ralser hergestellt und basieren auf den Vektoren pTL-HA, pTL-FLAG, sowie pCMV-MYC.

Die Vektoren pTL-HA und pTL-FLAG wurden unserer Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Wanker (MDC Berlin) zur Verfügung gestellt. Sie stellen ein Derivat des Vektors pSG5 (Stratagene) mit einem SV40 early Promotor für die Proteinexpression *in vivo* und einem T7 Promotor für die *in vitro* Expression dar. Verändert wurden die Vektoren durch Einführung einer größeren multiplen Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) mit Erkennungsstellen für BamHI, HindIII, XhoI, NotI, SmaI, PstI, SacI, KpnI und BglII. Aufwärts von der Klonierungsstelle wurde die Kodierungssequenz für das HA-Epitop (pTL-HA) oder für das FLAG-Epitop (pTL-FLAG) eingefügt. Dies erlaubt die Detektion von exprimierten Fusionsproteinen mit den jeweiligen Antikörpern gegen das HA- oder das FLAG-Epitop. Die Vektoren weisen zudem ein Ampicillin-Resistenzgen auf.

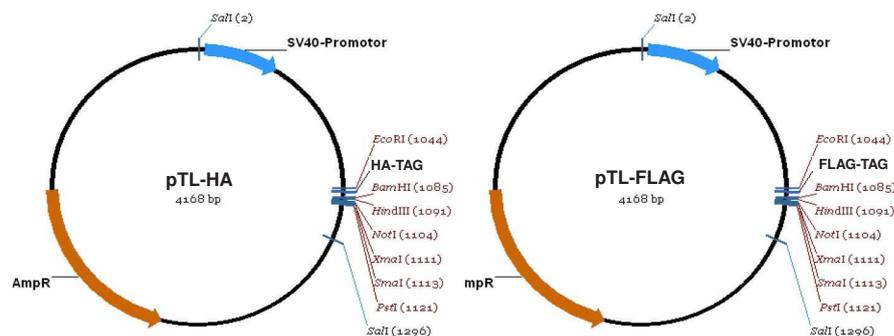


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vektoren pTL-HA und pTL-FLAG.

In den Vektor pTL-HA wurde die vollständige kodierende Sequenz von ATXN2 (aa 1-1312), sowohl mit 22 als auch mit 79 CAG Wiederholungen, eingefügt und als pTLHA-ATXN2-Q22 bzw. pTLHA-ATXN2-Q79 bezeichnet. Des Weiteren wurde jeweils ein N-terminales Fragment mit 22 oder 79 CAGs in Folge (aa 1-396) in den Vektor kloniert (pTLHA-ATXN2-NT-Q22 und pTLHA-ATXN2-NT-Q79). Zusätzlich dazu wurden sowohl die LSm/LSmAD-Domäne (aa 254-475; pTLHA-ATXN2-LSm/LSmAD), als auch der Bereich des Proteins zwischen LSm/LSmAD-Domäne und dem C-terminalen Fragment (aa 481-815; pTLHA-ATXN2-F5) und der C-terminale Bereich (aa 816-1312;

pTLHA-ATXN2-CT) von ATXN2 in den Vektor eingefügt [69, 137]. Die hier beschriebenen Fragmente von ATXN2 können zusätzlich der Abbildung 31 im Ergebnissteil entnommen werden.

Der Vektor pTL-FLAG wurde zur Klonierung der vollständigen kodierenden Gensequenzen von L-Plastin (pTLFLAG-L-Plastin) und T-Plastin (pTLFLAG-T-Plastin) verwendet [137]. Des weiteren wurde die ATXN2-LSm/LSmAD-Domäne (pTLFLAG-ATXN2-LSm/LSmAD) und die kodierende Gensequenz von Endophilin-A3 ab aa 21 (pTLFLAG-endoA3) in den Vektor eingefügt.

Der Vektor pCMV-MYC (Invitrogen) beinhaltet einen Zytomegalovirus Promoter (P_{CMVIE}) zur Proteinexpression. Mit Hilfe dieses Vektors können Proteine mit einem N-terminalen MYC-Tag versehen werden. Zur Replikation in *E. coli* ist ein pUC origin vorhanden. Des weiteren, ist ein SV 40 Polyadenylierungs-Signal vorhanden. Der Vektor weist ein Ampicillin-Resistenzgen auf, welches die Selektion von mit dem Vektor transformierten Bakterien auf Ampicillin erlaubt.

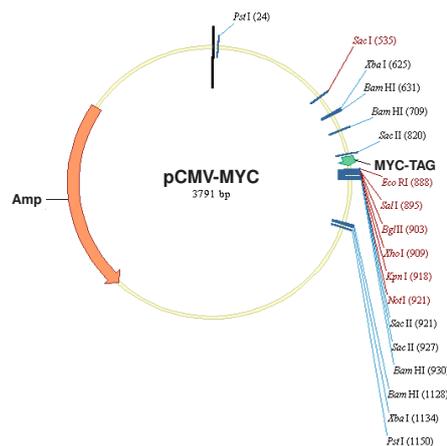


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Vektors pCMV-MYC.

