

**Zellbiologische Untersuchungen physiologischer Ataxin-2-
Spaltprodukte & Studien zur Funktion des Ataxin-2-Orthologs
PBP1 im *S. cerevisiae*-Modellsystem**

Dissertation

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

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

vorgelegt von

Gunnar Seidel

Berlin



Dezember 2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Februar 2011 bis März 2015
am **Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik**
unter der Leitung von **Prof. Dr. Hans Lehrach**, in der Arbeitsgruppe
von **Dr. Sylvia Krobitsch** angefertigt.

1. Gutachter

Prof. Dr. Hans Lehrach

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

Innestrasse 63 – 73, 14195 Berlin

Tel. +030 8413 1220

E-Mail: lehrach@molgen.mpg.de

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

Disputation am: 13.07.17

*Für meine fantastischen Vier:
Katja, Fossi, Maja & Noni*

Danksagungen

Zunächst möchte ich mich insbesondere bei Hr. Prof. Dr. Hans Lehrach sowie Hr. Prof. Dr. Rupert Mutzel für ihre Bereitschaft bedanken sich die Zeit für die Begutachtung und Prüfung dieser Dissertation zu nehmen. Ferner danke ich Hr. Prof. Lehrach außerdem für seine Schirmherrschaft über meine Arbeit am Max-Planck-Institut.

Außerdem danke ich ganz besonders Fr. Dr. Sylvia Krobitsch für die mir gebotene Chance in ihrer Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen sowie für die durchweg engagierte, interessierte und hochgradig hilfreiche Betreuung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Fr. Anika Günther vielmals für ihren unermüdlichen und äußerst produktiven Klonierungs-Einsatz danken, durch den sie einen Großteil der hier beschriebenen Untersuchungen überhaupt erst ermöglichte. Zudem danke ich Fr. Cathleen Drescher für ihre professionelle, wertvolle und stets verlässliche Zusammenarbeit, insbesondere hinsichtlich der von ihr durchgeführten Hefe-Screens, die auch eine solide Grundlage für Teile dieser Doktorarbeit bildeten. Ferner danke ich Fr. Dr. Franzi Welzel für die Bereitstellung eines Großteils der hier verwendeten PCR-Primer, sowie für ihre generell enorme Hilfsbereitschaft und fachliche Beratung.

Darüber hinaus möchte ich zudem Fr. Silke Wehrmeyer für ihre fürsorgliche und herzliche Betreuungsarbeit danken, durch die mir insbesondere der Einstieg in die AG Krobitsch erheblich erleichtert wurde. Ebenso danke ich Hr. Dr. Christian Linke für viele kleine Tipps am Rande, von denen ich nicht selten stark profitierte. Darüber hinaus danke ich allen genannten Mitarbeitern der AG Krobitsch für viele unterhaltsame und mitunter auch amüsante Pausengespräche.

Außerdem möchte ich mich zudem bei den zahlreichen Praktikanten, Diplom-, Bachelor- oder Master-Studenten bzw. Studentinnen die die AG Krobitsch durchliefen für ihre Unterstützung bei meinen Projekten bedanken.

Ferner danke ich Dr. David Meierhofer für seine kompetente Hilfe bei der Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen massenspektrometrischen Analysen sowie für seine fachkundige Beratung bei deren anschließender Auswertung.

Darüber hinaus möchte ich besonders Prof. Dr. Georg Auburger meinen tiefen Dank für seine enthusiastische und uneigennützig Zusammenarbeit mit der AG Krobitsch allgemein und mit mir im Speziellen aussprechen.

Besonders herzlich danke ich zudem meinen lieben Eltern und meiner lieben Schwester Brit, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, und auf deren Unterstützung ich mich auch in emotional schwierigen Zeiten immer verlassen kann. Speziell meinen Eltern danke ich zudem für ihre großzügigen Spendengaben und in diesem Zusammenhang auch für ihre Bereitschaft den Druck der vorliegenden Arbeit zu übernehmen.

Schließlich danke ich zudem aus tiefstem Herzen meiner über alle Maßen geliebten Katja für die riesige Geduld, das liebevolle Verständnis, ihre grenzenlose Hilfs- und Opferbereitschaft und das Vertrauen in mich, die sie mir während der nicht selten sehr stressreichen Zeit des Zusammenschreiben dieser Arbeit entgegengebracht hat. Du bist mein Licht in der Finsternis und der Honig auf meinem Brot.

Danke.

*Wir sind, was wir denken.
Alles was wir sind,
entsteht aus unseren Gedanken.
Mit unseren Gedanken, erschaffen wir die Welt*

Siddharta Gautama (Bhudda Shakyamuni) 560 – 480 v. Chr.

1.	Einleitung.....	14
1.1.	Spinocerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2).....	14
1.1.1.	Klassifizierung von SCA2.....	14
1.1.2.	Klinische und neuropathologische Aspekte von SCA2.....	15
1.1.3.	Struktur und alternative Varianten des Gens <i>ATXN2</i>	17
1.1.4.	Struktur des Proteins Ataxin-2 und Vorstellung wichtiger Ataxin-2-Orthologe.....	17
1.1.5.	Funktionen von Ataxin-2 und seiner Orthologe.....	19
1.1.5.1.	<i>Ataxin-2 als Regulator der Proteintranslation.....</i>	19
1.1.5.2.	<i>Verbindungen zwischen Ataxin-2 und alternativem Spleißen.....</i>	20
1.1.5.3.	<i>Funktionen von Ataxin-2 beim mRNA-Abbau.....</i>	20
1.1.5.4.	<i>Beteiligung von Ataxin-2 an endozytotischen Prozessen.....</i>	21
1.1.5.5.	<i>Ataxin-2-Funktionen bei der geschlechtsspezifischen Entwicklung von Eukaryonten.....</i>	22
1.1.5.6.	<i>Einflüsse von Ataxin-2 auf Leben und Tod von Zellen.....</i>	23
1.1.5.7.	<i>Ataxin-2 und die zelluläre Stressantwort.....</i>	23
1.1.6.	Mögliche Pathomechanismen von SCA2.....	24
1.1.7.	SCA2-Therapieansätze	26
1.1.8.	SCA2 im Kontext anderer neurodegenerativer Erkrankungen.....	29
1.2.	Ribonukleoprotein-Partikel-Granula & Neurodegeneration.....	30
1.2.1.	Komponenten & Funktionen von P-Bodies.....	30
1.2.1.1.	<i>Die Rolle von P-Bodies beim konventionellen mRNA-Abbau.....</i>	30
1.2.1.2.	<i>P-Bodies und RNAi-vermittelter mRNA-Abbau.....</i>	32
1.2.1.3.	<i>P-Bodies als Orte der Translationsrepression und Speicherung von mRNA-Transkripten.....</i>	32
1.2.1.4.	<i>P-Bodies und der NMD (nonsense-mediated mRNA-decay).....</i>	33
1.2.2.	Assemblierung von P-Bodies.....	33
1.2.3.	Komponenten & Funktionen von Stress-Granula.....	35
1.2.3.1.	<i>Stress-Granula speichern mRNA-Transkripte während der integrierten Stressantwort.....</i>	35
1.2.3.2.	<i>Transkript-Verteilerfunktion von Stress-Granula und ihre Beziehung zu P-Bodies.....</i>	37
1.2.3.3.	<i>Stress-Granula und zelluläre Signalübertragung.....</i>	37
1.2.4.	Entstehung und Abbau von Stress-Granula.....	38
1.2.4.1.	<i>Assemblierung von Stress-Granula.....</i>	38
1.2.4.2.	<i>Disassemblierung von Stress-Granula.....</i>	40
1.2.5.	Neuronale Transportgranula.....	41