In den Vektor pCMV-MYC wurde ebenfalls die vollständige kodierende Sequenz von ATXN2 sowohl mit 22 als auch mit 79 CAG-Wiederholungen eingefügt und als pCMV-MYC-ATXN2-Q22 bzw, pCMV-MYC-ATXN2-Q79 bezeichnet. Des weiteren wurde die LSm/LSmAD-Domäne in den Vektor kloniert, welcher pCMV-MYC-LSm/LSmAD genannt wurde [138].

2.1.7 Enzyme

- Vent-Polymerase

Diese Polymerase (New England Biolabs (NEB)) wurde für die Amplifikation des Ataxin-2 Fragmentes für die anschließende Herstellung von esiRNA (2.4.1) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

- RNaseIII

Zur Herstellung von esiRNA-Molekülen von ATXN2 wurde RNaseIII verwendet, um die hergestellte doppelsträngige RNA in 25 bp-Fragmente zu zerteilen (2.4.1). Dieses Enzym wurde von Dr. K. Bilikova (MPI für Molekulare Genetik, Berlin) gereinigt und zur Verfügung gestellt.

2.1.8 DNA- und Protein-Standards

- DNA-Standard

Als DNA-Marker für die Agarosegelelektrophorese wurde der "1 kb DNA Ladder" von NEB verwendet.

- RNA-Standard

Als RNA-Marker für die Agarosegelelektrophorese wurde der "RiboRuler™ RNA Ladder, Ultra Low Range" von Fermentas verwendet.

- Protein-Standard

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde der "Prestained Protein Marker Broad Range" von NEB verwendet.

Alle Standards wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.1.9 Antikörper

Name	Organismus	Verdünnung Mikroskopie	Verdünnung Western Blot	Hersteller
anti-ATXN2	Maus	1:200	1:500	BD Bioscience
anti-TIA1	Ziege	1:100	1:200	Santa Cruz
anti-PABP	Kaninchen	1:600	1:2000	R. Lloyd ^a
anti-DDX6 (N-Terminus)	Kaninchen	1:500	1:5000	Novus Biologicals
anti-DDX6 (C-Terminus)	Kaninchen	1:500	1:5000	Novus Biologicals
anti-DCP1	Kaninchen	1:600	-	B. Séraphin ^b
anti-T-Fimbrin	Kaninchen	1:200	1:3000	P. Matsudeira ^c
anti-L-Fimbrin	Kaninchen	1:200	1:3000	P. Matsudeira ^c
anti-Tubulin	Maus	-	1:2000	Biocarta
anti-HSP70	Maus	-	1:2000	BD Bioscience
anti-Staufen	Kaninchen	1:400	-	P. Villacé ^d
anti-FLAG	Kaninchen	1:500	1:5000	Sigma-Aldrich
anti-FLAG	Maus	1:500	1:5000	Sigma-Aldrich
anti-HA	Kaninchen	1:500	1:5000	Roche
anti-HA	Maus	1:500	1:5000	Roche
anti-MYC	Maus	1:600	-	Upstate
POD-anti Maus IgG	Ziege	-	1:5000	Sigma-Aldrich
POD-anti Kaninchen IgG	Ziege	-	1:5000	Sigma-Aldrich
AP-anti Ziege IgG	Kaninchen	-	1:5000	Dianova
Cy3-anti Maus IgG	Ziege	1:500	-	Dianova

Name	Organismus	Verdünnung Mikroskopie	Verdünnung Western Blot	Hersteller
Cy3-anti Kaninchen IgG	Ziege	1:500	-	Dianova
FITC-anti Maus IgG	Ziege	1:500	-	Dianova
FITC-anti Kaninchen IgG	Ziege	1:500	-	Dianova
Cy3-anti Ziege IgG	Kaninchen	1:500	-	Dianova

a - R. Lloyd, Baylor College of Medicine, Houston, USA

b - B. Séraphin, CGM-CNRS, Gif sur Yvette Cedex, Frankreich

c - P. Matsudeira, Whitehead Institute for Biomedical Research, Boston, USA

d - P. Villacé, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spanien

2.2 Methoden

Sofern nicht explizit erwähnt, wurden alle experimentellen Techniken und Methoden gemäß den Ausführungen von Sambrook et al. (1998) durchgeführt.

2.2.1 DNA-Plasmidpräparationen

Die Präparation von Plasmiden erfolgte mit Hilfe verschiedener DNA-Präparationskits entsprechend der Vorschriften der Hersteller (Qiagen, PeqLab). Der Aufschluss von *E. coli*-Zellen erfolgte durch alkalisch Lyse und die Reinigung der DNA über Absorptionschromatographie an einer Silicamembran (Mini Kits) bzw. Anionenaustauscherchromatographie (Midi und Maxi Kit). Zur Isolierung von Plasmiden wurden die entsprechenden Mengen flüssigen LB-Mediums (4 ml im Falle einer Mini-Plasmidpräparation, 50 ml im Falle einer Midi-Plasmidpräparation und 200 ml im Falle einer Maxi-Plasmidpräparation) mit den entsprechenden *E. coli*-Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Bakterien am folgenden Tag geerntet und die Plasmid-DNA anschließend entsprechend der Vorschriften der Hersteller aufgereinigt.

Zur weiteren Verwendung wurde die Konzentration der DNA bestimmt.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch unter Verwendung eines Spektrophotometers "Nano Drop" bestimmt. Dabei wurde jeweils 1 μ l unverdünnter Probenlösung auf die Messvorrichtung aufgetragen und das Verhältnis der Absorption der Lösung von 260 nm zu 280 nm bestimmt.

Der Vorteil der Messung mit diesem Gerät gegenüber einer Bestimmung der Konzentration mit einem herkömmlichen Photometer ist die geringe einzusetzende Menge an Probenflüssigkeit, die bei diesem Gerät bis auf 1 μ l begrenzt werden kann.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

In einem horizontalen Agarosegel wurden DNA- und RNA-Fragmente unterschiedlicher Größe elektrophoretisch getrennt. Die Agarose-Konzentrationen variierte nach Größe der zu trennenden Fragmente zwischen 0,8 - 1 % (w/v) für DNA-Fragmente und 1 - 4 % (w/v) für RNA-Fragmente. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und auf das entsprechende Gel, welches 0,5 g/ml Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen. Die Trennung der Nukleinsäure-Fragmente erfolgte für ca. eine Stunde bei 60 - 70 V unter Verwendung von 0,5 % TAE als Laufpuffer. Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Lagerung von Säugetierzellen

Für die langfristige Lagerung von Säugetierzellen wurden die verschiedenen Zelllinien in einer Kulturflasche mit 75 cm² Grundfläche bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, mit 0,5 ml Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Dar-

auf folgte eine Zentrifugation der Zellsuspension (5 min, 2000 rpm, RT). Anschließend wurden die Zellen in 900 μ l Medium aufgenommen, mit 150 μ l FBS und 105 μ l DMSO versetzt und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden dann in einem mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfrierkontainer im -80°C Gefrierschrank langsam (-1°C/min) auf -80°C gekühlt. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung der Kryoröhrchen in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank zur weiteren Lagerung.

2.3.2 Auftauen von kryokonservierten Säugetierzellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden mit 37°C warmen Kulturmedium aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in Kulturflaschen überführt und mit Medium bedeckt. Die Zellen wurden zur Adhäsion für ca. 4 - 5 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Um das während der Lagerung im flüssigen Stickstoff benötigte DMSO zu entfernen, wurde anschließend das Kulturmedium gewechselt.

Alternativ dazu wurden die Zellen zur Inkulturnahme in 5 ml Medium aufgenommen, direkt zentrifugiert (5 min, 2000 rpm, RT) und in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.3.3 Kultivierung von Säugetierzellen

Die aufgeführten Zelllinien (siehe 2.1.5) wurden bei 5 % CO₂ und 37°C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), komplementiert mit 10 % fötalem Hitze-inaktiviertem Rinderserum (Biochrom), 50 U/ml Penicillin und 50 μ g/ml Streptomycin kultiviert. Dabei wurden die Zellen je nach Konfluenz alle 3 - 5 Tage mit Hilfe von 0,5 ml Trypsin vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, verdünnt und in neue Kulturflaschen (Biochrom) überführt. Für Transfektionsansätze wurden Zellen jeweils auf eine Konfluenz von 50 - 70 % verdünnt und in Zellkulturtestschalen ausgesät.

2.3.4 Transfektion von Säugetierzellen mit Plasmid-DNA

Zur Transfektion der entsprechenden Säugerzellen, wurden diese in geeignete Testplatten (Biochrom) überführt und für 16 - 24 Stunden kultiviert. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde mit 8 - 20 μ l Polyfect (Qiagen) und 100 μ l DMEM (ohne Zusätze) versetzt und 10 min inkubiert. Im Falle von COS-1-Zellen wurden 1 μ g Plasmid-DNA und 8 μ l Polyfect verwendet, während im Falle von HEK293T-, SH-SY5Y- oder DU145-Zellen 2 μ g Plasmid-DNA und 20 μ l Polyfect eingesetzt wurden. In der Zwischenzeit wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1,5 ml frischem Kulturmedium (in "6-well" Platten) bedeckt, und anschließend wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Diese wurden dann für 8 - 48 Stunden zur Expression der Proteine bei 37°C inkubiert.