1.2.6.	Prinzipielle Merkmale von mRNP-Granula.....	42
1.2.6.1.	<i>Grundlegende Umbauprozesse in mRNP und deren Granula.....</i>	42
1.2.7.	Bedeutung von mRNP-Granula für neurodegenerative Erkrankungen.....	44
1.2.7.1.	<i>Gemeinsamkeiten von pathologischen neuronalen Zelleinschlüssen und Stress-Granula.....</i>	46
1.2.7.2.	<i>Beziehungen zwischen Stress-Granula-Komponenten und Krankheitsproteinen.....</i>	48
1.2.7.3.	<i>Ein aktuelles Modell zur Stress-Granula-vermittelten Entstehung pathogener Aggresomen.</i>	50
2.	Ziele der Arbeit.....	51
3.	Material & Methoden.....	52
3.1.	Material.....	52
3.1.1.	Geräte und Werkzeuge.....	52
3.1.2.	Medien, Puffer, Lösungen & Chemikalien.....	53
3.1.3.	Gebrauchsfertige Reagenzien, Lösungen & Kits.....	57
3.1.4.	Bakterienstämme, Hefestämme und Zelllinien.....	57
3.1.5.	Plasmidvektoren und siRNAs.....	58
3.1.6.	Oligonukleotid-Primer.....	59
3.1.7.	Antikörper.....	59
3.1.8.	Software.....	60
3.2.	Methoden.....	61
3.2.1.	Bioanalytische Methoden.....	61
3.2.1.1.	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....</i>	61
3.2.1.2.	<i>Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford (für Immunoblots & MS-Analysen).....</i>	61
3.2.1.3.	<i>HPLC-Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).....</i>	61
3.2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	62
3.2.2.1.	<i>Hefe-Plasmidtransformationen (für Tropftests und Fluoreszenzmikroskopie).....</i>	62
3.2.2.2.	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (für Deletionsstamm-Validierung).....</i>	63
3.2.2.3.	<i>Agarose-Gelelektrophorese (für Deletionsstamm-Validierung).....</i>	63
3.2.2.4.	<i>Sequenzierung von PCR-Amplikons zur Deletionsstamm-Validierung.....</i>	63
3.2.2.5.	<i>Plasmidtransfektionen in HeLa-Zellen (für IF-Mikroskopie).....</i>	64
3.2.2.6.	<i>Transfektionen mit siRNA in HeLa-Zellen (für Immunoblots, qRT-PCR & IF-Mikroskopie)</i>	64
3.2.2.7.	<i>RNA-Aufreinigung aus HeLa-Zellen (für qRT-PCR).....</i>	65
3.2.2.8.	<i>Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR).....</i>	65

3.2.3.	Biotechnologische Methoden.....	66
3.2.3.1.	<i>Bakterien-Plasmidtransformationen (für pDNA-Präparationen).....</i>	66
3.2.3.2.	<i>Plasmid-DNA-Präparationen aus Bakterien.....</i>	66
3.2.4.	Biochemische Methoden.....	67
3.2.4.1.	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (für Immunoblots).....</i>	67
3.2.4.2.	<i>Immunoblotting und ECL-Detektion.....</i>	67
3.2.5.	Zellbiologische Methoden.....	68
3.2.5.1.	<i>Kultivierung von Hefezellen.....</i>	68
3.2.5.2.	<i>Hefezelllysen (für Deletionsstamm-Validierung und MS).....</i>	68
3.2.5.3.	<i>Hefewachstumsanalysen (Tropftests).....</i>	69
3.2.5.4.	<i>Kultivierung von Säugerzellen (Auftauen, Einfrieren, Passagieren und Aussaat).....</i>	69
3.2.5.5.	<i>Lyse von HeLa-Zellen (für Immunoblot).....</i>	70
3.2.6.	Mikroskopische Analysen.....	70
3.2.6.1.	<i>Fluoreszenzmikroskopie galaktose-induzierbarer Fusionsproteine in Hefezellen.....</i>	70
3.2.6.2.	<i>Fluoreszenzmikroskopie nicht-induzierbarer Fusionsproteine in Hefezellen.....</i>	71
3.2.6.3.	<i>Stressinduktion in Hefezellen.....</i>	71
3.2.6.4.	<i>Cycloheximid-Experimente in den Hefestämmen DHH1- und PBP1-GFP.....</i>	72
3.2.6.5.	<i>Immunfluoreszenz-Mikroskopie von HeLa-Zellen.....</i>	72
3.2.6.6.	<i>Stressinduktion in HeLa-Zellen.....</i>	72
3.2.6.7.	<i>Quantitative Analyse fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen.....</i>	73
3.2.7.	Bioinformatische Methoden.....	73
3.2.7.1.	<i>Protein-Netzwerke und –Anreicherungsanalysen.....</i>	73
3.2.7.2.	<i>Prognose von Kernimportsequenzen im Ataxin-2-Protein.....</i>	73
3.2.7.3.	<i>Paarweise Sequenzalignments von Ataxin-2 & prionartigen Proteinen.....</i>	74
4.	Ergebnisse.....	75
4.1.	Untersuchungen zur Expression physiologischer Spaltprodukte von Ataxin-2 in <i>S. cerevisiae</i>.....	75
4.1.1.	Studien zum Einfluss der Expression physiologischer Ataxin-2-Spalt- produkte auf das Hefewachstum.....	76
4.1.2.	Lokalisationsstudien physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte in Hefezellen.....	78
4.1.3.	Untersuchungen zur Kolo-kalisation physiologischer Ataxin-2-Spalt- produkte mit verschiedenen zellulären Markern.....	79