2.3.5 Induktion von Stress in Säugetierzellen

Für Hitzeschockexperimente, wurden DU145-Zellen in einzelnen Zellkulturschalen (Durchmesser ca. 3 cm) im Wasserbad, soweit nicht anders angegeben, für eine Stunde bei 43,5°C inkubiert. Zur Induktion von oxidativem Stress durch Arsenit, bei HEK293T- oder DU145-Zellen, wurde das Zellkulturmedium mit Natrium-*meta*-Arsenit versetzt (Endkonzentration: 0,5 mM). Diese Lösung wurde anschließend auf die jeweiligen Zellen gegeben und die entsprechenden Ansätze, soweit nicht anders angegeben, für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Zur Inhibition der Translation in Säugetierzellen wurden die Agenzien Cycloheximid (Endkonzentration: 0,2 μ g/ml) und Puromycin (Endkonzentration: 10 μ g/ml) verwendet. Im Falle einer gleichzeitigen Induktion von Hitzestress und Blockierung der Translation durch Puromycin oder Cycloheximid wurde das Agenz dem Zellkulturmedium zugesetzt, und die Zellen für eine Stunde bei 43,5°C im Wasserbad inkubiert. Wenn zusätzlich zur Inhibition der Translation oxidativer Stress induziert werden sollte, wurde das verwendete Agenz und die Natrium-*meta*-Arsenit-Lösung zum Medium gegeben, gemischt und auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C im

Brutschrank.

2.3.6 Lyse von Säugerzellen

Zur Lyse von Säugerzellen, welche einem Stress ausgesetzt (2.3.5), transient transfiziert (2.3.4), oder vorher unbehandelt gelassen worden waren, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 150 bzw. 300 μ l Lysepuffer für 30 min auf Eis oder im Kühlraum bei 4°C. Nach der Lyse der Zellen wurden die Lysate zentrifugiert (5 min, RT, 10000 rpm) und im nächsten Schritt wurde die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt (siehe 2.3.7).

Für die Proteinextraktion aus dem Gehirn von Mäusen, wurden die Gehirne von 6 Monate alten NMRI Mäusen präpariert und bis zur Verwendung auf Eis gekühlt oder direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Extraktion der Proteine wurde jeweils ein Gehirn mit 2 ml Lysepuffer (siehe 2.1.2) versetzt, in einem Potter auf Eis homogenisiert und das Homogenisat zentrifugiert (30 min, 14000 rpm, 4°C). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt und in Aliquots von jeweils 1 mg aufgeteilt. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die jeweiligen Zellysate oder Homogenisate wurden für Koimmunpräzipitationen (2.3.8) oder Trennung der Proteine in eine SDS-PAGE (2.3.9) eingesetzt.

2.3.7 Proteinbestimmung

Die Konzentration von Proteinlysaten wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays bestimmt, welcher auf der Methode nach Bradford basiert [139]. Dabei verändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie-Brilliant Blau G250 durch Bindung an Proteine von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Die Veränderung des Absorptionsmaximums kommt dabei durch Bindung des Farbstoffs an basische (speziell Arginin) und aromatische Aminosäuren der Proteine zustande.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 5 μl Proteinlysat mit 200 μl Bio-Rad-Lösung und 800 μl PBS in Plastikküvetten gemischt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Absorptionen der Proben bei 595 nm im Photometer bestimmt werden. Als Standardreihe wurden BSA-Verdünnungen verwendet.

2.3.8 Koimmunpräzipitation

Mit Hilfe der Koimmunpräzipitation können direkte oder indirekte Assoziationen von Proteinen nachgewiesen werden.

Sollten Protein-Protein-Interaktionen mittels Koimmunpräzipitation aus Säugerzelllysat nachgewiesen werden, wurden die entsprechenden Zellen, wie unter 2.3.6 beschrieben, lysiert und 100 μg Zelllysat mit je 1 μl Primärantikörper für eine Stunde auf einem sich drehenden Rad im Kühlraum inkubiert. Danach wurden jeweils 15 μl Sekundärantikörper (Schaf Anti-Maus IgG oder Schaf Anti-Kaninchen IgG), welcher an Dynabeads[®] M280 (Dyna) gekoppelt war, zugegeben und die Ansätze für weitere 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die paramagnetischen Dynabeads auszuschließen, wurde jeweils Lysat ohne den ersten Antikörper ebenfalls mit Dynabeads inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 3 % BSA/PBS und dreimal mit PBS gewaschen. Die Dynabeads wurden nach dem letzten Waschschrift in 15 μl Lämmliemuffer aufgenommen und die Proteine durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C von den Dynabeads abgetrennt und denaturiert.

Sollten Protein-Protein-Interaktionen mittels Koimmunpräzipitation aus Mausgewebe nachgewiesen werden, wurde eine Proteinextraktion aus Mausgehirn, wie unter 2.3.6 beschrieben, durchgeführt. Für Koimmunpräzipitationen wurde jeweils 1 mg Proteinlysat aus Mausgehirn mit je 1,5 μl spezifischen Antikörpers gegen L- bzw. T-Plastin für fünf Stunden im Kühlraum inkubiert. Nach Zugabe von 30 μl Dynabeads wurden die Ansätze über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 3 % BSA/PBS und dreimal mit PBS gewaschen. Die Dynabeads wurden nach dem letzten Waschschrift in 15 μl Lämmliemuffer aufgenommen. Die Abtrennung der präzipitierten Proteinkomple-

xe von den Dynabeads und die gleichzeitige Denaturierung der Proteine erfolgte durch eine fünfminütige Inkubation der Ansätze bei 95 °C.

Im Anschluß an die Koimmunpräzipitation wurden die jeweiligen Ansätze mittels SDS-PAGE (2.3.9), Western Blotting (2.3.11) und dem darauf folgenden immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine (2.3.12) analysiert.

2.3.9 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse erfolgte nach der Methode von Laemmli [140]. Dabei wird Sodiumdodecylsulfat, ein starkes Detergenz, verwendet, welches sich gleichmäßig an Proteine anlagert, diese stark negativ lädt und vollständig denaturiert. Durch diesen Umstand werden Proteine in einem elektrischen Feld nicht nach ihrer Ladung, sondern nach ihrer Größe getrennt. Die Porengröße der Gele kann durch den prozentualen Anteil von Acrylamid gesteuert und so die Trennung der Proteine jeweils für die Größe der Proteine optimiert werden.

Zur Herstellung von SDS-Gelelektrophorese wurden 2 Glasplatten aus dem Protean II System (Bio Rad) für SDS-Gelelektrophorese in einem dafür vorgesehenen Gestell fixiert. Anschließend wurden die im Folgenden aufgeführten Lösungen in einem Becherglas gemischt und anschließend zwischen die vorbereiteten Glasplatten gefüllt.

	7,5 %-iges Gel	10 %-iges Gel
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid (30 %)	2,5 ml	3,3 ml
Wasser	5 ml	4,2 ml
10 % APS	100 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l

Das Gel wurde zum Glätten der Oberfläche während der Polymerisation mit 200 μ l Ethanol überschichtet. Anschließend wurde ein Sammelgel hergestellt, welches sich wie folgt zusammensetzte:

Sammelgelpuffer	3,125 ml
Acrylamid (30 %)	0,625 ml
10 % APS	50 μ l
TEMED	5 μ l

In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Taschenkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Glasplatten in die Gel-Vorrichtung für den Elektrophoresetank (Protean II System) integriert und in den Tank eingesetzt. Nachdem der Tank mit einer ausreichenden Menge Elektrophoresepuffer gefüllt worden war, wurde der Taschenkamm entfernt und die vorbereiteten Proteinproben in die Taschen gefüllt. Anschließend wurde für ca. 20 min eine Spannung von 80 V angelegt, um die Proben ins Gel einlaufen zu lassen. Danach wurde die Spannung auf 200 V erhöht, bis die durch den im Lämmli-puffer enthaltenen Farbstoff angezeigte Lauffront aus dem Gel ausgetreten war. Die SDS-Gele wurden für die anschließende Analyse der Proteine entweder mit Coomassie gefärbt oder für Western Blots verwendet.

2.3.10 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die im Gel getrennten Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R250 angefärbt. Zu diesem Zweck wurde das Gel in der Lösung kurz in der Mikrowelle erhitzt und anschließend für 10 - 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde der Farbstoff mit der Entfärbelösung (siehe 2.1.2) bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden aus dem Gel entfernt. Darauf folgte die Dokumentation des Gels durch fotografieren.

2.3.11 Western Blotting

Mit Hilfe des "Western Blotting" werden Proteine, die in einem SDS-Gel nach Größe getrennt wurden, durch Elektroblo-tting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. An der Membranoberfläche bleiben diese aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften und

das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten. Hier wurde die Methode des "Semi-Dry-Blottings" eingesetzt [141].

Der Aufbau eines Blots in der Apparatur erfolgte folgendermassen: auf drei in Blotpuffer äquilibrierte 3MM Whatman Filterpapiere wurde die ebenfalls mit Puffer befeuchtete Nitrozellulosemembran gelegt. Dann wurden das SDS-Gel und wiederum drei äquilibrierte Whatman Filterpapiere aufeinander gelegt. Nach Verschluss der Apparatur erfolgte der Transfer der Proteine für 60 - 80 min bei 1 mA/cm². Anschließend wurde die Membran zur Detektion der Proteine einem immunologischen Nachweis unterzogen.

2.3.12 Immunologischer Nachweis von auf einer Membran immobilisierten Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine, wurde die Membran vor der weiteren Behandlung eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit einer 5 %-igen Milchlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper (Verdünnungen siehe 2.1.9) für mindestens eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C im Kühlraum. Danach wurde die Membran dreimal mit 0,5 % Tween 20/PBS gewaschen und erneut für eine Stunde mit einem an POD gekoppelten sekundären Antikörper, inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit PBS konnten die immunmarkierten Proteine enzymatisch mit Hilfe von Entwicklerlösungen ("Western Lightning" oder "SuperSignal West Femto") und Röntgenfilmen detektiert werden. Der entwickelte Film wurde anschließend durch fotografieren dokumentiert.