4.1.4. Untersuchungen zu Effekten physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte auf die Bildung von Stress-Granula und P-Bodies.....	85
4.1.4.1. <i>Analyse der Fokibildung in den Hefestämmen DHH1-GFP und PBP1-GFP unter Standard- und Stressbedingungen.....</i>	<i>85</i>
4.1.4.2. <i>Untersuchungen zur Kolokalisation physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte mit DHH1-GFP und PBP1-GFP unter Standardbedingungen.....</i>	<i>87</i>
4.1.4.3. <i>Untersuchungen zur Fokibildung von Ataxin-2-Spaltprodukten, DHH1 und PBP1 bei zellulärem Stress und unter Einfluss von Cycloheximid.....</i>	<i>89</i>
4.1.5. Studien zu Effekten der Expression physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte in einem TDP-43-Proteinopathie-Hefemodell.....	93
4.1.5.1. <i>Wachstumsanalysen in TDP-43 exprimierenden Hefezellen.....</i>	<i>93</i>
4.1.5.2. <i>Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von ko-exprimiertem TDP-43-GFP und Redstar-markierten Ataxin-2-Spaltprodukten in Hefezellen.....</i>	<i>96</i>
4.2. Immunfluoreszenz-Mikroskopieanalysen verschiedener Ataxin-2-Isoformen in stressbehandelten und unbehandelten HeLa-Zellen.....	99
4.2.1. Studien zur Kolokalisation physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte mit Zellkompartiment-Markerproteinen in unbehandelten Zellen.....	99
4.2.2. Untersuchungen zur Lokalisation und SG-Kolokalisation verschiedener Ataxin-2-Isoformen in oxidativ gestressten und unbehandelten Zellen.....	104
4.2.3. Analyse möglicher Einflüsse überexprimierter Ataxin-2-Spaltprodukte auf die zelluläre Lokalisation von TDP-43.....	110
4.3. Untersuchungen zur Identifikation genetischer Regulatoren von Ataxin-2.....	113
4.3.1. Hefe-Deletionsbank-Screens zur Identifizierung gemeinsamer genetischer Interaktoren von Ataxin-2 und TDP-43.....	113
4.3.1.1. <i>Gerichteter Deletionsbank-Screen auf Modifikatoren der TDP-43-Toxizität in S.cerevisiae....</i>	<i>114</i>
4.3.2. Untersuchungen zur Spezifität des Einflusses der Deletionen von POP2 und CCR4 auf Ataxin-2 in S. cerevisiae.....	116
4.3.2.1. <i>Wachstumsanalysen zu potentiellen Einflüssen der Deletionen von POP2 und CCR4 auf Effekte der Expression von Ataxin-2-Spaltprodukten in Hefezellen.....</i>	<i>116</i>
4.3.2.2. <i>Komplementationsanalysen in den Deletionsstämmen ΔPOP2 und ΔCCR4 unter Verwendung von Überexpressionsvektoren.....</i>	<i>118</i>

4.3.3. Quantitative Fluoreszenzmikroskopie zur Fokibildung von Ataxin-2-Spaltprodukten in ΔPOP2 und ΔCCR4 unter Standard- und Stressbedingungen.	122
4.3.3.1. <i>Studien zur Fokibildung durch Ataxin-2-Spaltprodukte in nicht stressbehandelten Hefezellen.....</i>	122
4.3.3.2. <i>Analyse des Fokibildungsverhaltens von Ataxin-2-Spaltprodukten in stressbehandelten Zellen.....</i>	124
4.3.4. Quantitative fluoreszenzmikroskopische Studien zur Bildung von P-Bodies und Stress-Granula in ΔPOP2 und ΔCCR4.....	127
4.3.5. Mikroskopiestudien zur TDP-43-GFP-Aggregatbildung in ΔPOP2 und ΔCCR4.....	132
4.3.6. Untersuchungen zu Effekten des siRNA-Knockdown humaner POP2- und CCR4-Orthologe in HeLa-Zellen.....	133
4.3.6.1. <i>Validierung der siRNA-Kd-Effizienz für CNOT6-, CNOT6L-, CNOT7- und CNOT8-siRNA....</i>	133
4.3.6.2. <i>Untersuchungen zu Auswirkungen des CNOT7/ CNOT8-siRNA-Doppel-Knockdown auf die zellulären Transkriptmengen von Ataxin-2 oder TDP-43.....</i>	136
4.4. Vergleichende Proteomanalysen in <i>S. cerevisiae</i>.....	139
4.4.1. <i>Untersuchung von Einflüssen der PBP1-Deletion auf das Hefeproteom.....</i>	139
4.4.2. <i>Auswertung der Proteomanalysen hinsichtlich PB- und SG-Komponenten..</i>	145
5. Diskussion.....	148
5.1. Untersuchung zweier physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte im <i>S. cerevisiae</i>-Modellsystem.....	148
5.1.1. <i>Die Ataxin-2-Spaltprodukte zeigten Unterschiede hinsichtlich zytotoxischer Effekte und Fokibildung in Hefezellen.....</i>	149
5.1.1.1. <i>Die Foki des Ataxin-2-C-Terminus kolokalisierten mit Markerproteinen diverser subzellulärer Kompartimente.....</i>	150
5.1.1.2. <i>Die Ataxin-2-C-Terminus-Foki sind keine Stress-Granula und inhibieren zudem die Stress-Granula-Assemblierung in Hefezellen.....</i>	152
5.1.2. <i>Mögliche Ursachen für die zytotoxische Wirkung des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts in Hefe.....</i>	154
5.2. Studien zur subzellulären Lokalisation und zur Fokibildung zweier physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte in humanen Zellen.....	157

5.2.1. Der Ataxin-2-C-Terminus bildet verschiedene Arten zytoplasmatischer Foki in HeLa-Zellen.....	157
5.2.2. Das N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt zeigte nukleäre Lokalisation und bildete zytoplasmatische Foki in HeLa-Zellen.....	159
<i>5.2.2.1. Identifikation einer unkonventionellen Kernimportsequenz im N-terminalen Ataxin-2-Abschnitt mittels eines NLS-Prognose-Werkzeugs.....</i>	<i>160</i>
<i>5.2.2.2. Eine SCA2-pathogene PolyQ-Domänen-Expansion des Ataxin-2-N-Terminus beeinflusste dessen nukleo-zytoplasmatische Verteilung und dessen Fokibildung.....</i>	<i>161</i>
5.3. Identifikation zweier Komponenten des CCR4/NOT-Komplexes als gemeinsame Regulatoren von Ataxin-2 und TDP-43 in Hefe...	163
5.3.1. Der simultane siRNA-Knockdown von CNOT7 und CNOT8 in HeLa-Zellen erhöht deren Ataxin-2 mRNA-Level und hemmt ihre P-Body-Bildung sehr effizient.....	166
5.4. Einflüsse der PBP1-Gendeletion auf das Proteom von <i>S. cerevisiae</i>.....	167
6. Zusammenfassung.....	170
7. Summary.....	172
8. Literaturverzeichnis.....	174
9. Abkürzungen.....	189
Selbstständigkeitserklärung.....	191
Anhang 1	
Anhang 2	

1. Einleitung

1.1. Spinocerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2)

1.1.1. Klassifizierung von SCA2

Der Begriff Ataxie wurde etwa in der Mitte des 19. Jahrhunderts eingeführt, und er beschreibt klinische Syndrome, die von einem progressiven Kontrollverlust der Bewegungskoordination gekennzeichnet sind und mit Läsionen im Kleinhirn und seinen Leitungsbahnen einhergehen.