War der sekundäre Antikörper mit AP verbunden, erfolgten sämtliche Waschschritte und die Verdünnung des sekundären Antikörpers in TBS. Zur Visualisierung der Proteine, wurde der Blot zurest für 10 min mit AP-Puffer äquilibriert. Der enzymatische Nachweis wurde dann mit 10 ml AP-Puffer mit NBT (3,3 mg) und X-Phosphat (2,5 mg) im Dunkeln bis zur deutlichen Sichtbarkeit der Proteinbanden durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Waschen mit AP-Puffer gestoppt und die Membran anschließend getrocknet und

fotografiert.

2.4 RNA-Interferenz

2.4.1 Herstellung von esiRNA

Für Experimente, die das Ziel hatten, die endogene ATXN2-Konzentration mittels RNAi-Technologie zu verringern, sollte eine esiRNA, nach den Beschreibungen von Henschel, hergestellt werden [142].

Zu diesem Zweck wurde der zu amplifizierende Bereich des *SCA2*-Gens mit Hilfe der DEQOR-software (<http://cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html>) bestimmt. Es wurde eine Region von 588 Basen (Region bp 2846 - 3434) des *SCA2*-Gens ausgewählt und mit den Primern, esiATXN2FW und esiATNX2REV, mittels PCR amplifiziert. Die Primer beinhalten die Erkennungssequenz für die T7 Polymerase, welche fett gedruckt hervorgehoben, und für eine *in vitro*-Transkription notwendig sind.

esiATXN2REV 5' **CGTAATACGACTCACTATAGGGGG**AGTATGTGGGTGCAGGGTAGC
esiATXN2FW 5' **CGTAATACGACTCACTATAGGGGG**GTCATCAACAGCCAACCTCCAG

Ein 50 μ l PCR-Ansatz enthielt:

ca. 100 ng DNA-Template

1 μ l dNTPs (200 μ M Endkonzentration)

1 μ l sense Primer (0,4 μ M Endkonzentration)

1 μ l antisense Primer (0,4 μ M Endkonzentration)

1 μ l Vent-Polymerase (1:10 verdünnt in H₂O)

5 μ l 10x Vent-Polymerase-Puffer

6 μ l 25 mM MgSO₄

2,5 μ l SQ-Puffer

32,5 μ l H₂O

PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler der Firma MJ Research mit folgendem Programm durchgeführt:

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95°C	5 min
2	Denaturierung	95°C	30 sek
3	Anlagerung	65°C	40 sek
4	Elongation	72°C	1 min
5	Elongation	72°C	5 min

Die Schritte 2 - 4 wurden in 35 Zyklen wiederholt. Im Anschluss an die PCR wurden jeweils 5 μl der Ansätze mit Ladepuffer versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und die PCR-Produkte, zur Überprüfung, elektrophoretisch getrennt (2.2.3).

Anschließend wurde das Amplifikat mit Hilfe eines DNA-Extraktions-Kits (Qiagen) gereinigt und konzentriert. Danach wurde die Qualität der DNA mit einer Agarosegelelektrophorese überprüft und die DNA-Konzentration mit Hilfe eines UV-Spektrometers (Nano-Drop) bestimmt. Um doppelsträngige RNA zu erhalten, erfolgte bei ausreichender Konzentration (mindestens 30 ng/ μl PCR-Produkt) im nächsten Schritt die *in vitro*-Transkription. Diese wurde mit Hilfe des MEGAscript™ T7 *in vitro* transcription kit (Ambion) durchgeführt. Dazu wurde folgender Ansatz erstellt:

250 ng PCR-Produkt

8 μl NTPs

2 μl 10x T7-Reaktionspuffer

2 μl T7 Enzym-Mix

mit Nuklease freiem Wasser auf 20 μl auffüllen

Zur Transkription wurde folgendes Programm in einem Gradientencycler (MJ Research) durchgeführt:

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Transkription	37 °C	4 Stunden
2		90 °C	3 Minuten
3	Anlagerung	Gradient -0,1 °C/30 sek 90-30 °C	
4		30 °C	1,5 Stunden
5		25 °C	1 Stunde
6		7 °C	unendlich

Anschließend erfolgte der Verdau des Amplifikats mit RNaseIII. Um die Qualität und die Vollständigkeit des Verdau zu überprüfen wurde ein Aliquot entnommen und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Im Falle eines unvollständigen Verdau wurde dieser fortgesetzt. War eine Länge von ca. 25 bp der RNA-Fragmente erreicht, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,4 μ l 0,5 M EDTA gestoppt und die erhaltene esiRNA abermals gereinigt und konzentriert. Die Konzentration wurde wiederum mit Hilfe des UV-Spektrometers bestimmt. Die erhaltene esiRNA wurde anschließend zur Transfektion von Säugerzellen verwendet (2.4.2).

2.4.2 Transfektion von Säugerzellen mit esiRNA und siRNA

Für entsprechende Experimente wurden die im Folgenden gelisteten siRNA Moleküle von Qiagen oder Invitrogen getestet.