In der darauf folgenden Zeit wurden Ataxien zudem häufig aufgrund neuropathologischer Befunde kategorisiert. Das führte zu Bezeichnungen wie pontocerebelläre Atrophie oder spinocerebelläre Degeneration, woher auch die spinocerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2) ihren Namen hat. Allerdings korrelierte diese Einteilung schlecht mit Ergebnissen aus klinischen oder genetischen Studien, weshalb in den 1980er Jahren von Harding ein Klassifizierungssystem eingeführt wurde, das sich auf genau diese Kriterien stützt und weite Akzeptanz gefunden hat. Demnach werden Ataxien in drei Kategorien eingeteilt: die erworbenen Ataxien, die nicht erblichen degenerativen Ataxien sowie die erblichen (hereditären) Ataxien, welche die größte Gruppe bilden. Letztere werden zudem in autosomal-dominant und -rezessiv vererbte, X-Chromosom-gebundene sowie Mitochondrien-DNA-Mutations-assoziierte Ataxien aufgeteilt. Diesbezüglich gehören spinocerebelläre Ataxien zur Gruppe der autosomal-dominanten hereditären Ataxien.¹

Ferner konnten durch genetische Untersuchungen in den letzten Jahrzehnten bisher 36 verschiedene SCA-assoziierte chromosomale Loci ausgemacht werden, die man chronologisch nach dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung nummeriert hat, woraus sich der Name der jeweiligen SCA ergibt. Die entsprechenden zugrundeliegenden genetischen Defekte sind allerdings variabel und reichen von Punktmutationen über Deletionen und Insertionen bis zu Expansionsmutationen.^{2,3}

Für SCA2 konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass sie zu den sogenannten Trinukleotid-Repeat Erkrankungen (TRE) gehört, die genetisch durch pathogene Expansionen von Nukleotidtripletts verursacht werden. Andere Vertreter dieser Gruppe sind zum Beispiel das fragile-X Syndrom, für das eine expandierte Region aus CGG-Tripletts verantwortlich ist, sowie die Myotone Dystrophie, die auf einer CTG-Repeatexpansion beruht. Dabei betreffen die Expansionsmutationen in diesen TRE ausschließlich exonische Bereiche. Es gibt jedoch auch TRE, die mit intronischen Repeatexpansionen assoziiert sind, was zum Beispiel auf die rezessive hereditäre Friedreichs-Ataxie zutrifft, für die intronische GAA-Repeatexpansionen verantwortlich gemacht werden.^{1,2,4} Darüber hinaus wird eine relativ große Gruppe von TRE außerdem durch exonische CAG-Repeatexpansionen verursacht, die in einigen Fällen allerdings auch von CAA-Tripletts unterbrochen sein können (s. Abs. 1.1.2.). Da jedoch beide dieser Tripletts für die Aminosäure Glutamin (Q) kodieren, manifestieren sich diese pathogenen Mutationen auf Proteinebene ausschließlich als repetitive Q-Sequenzen, so dass man die entsprechenden TRE unter dem Begriff PolyQ-Erkrankungen zusammengefasst hat, zu denen auch SCA2 gehört.^{2,5}

Insgesamt besteht die Gruppe der PolyQ-Erkrankungen aus SCA2 sowie acht weiteren klinischen Syndromen, von denen die Huntington-Krankheit (HK) am weitesten verbreitet ist. Von dieser weiß man, dass sie durch CAG-Repeatexpansion in Exon 1 des Huntingtin-Proteins (Htt) verursacht wird, und man konnte zudem bereits einige Erkenntnisse zu ihrem Pathomechanismus gewinnen. So zeigte sich, dass pathogenes Htt stärker als dessen nicht pathogene Form proteolytischen Abbauprozessen in Zellen unterworfen ist, und dass die dadurch

produzierten, N-terminalen Htt-Spaltprodukte hohe Akkumulationsaffinität besitzen. Diese bilden daher sehr effizient zytoplasmatische Aggregate, was als Hauptursache der HK-Pathogenese angesehen wird. Neben HK und SCA2 gehören zudem noch einige seltenere Krankheiten zur Gruppe der PolyQ-Erkrankungen. Dies sind die Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA), die Dentatorubrale Pallidolysische Atrophie (DRPLA) sowie die spinocerebellären Ataxien Typ 1, 3, 6, 7 und 17.^{2,4,5}

1.1.2. Klinische und neuropathologische Aspekte von SCA2

Erstmals kartiert wurde das SCA2-verursachende Gen im Jahr 1993, woraufhin es seiner pathologischen Bedeutung entsprechend den Namen *SCA2* oder auch *ATXN2* erhielt. Kurz darauf erkannte man zudem, dass *ATXN2* in SCA2-Patienten krankheitsassoziierte Expansionen einer CAG-Repeatregion in Exon 1 aufweist, weshalb SCA2 den PolyQ-Erkrankungen zugeordnet wird (s. Abs. 1.1.1.).^{6,7,8,9}

Diesbezüglich wurde zudem festgestellt, dass die nicht pathogenen *ATXN2*-Allele meist Repeat-Längen von 22 Trinukleotiden besitzen. Diese sind darüber hinaus oft von CAA-Triplets durchbrochen, was auch auf die am häufigsten in nicht pathogenen *ATXN2*-Allelen vorkommende Trinukleotid-Repeatsequenz, d. h. (CAG)₈CAA(CAG)₄CAA(CAG)₈, zutrifft. Die Länge der Repeatsequenzen gesunder Individuen kann dabei zwischen 15 und 31 Trinukleotiden variieren.^{2,3,10,11}

Bei Expansion der Trinukleotidsequenz auf 32 oder mehr Repeats manifestiert sich die Mutation dementsprechend als SCA2. Dabei ist jedoch nicht nur die Repeatlänge entscheidend, sondern zudem das Fehlen von CAA-Codons, das relativ häufig in SCA2-Patienten beobachtet wird.^{10,11} Die Bandbreite der Repeatlängen in den Patienten liegt dabei meist zwischen 35 und 59 Repeats. Aufgrund einer generellen, relativen genetischen Instabilität expandierter kontinuierlicher CAG-Repeatregionen, neigen die *ATXN2*-Expansionen allerdings zudem dazu sich von Generation zu Generation weiter zu vergrößern, was in Extremfällen zu Repeatlängen von 200 bis 500 Trinukleotiden führen kann. Diesbezüglich konnte ferner für SCA2-Patienten eine inverse Relation zwischen *ATXN2*-CAG-Repeatlänge und dem Alter beim Einsetzen erster Krankheitssymptome (Einsatzalter) festgestellt werden, welche im Bereich großer Repeatlängen am genauesten ist. So erklärt sich auch ein in SCA2-Familien beobachteter, sogenannter Antizipationseffekt, der das Phänomen beschreibt, dass erkrankte Nachkommen von SCA2-Patienten häufig verringertes Einsatzalter sowie progressivere und intensivere Krankheitsverläufe als die Patienten selbst zeigen. Dieser Effekt kann somit nämlich auf die erblich bedingt kontinuierlich expandierenden PolyQ-Repeatregionen in *ATXN2* zurückgeführt werden (s. o.). Dabei kann der Antizipationseffekt zudem gelegentlich so stark sein, dass Nachkommen von SCA2-Patienten bereits erste Symptome zeigen, bevor sie bei den betroffenen Eltern diagnostiziert werden. Schließlich sei außerdem erwähnt, dass Antizipationseffekte auch bei anderen PolyQ-Erkrankungen wie SCA1, SCA3 oder HK auftreten, was dafür spricht, dass diese tatsächlich mit den genetisch instabilen CAG-Repeatexpansionen in Zusammenhang stehen.^{4,2,8,9,12-21}

Als klinisches Syndrom wurde SCA2 erstmalig 1971 von Wadia und Swami in Indien beschrieben, das gleichzeitig das asiatische Land mit dem höchsten Anteil an SCA2-Patienten bezogen auf alle Fälle dominanter hereditärer Ataxien ist ($\approx 17,5\%$), dicht gefolgt von Singapur ($\approx 15,3\%$).^{22,23,24} Weitere Studien in Asien und Australien ergaben allerdings geringere entsprechende SCA2-Anteile, die von ca. 4,5% (Japan) bis etwa 10% (Taiwan) reichten.²⁵⁻³¹

In europäischen Studien zeigte sich außerdem, dass pathogene SCA2 PolyQ-Expansionen in Italien ($\approx 33,3\%$) und Großbritannien ($\approx 27,3\%$) Hauptursache für dominante, hereditäre Ataxien sind.^{32,33,34,35} Relativ hohe

SCA2-Anteile wurden zudem in Spanien ($\approx 15\%$) und in Deutschland ($\approx 13,7\%$) ermittelt.^{16,36,37,38} Eher wenig verbreitet ist SCA2 hingegen in Portugal ($\approx 4\%$) oder den Niederlanden ($\approx 7\%$).^{39,40}

Studien in der US-amerikanischen Bevölkerung ergaben hingegen einen SCA2-Anteil an der Gesamtzahl der untersuchten Fälle dominanter hereditärer Ataxien von ca. $15,4\%$.^{13,41}

Am stärksten von SCA2 betroffen sind allerdings insbesondere mittelamerikanische Staaten wie Mexiko (SCA2-Anteil $\approx 45,4\%$), und v. a. Kuba (SCA2-Anteil $\approx 86,8\%$). Dabei erkrankten speziell in der kubanischen Region Holguín aufgrund eines evolutionären Gründer-Effekts besonders viele Menschen an SCA2, womit diese Region die weltweit höchste SCA2-Populationsprävalenz aufweist. Diese beträgt aktuell etwa 1 zu 2500, was 40 SCA2-Erkrankten pro 100.000 Menschen in der Region entspricht. In Relation zur weltweiten Gesamtprävalenz aller hereditären Ataxien von fünf bis sieben Erkrankten je 100.000 Menschen, zeigt dies gut, wie stark Holguín von SCA2 betroffen ist.^{3,42,43}

Weltweit ist SCA2 damit, zusammen mit SCA6, die am zweithäufigsten vorkommende SCA-Form mit einem Anteil von ca. 15% aller diagnostizierten SCA-Erkrankungen, wobei lediglich SCA3 noch weiter verbreitet ist ($\approx 21\%$ der SCA-Patienten).³

Symptomatisch zeichnet sich SCA2 besonders durch eine charakteristische Verlangsamung sakkadischer Augenbewegungen aus, die in etwa 99% der Patienten vorkommt. Da diese Bewegungseinschränkung relativ auffällig und bereits früh während der Pathogenese erkennbar ist, ist sie zugleich das wichtigste SCA2-Diagnosemerkmal. Die manchmal erst Jahre später einsetzenden weiteren SCA2-Symptome sind v. a. Gangstörungen (ataxischer Gang), Sprachstörungen (cerebelläre Dysarthrie), gestörtes Ansetzen von Bewegungen (Dysmetrie), Schluckstörungen (Dysphagie) und periphere Neuropathien mit früher Hypo- und Areflexie der Extremitäten. Dazu kommen in einigen SCA2-Fällen Haltetremor (posturaler Tremor), Schlafstörungen und Einschränkungen kognitiver Fähigkeiten. Schließlich gibt es zudem eine kleine Gruppe von SCA2-Patienten in denen hauptsächlich Parkinsonismus ausgeprägt ist. Das Einsatzalter der ersten SCA2-Symptome beträgt durchschnittlich etwa 32 Jahren, jedoch ist diesbezüglich aus o. g. Gründen eine große Varianz unter den Patienten zu beobachten.^{2,3,13-17,20,25,44,45} Intensität und Ausmaß der Symptome verstärken sich zudem progressiv im Krankheitsverlauf, wobei die Krankheitsdauer durchschnittlich etwa 12 Jahren beträgt. Die SCA2-Patienten, die in ihren letzten Lebensjahren häufig auf einen Rollstuhl angewiesen sind, sterben schließlich meist an Bronchopneumonie und seltener an Bronchoaspiration oder Herz-Kreislauf-Versagen.^{15,18,44}