Qiagen:

Hs_ATXN2_1_HP - siATXN2#1

Hs_ATXN2_2_HP - siATXN2#2

Hs_ATXN2_3_HP - siATXN2#3

Invitrogen:

ATXN2-HSS109492 - siATXN2#4

ATXN2-HSS109493 - siATXN2#5

ATXN2-HSS109494 - siATXN2#6

Hierzu wurde die gefriergetrocknete siRNA zunächst mit RNase-freiem Wasser auf 20 mM eingestellt und anschließend für Transfektionen eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Zur Transfektion von HEK293T-Zellen mit esiRNA (siehe 2.4.1) oder kommer-

zieller siRNA (siATXN2#1 - siATXN2#6) wurden 60000 - 75000 Zellen in 12-well Testplatten überführt. 300 ng der verwendeten siRNA oder esiRNA Moleküle wurden mit 6 μ l Hiperfect (Qiagen) und 100 μ l DMEM (ohne FBS) versetzt, für 10 min inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen für 68 - 72 Stunden bei 37°C im Brutschrank.

2.4.3 Isolation von RNA

Die Isolation von RNA aus HEK293T-Zellen, welche transient mit siRNA transfiziert wurden (2.4.2), erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Alle RNA-Proben wurden mit RNase-freier DNase I auf der Säule behandelt, um Verunreinigungen der Proben durch DNA zu verhindern. Nach der Extraktion wurde die Konzentration der RNA mit Hilfe eines UV-Spektrometers bestimmt und ihre Integrität mit Hilfe eines Agarosegels, wie unter 2.2.3 beschrieben, überprüft.

2.4.4 Herstellung von cDNA

Je 1 μ g RNA wurde mit Hilfe von "random" Hexamer Primern und SuperscriptII Reverse Transkriptase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde 1 μ g RNA auf ein Endvolumen von 10 μ l mit HPLC-Wasser eingestellt. Zu diesem Ansatz wurden jeweils 1 μ l "random" Hexamer Primer (0,3 μ g/ μ l) und 1 μ l dNTPs (10 mM) zugegeben. Diese Mischung wurde 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. In der Zwischenzeit wurden 4 μ l 5x "First Strand Buffer", 2 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l RNasin inhibitor (40 U/ μ l) und 1 μ l Superscript II RT (200 U/ μ l) pro Probe gemischt und anschließend zum Reaktionsansatz gegeben. Diese Lösung wurde für 2 min bei 29°C und dann 60 min bei 42°C inkubiert. Der Abbruch der Reaktion folgte durch Erhitzen der Lösung für 15 min bei 70°C. Die so erhaltene cDNA konnte anschließend für quantitative "real-time" RT-PCR Analysen eingesetzt werden.

2.4.5 Quantitative "real-time" RT-PCR

Quantitative "real-time" RT-PCR Analysen wurden mit Hilfe von Dr. I. Piccini und D. Balzereit (MPI für Molekulare Genetik, Berlin) durchgeführt. Für quantitative "real-time" RT-PCR Analysen wurden folgende gen-spezifischen TaqMan[®] Proben (Applied Biosystems) verwendet:

- Hs99999903 m1 für Aktin Beta (ACTB)
- Hs00268077 m1 für Ataxin-2 (ATXN2)
- Hs00743792 s1 für Poly(A)-bindeprotein zytoplasmatisch 1 (PABP-C1)

Alle Untersuchungen entsprachen den Amplifikations-Effizienz-Kriterien von 100 % \pm 10 % (Application Note 127AP05-02) und waren untereinander vergleichbar. Die Versuche wurden in je dreifacher Ausführung in 10 μ l Ansätzen, unter Verwendung des TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems), in einem ABI Prism 7900HT Sequence detection System (SDS 2.1, PE Applied Biosystems) durchgeführt. Für alle Gene wurde ein gemeinsamer Schwellenwert gewählt, während die Grundlinie für jedes Gen individuell gewählt wurde. In der Auswertung der Ergebnisse, wurden die Daten für jedes Zielgen zuerst im Verhältnis zum endogenen Kontrollgen (Aktin Beta) normalisiert. Unter Zuhilfenahme der $\Delta\Delta$ Ct Methode wurden anschließend die Verhältnisse von siRNA-transfizierten Zellen zu Kontrollzellen bestimmt. Dabei wurden die Angaben des User Bulletin Nr.2 (Applied Biosystems) befolgt. Die endgültigen Verhältnisse und Standardabweichungen wurden als geometrischer Durchschnitt der Verhältnisse und ihrer Standardabweichung der unabhängigen einzelnen Versuche berechnet.