Neuropathologisch ist SCA2 v. a. durch eine starke und makroskopisch sichtbare Atrophie des Kleinhirns gekennzeichnet, die mit einem typischen Verlust der Purkinje-Zellschicht des cerebellären Cortex einhergeht. Bei SCA2 ist diese Zerstörung der Purkinje-Zellen zudem im Vergleich zu anderen SCA-Formen besonders stark ausgeprägt. Außerdem konnte in Gewebsschnitten von SCA2 *post mortem* Gehirnen eine makroskopisch erkennbare Pons-Atrophie und -Abflachung, eine Verkümmerng des mittleren Kleinhirnstiels (*pedunculus cerebellaris medius*) sowie Atrophie der *Medulla Oblongata* beobachtet werden. In diesem Zusammenhang zeigte sich speziell im Fall der SCA2 ferner ein signifikanter Schwund des cerebralen Frontallappens. Zusätzliche neuropathologische Merkmale sind darüber hinaus zurückgebildete Cranialnerven III und XII und ein Verblässen der *Substantia Nigra* (mit Neuronenverlusten bis zu über 70%). Schließlich sind in SCA2-Patientengewebe außerdem degenerierte Olivenkerne und thalamische Kerne sowie weitreichende Axondemyelinisierung des Rückenmarkhinterstrangs beobachtet worden. Darüber hinaus sind funktionell betrachtet im zentralen Nervensystem von SCA2-Erkrankten v. a. somato-motorische und -sensorische Schaltkreise, das okulomotorische und visuelle System sowie auditorische, verdauungsspezifische, vestibuläre

und prä-cerebelläre Bereiche geschädigt. Studien zur Nervenleitfähigkeit in SCA-2-Patienten zeigten außerdem veränderte somatosensibel evozierte sowie hirnstammspezifische, auditorisch evozierte und visuell evozierte Potentiale.^{2,44,21}

1.1.3. Struktur und alternative Varianten des Gens *ATXN2*

Mittels Chromosomenkartierung konnte der etwa 147 kbp lange genetische Locus von humanem *ATXN2* der Region 12q23-24.1 auf dem q-Arm von Chromosom 12 zugeordnet werden.⁶

Die ersten erfolgreichen *ATXN2*-Klonierung wurden daraufhin im Jahr 1996 von drei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben, die unterschiedliche Methoden zur Gewinnung der dafür benötigten *ATXN2*-cDNA nutzten. Dabei konnte die *ATXN2*-Transkriptions-Startstelle relativ eindeutig anhand einer Kozak-Konsensussequenz und eines *upstream* des ATG-Startcodons gelegenen, in-frame Stoppcodons definiert werden. Ferner wurde in diesem Zusammenhang zudem ein *ATXN2*-Paralog auf Chromosom 16 entdeckt, das man *ATXN2*-RP (kurz für *related protein*) nannte.^{7,8,9}

Daraufhin wurde die Struktur von *ATXN2* analysiert und gezeigt, dass es aus 25 Exons mit Längen von 37 bp bis 890 bp und Introns mit meist mehreren 1000 bp Länge besteht. Weiterhin wurde eine CpG-Insel um die Transkriptions-Startstelle entdeckt, von der ein Teilstück als essentielle *ATXN2*-Promotorregion identifiziert wurde. Diese erstreckt sich von Position -30 bis 362 bezogen auf die Transkriptions-Startstelle. Unabhängig davon erkannte man zudem ein zweites in-frame ATG-Codon *downstream* der *ATXN2*-Transkriptions-Startstelle, von dem angenommen wird, dass dadurch eine alternative *ATXN2*-Variante gebildet werden könnte, worüber jedoch bisher nur wenig bekannt ist.^{46,47,48}

Darüber hinaus konnten zwei alternative Spleißvarianten von *ATXN2* auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, denen entweder Exon 10 (210 bp) oder Exon 21 (54 bp) fehlte, und für die zudem gewebsspezifische Expression festgestellt werden konnte. So zeigte sich, dass die Exon 10-lose Spleißvariante in Ansätzen von humanem Rückenmark und Gesamthirn relativ zur ungespleißten Form nur schwach exprimiert wird. Im Gegensatz dazu war ihre Expression im Cerebellum höher als die von ungespleißtem *ATXN2*, weshalb angenommen wird, dass diese Spleißvariante eine Rolle bei der SCA2-Pathogenese spielen könnte, da jene v. a. durch Neurodegeneration des Cerebellum gekennzeichnet ist (s. Abs. 1.1.2.). Ähnliche gewebsspezifische Expression konnte zudem für das alternative *ATXN2*-Spleißprodukt ohne Exon 21 festgestellt werden, das in Cerebellum- und Gesamthirn-Proben schwächer exprimiert worden war als ungespleißtes *ATXN2* andererseits jedoch im Rückenmark eine höhere relative Expressionsstärke aufwies.^{48,49}

Im Gegensatz dazu, wurde für vollständiges *ATXN2* eine relativ ubiquitäre Expression in menschlichen Geweben nachgewiesen, wobei es nur in Lungen- und Nierengewebe nicht dargestellt werden konnte. Zudem zeigte auch die separate Analyse verschiedener Hirnregionen kaum Unterschiede in deren *ATXN2*-Expressionstärke, was die Entdeckung der genannten alternativen Spleißvarianten umso bedeutungsvoller wirken lässt.^{7,9,50}

1.1.4. Struktur des Proteins Ataxin-2 und Vorstellung wichtiger Ataxin-2-Orthologe

Das Proteinprodukt von *ATXN2* wird Ataxin-2 genannt (Uniprot Nr.: Q99700). Es besitzt ein Molekulargewicht von ca. 140 kDa und besteht aus 1313 Aminosäuren (AS). Außerdem ist es v. a. aufgrund seines relativen hohen Q-Gehalts ($\approx 8\%$ aller AS) ein basisches Protein ($pI = 10$). Zusätzlich enthält es einige Prolin (P)-reiche Regionen (P-Anteil $\approx 15\%$ aller AS), die Ataxin-2 zu einem weitgehend strukturell ungeordneten Protein

machen. Es besitzt allerdings im N-terminalen Bereich auch einen eher sauren Abschnitt, der von Exon 2 bis 7 des *ATXN2* kodiert wird, und der die beiden einzigen höher geordneten funktionellen Proteindomänen von Ataxin-2 enthält, nämlich die LSm (*Like-Sm*)-Domäne und die LSm-AD (LSm-assoziierte Domäne) (s. Abb. 1.1). N-terminal dieser Domänen liegt außerdem die erwähnte pathogene PolyQ-Domäne des Ataxin-2 (s. v. Abs.), die von Exon1 des *ATXN2* kodiert wird. In C-terminaler Richtung schließt sich den beiden globulären Domänen in relativ großem Abstand zudem ein Poly(A)-Bindeprotein (PABP)-Interaktionsmotiv Typ 2 (PAM2) an. Zusätzlich konnten einige kürzere funktionelle Sequenzmotive in Ataxin-2 identifiziert werden. Diese sind erstens ein Clathrin-abhängiges trans-Golgi-Signal (Sequenz: YDS, AS-Positionen: 414 – 416), zweitens ein ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Austritts-Signal (Sequenz: ERD, AS: 426 – 428) und drittens eine Caspase-3-Konsensussequenz (DXXD) (Sequenz: DPND, AS 397 – 400, s. Abb. 1.1). Ein Kernimportsignal konnte allerdings in Ataxin-2 bisher nicht identifiziert werden, was dessen fast ausschließlich zytoplasmatisches Vorkommen in Säugerzellen erklärt.^{7,50,51,52}

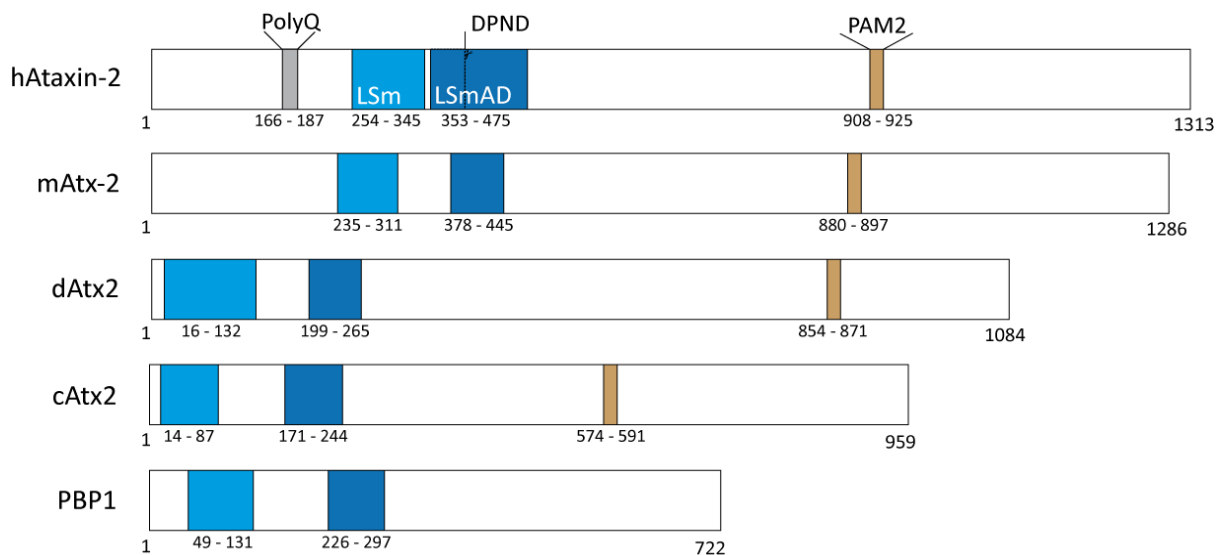


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der funktionellen Proteinstruktur von humanem Ataxin-2 und seinen Orthologen aus *M. Musculus* (mAtx2), *D. melanogaster* (dAtx2), *C. elegans* (cAtx2) und *S. cerevisiae* (PBP1). (PolyQ-Domäne: PolyQ (grau), Like-Sm-Domäne: LSm (hellblau), LSm-assoziierte Domäne: LSmAD (dunkelblau), Poly(A)-Bindeprotein-Interaktionsmotiv: PAM2 (orange).

Insgesamt sind die LSm und LSm-AD flankierenden Regionen von Ataxin-2 nur wenig konserviert. Der Konservierungsgrad der globulären Domänen reichte allerdings aus um über multiple Sequenzalignments eine Vielzahl an Ataxin-2-Orthologen zu identifizieren (s. Abb. 1.1). Hierbei zeigte sich auch die hohe strukturelle Übereinstimmung der LSm-Domäne mit der Sm1-Domäne einiger prokaryontischer Proteine (deshalb *Like-Sm*), die in allen Reichen der Lebewesen konserviert sind. Diese sind dafür bekannt mRNA und andere LSm-Proteine zu binden, und am RNA-Metabolismus und mRNA-Reifungsprozessen beteiligt zu sein, was somit ebenfalls auf Ataxin-2 zutreffen könnte, wofür auch Ergebnisse aus vergleichenden 3D-Strukturmodell-Studien zur mRNA-Bindung an Ataxin-2 sprechen (s. Abs. 1.1.5).^{3,51,52,53,54}

Daneben konnten einige Ataxin-2-Homologe in einem Hefe-2-Hybrid (Y2H)-Screen einer cDNA-Bibliothek hämatopoetischer Zellen als Zytokinrezeptor-Interaktoren identifiziert werden. Diesbezüglich erkannte man ferner, dass die dabei entdeckten Ataxin-2-Homologe alternativ gespleißte Isoformen eines Gens auf Chromosom 16 sind, nämlich des schon in Abs. 1.1.3. beschriebenen ATXN2-RP. Dies führte dazu, dass die bis dahin gefundenen alternativen Varianten dieses Proteins zu Isoformen eines Proteins zusammengefasst wurden,

das heute als Ataxin-2-Like-Protein (A2L) bekannt ist (Uniprot Nr.: Q8WWM7). Dadurch wurden die im o. g. Y2H-Screen entdeckten ATXN2-RP -Varianten zu den A2L-Isoformen 1 bis 5 und das ATXN2-RP zu Isoform 7. Bei Isoform 6 handelt es sich hingegen, um eine alternative, aus Hirnmaterial isolierte ATXN2-RP-Spleißvariante, die jedoch lediglich als Datenbankeintrag publiziert worden ist. Insgesamt wird A2L somit heute als alleiniges Ataxin-2-Paralog angesehen.^{8,51,55}

Der relativ niedrige Konservierungsgrad des Ataxin-2 außerhalb seiner globulären Domänen geht dabei zudem mit dem Fehlen von PolyQ-Domänen in den bislang für die Forschung wichtigsten Ataxin-2-Orthologen einher. Dies umfasst die Orthologe aus *D. melanogaster* (dAtx2), *C. elegans* (cAtx2), *M. musculus* (mAtx-2) sowie PBP1 (PAB1-bindendes Protein 1) das *S. cerevisiae*-Ortholog von Ataxin-2 (s. Abb. 1.1). Zu PBP1 sei hier zudem erwähnt, dass es zwar das Hefe PABP1-Ortholog PAB1 bindet, es jedoch selbst kein herkömmliches PAM2-Motiv besitzt. Dies unterscheidet PBP1 somit von Ataxin-2 sowie den anderen o. g. Orthologen, für die PAM2-Motive nachgewiesen und zudem bereits entsprechende, physische Interaktionen mit ihrem speziesspezifischen PABP1-Ortholog demonstriert werden konnten (Ausnahme: mAtx-2).⁵⁶⁻⁶²