2.5 Immunfluoreszenz Analyse

Zur Analyse der Lokalisation von Proteinen in den verschiedenen Säugerzelllinien wurden die Zellen auf sterilen Deckgläsern ausgesät und über Nacht kultiviert. Für die transiente Expressionen von Proteinen, für "knock down"-Experimente oder für die Visualisierung der Lokalisation der verschiedenen untersuchten Proteine unter Stress-

Bedingungen, wurden die Zellen ebenfalls auf Deckgläser ausgesät und anschließend, wie unter den vorangegangenen Abschnitten (2.3.4, 2.4.2 und 2.3.5) beschrieben, behandelt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit 2 % Paraformaldehyd behandelt, um die Zellen auf den Deckgläsern zu fixieren. Darauf folgte, zur Permeabilisierung der Zellwände, eine zehninminütige Inkubation Methanol (bei -20°C gelagert). Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für 30 min mit 3 %-igem BSA/PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (2.1.9) inkubiert, welcher entweder gegen das Protein selber oder gegen einen der verwendeten Protein-Tags gerichtet war. Dieser erste Inkubationsschritt erfolgte für eine Stunde. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen anschließend für eine Stunde mit den korrespondierenden, fluorochromgekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Zur Reduzierung des Hintergrundes wurden die Zellen wiederum gewaschen und fünf Minuten mit 50 mM Ammoniumchlorid behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS erfolgte die Färbung der Zellkerne mit Hoechst (bis-Benzimidol 10 $\mu\text{g/ml}$ in PBS) für 20 Sekunden. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen, und die Deckgläser mit den darauf fixierten Zellen auf Objektträger überführt. Um ein zu starkes und schnelles Bleichen der Proben zu verhindern, wurde Mountingmedium verwendet (10 μl 0,1 mg/ml PDA in 90 μl 90% Glycerol).

Eine Ausnahme zu diesem beschriebenen Protokoll bildete die Behandlung der Zellen mit dem Primärantikörper gegen TIA-1. In diesem Falle musste ein verändertes Protokoll zum Färben der Proteine angewendet werden. Dabei wurden die Zellen in einem ersten Schritt für 40 min mit dem Antikörper gegen TIA-1 inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem Cy3-gekoppelten anti-Ziege Antikörper für 40 min. Nach weiteren drei Waschschritten wurden die Zellen mit dem zweiten Primärantikörper für 40 min inkubiert. Darauf folgten wiederum drei Waschschrritte, die Inkubation mit dem FITC gekoppelten Sekundärantikörper und die weitere Behandlung wie oben beschrieben.

Die Untersuchungen wurden mit einem konfokalen inversen Mikroskop (LSM 510 META;

Axiovert 200M; Zeiss) durchgeführt, wobei das Objektiv Plan-NEOLUAR 40x 1,3 öl DIC verwendet wurde. Die Aufnahmen wurden anschließend mit der Zeiss Software LSM 5, Version 3.5 gespeichert und mit Hilfe von AxioVision LE Rel 4.2 für weitere Verwendungen bearbeitet.

2.5.1 Quantitative Analyse von P-body- und SG-Strukturen

Die quantitative Analyse zum Einfluss einer erhöhten ATXN2-Konzentration auf zytoplasmatische P-body-Strukturen, erfolgte indem die aufgenommenen Immunfluoreszenzbilder, in Bezug auf die Anzahl der DDX6 gefärbten P-bodies in transient transfizierten und nicht transfizierten Zellen, analysiert wurden. Es wurde jeweils die Anzahl der P-bodies in den beiden Zelltypen ausgezählt und auf die Zahl der jeweiligen Zellen bezogen. Die Mittelwerte wurden mit Hilfe dieser Angaben gewichtet und die durchschnittliche Anzahl von P-bodies in nicht transfizierten Zellen wurde als 100 % festgelegt. Die restlichen ermittelten Werte wurden dazu ins Verhältnis gesetzt und mit Hilfe der Excel-Software in einem Diagramm dargestellt.

Der Einfluss eines reduzierten ATXN2-Levels auf zytoplasmatische SG-Strukturen wurde ebenfalls mit Hilfe der aufgenommenen Immunfluoreszenzaufnahmen durchgeführt. Es wurden sämtliche TIA-1-markierte SGs in einem Bild gezählt und durch die Anzahl der Zellen im Bild geteilt. Anschließend wurde der Mittelwert aus den Daten der verschiedenen Bilder gebildet und gewichtet. Die Anzahl der SGs in Kontrollzellen wurde als 100 % festgelegt und die restlichen ermittelten Werte wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Diese Angaben wurden mittels "Excel" in einem Diagramm dargestellt.

2.5.2 Quantitative Analyse endogener Proteinkonzentrationen

Die Quantifizierung der Immunreaktivität von L- und T-Plastin bei Überexpression von ATXN2 wurde mit Hilfe der Zeiss LSM 5 Software durchgeführt. Dabei wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten von transient transfizierten und nicht trans-

fizierten COS-1-Zellen in Bezug auf T- und L-Plastin analysiert und verglichen. Dazu wurden jeweils mindestens 10 Regionen von sowohl transfizierten als auch nicht transfizierten Zellen festgelegt und mit Hilfe der Zeiss LSM 5 Software in Bezug auf die Plastin-Immunreaktivität analysiert. Die ermittelten Werte der Immunreaktivität wurden gewichtet und mit Hilfe der Excel-Software in einem Diagramm dargestellt.