1.1.5. Funktionen von Ataxin-2 und seiner Orthologe

1.1.5.1. Ataxin-2 als Regulator der Proteintranslation

Das humane zytoplasmatische PABP1-Protein (PABPC1) bindet über mehrere sogenannte RRM (RNA-*recognition motif*)-Sequenzen an 3'-Poly(A)-Ketten von mRNA-Molekülen. Ferner werden die so gebundenen mRNA-Transkripte durch gleichzeitige Bindung von PABPC1 an eIF4G (eukaryontischer Initiations-Faktor 4G), einem Bestandteil des eIF4F-Translations-Initiationskomplexes, zirkularisiert. Diese Zirkularisierung wiederum fördert sehr effektiv die Translationsinitiation, und sie gilt daher als essentieller und geschwindigkeitsbestimmender Schritt der zellulären Proteintranslation. PABPC1 kann jedoch außer an eIF4G zusätzlich über eine C-terminale, sogenannte Mlle (*mademoiselle*)-Domäne an das PAM2-Motiv von Ataxin-2 binden (s. Abs. 1.1.4.), weshalb man annimmt, dass Ataxin-2 via PABPC1-Interaktion an der Translationsregulation beteiligt sein könnte.⁶³⁻⁶⁷

Für diese Annahme sprechen auch Untersuchungen im *D. melanogaster*-Modell, die zeigten, dass sowohl dAtx2 als auch Ataxin-2 mit Poly-Ribosomen (kurz: Polysomen) assoziieren können, an denen die Translation zytoplasmatischer Proteine stattfindet. Zudem konnte dabei ebenfalls festgestellt werden, dass für diese Polysomen-Assoziation die PAM2-vermittelte Bindung von Ataxin-2 an ribosomengebundenes PABP1 besonders wichtig ist, wenngleich diese teilweise auch durch direkte mRNA-Bindung der LSM/LSMAD-Domänen des Ataxin-2 vermittelt wurde. Analog dazu konnte darüber hinaus für PBP1 eine Assoziation mit Hefe-Polysomen beobachtet werden. In diesem Fall war dafür allerdings eine PBP1-Komplexierung mit dem Protein MKT1 (*Maintenance of K2 Killer Toxin 1*) notwendig, die zudem für die MKT1-Bindung an die Polysomen ebenfalls essentiell war. Des Weiteren zeigten Saccharosegradienten-Zentrifugationsanalysen im Hefemodell Kofraktionierung von PBP1 mit Polysomen, und schließlich wurde auch in Säugerzellen Assoziation von Ataxin-2 mit dem ER, und zwar präferenziell mit dem rauen ER (rER) beobachtet.^{60,61,68,69,70}

Neben diesen Verbindungen zwischen Ataxin-2 und Polysomen konnten jedoch in kürzlich veröffentlichten Studien noch weitere Hinweise auf regulatorische Einflüsse von Ataxin-2 auf die Proteintranslation erlangt werden. So wurde diesbezüglich z. B. in Analysen humaner Zelllinien festgestellt, dass Ataxin-2-Überexpression dort den Anteil an schwer löslichem PABPC1-Protein erhöht und den des zytoplasmatisch gelösten, nutzbaren

Proteins senkt.⁷¹ Da Ataxin-2 demnach die PABPC1-Verfügbarkeit im Zytoplasma verringert, ist somit davon auszugehen, dass es gleichzeitig indirekt die durch PABPC1 vermittelte Translationsinduktion kontrolliert (s. o.). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen mit *mAtx-2*-Knockout (KO)-Mäusen schließlich ebenfalls Einflüsse des Funktionsverlusts von mAtx-2 auf die Proteintranslation. So führte der KO dabei zur Erhöhung der Mengen einiger translationsrelevanter Transkripte, was mit Hilfe von Microarray-Analysen demonstriert wurde, und er inhibierte zudem die globale Translation, wie [S35]-Methionin-Inkorporationsstudien zeigten.⁷² Insgesamt sprechen diese Ergebnisse somit für eine relativ komplexe Ataxin-2-Funktion im Rahmen der Proteintranslation.

1.1.5.2. Verbindungen zwischen Ataxin-2 und alternativem Spleißen

Neben PABP1 konnte mit dem Ataxin-2 Bindeprotein 1 (A2BP1) noch ein weiterer Interaktionspartner von Ataxin-2 mit RNA-bindenden Motiven entdeckt werden, der zudem ebenfalls an C-terminale Ataxin-2-Bereiche bindet. Ferner konnten diesbezüglich A2BP1-Homologe in *M. musculus*, *C. elegans* und *D. melanogaster*, sowie zwei Paraloge im humanen Genom identifiziert werden. Da das Nematoden-Ortholog allerdings ursprünglich als X-chromosomaler geschlechtsbestimmender Faktor bei der Wurmentwicklung entdeckt wurde, wird dieses gelegentlich auch als Fox-1 (feminisierendes Gen auf X-1) bezeichnet.^{73–78}

Darüber hinaus zeigte sich in diesem Zusammenhang, dass A2BP1 als Regulator des alternativen Spleißens neuronaler Transkripte fungiert, was kürzlich in Untersuchungen an *A2BP1*-KO-Mäusen demonstriert werden konnte. In diesen hatte man nämlich festgestellt, dass A2BP1 die synaptische Übertragung sowie die Membranexzitation von Neuronen durch Bildung alternativer Spleißvarianten verschiedener Zieltranskripte reguliert und so die Zellen vor Hyperexzitation schützt.⁷⁹

Zusätzlich unterliegt A2BP1 jedoch auch selbst alternativen Spleißprozessen. So hatte sich z. B. in einer Maus-Karzinomzelllinie gezeigt, dass dort A2BP1-Exon 19-Skipping induziert werden kann, wobei die dadurch bedingte, verstärkte Expression der Exon 19-losen A2BP1-Isoform wiederum das alternative Spleißen neuronaler A2BP1-Zieltranskripte beeinflusste. Außerdem konnten darüber hinaus auf RNA-Ebene drei alternative A2BP1-Transskripte identifiziert werden, die alle gewebsspezifisches Expressionsverhalten zeigen. Dabei konnte die längste Variante ausschließlich in humanem Hirngewebe nachgewiesen werden, wohingegen das kleinste, alternative A2BP1-Transkript lediglich in Skelettmuskel- und Hirngewebe vorkam. Die mittellange Form ihrerseits wurde schließlich sowohl in Hirn- als auch in Skelettmuskel- und Herzgewebe detektiert, und sie ist darüber hinaus zudem die im Hirn vorherrschende A2BP1-Variante. Demgegenüber konnte A2BP1 in medullären und spinalen Ansätzen nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird deshalb insgesamt vermutet, dass Ataxin-2 über Bindung an A2BP1 an potentiell gewebsspezifischen Spleißprozessen beteiligt sein könnte.^{73,80,81}

Abschließend sei erwähnt, dass PBP1 in *S. cerevisiae* ursprünglich aufgrund seiner Funktion als Suppressor von mitochondrialen Gruppe-II-Intron-Spleißdefekten identifiziert wurde, was zusätzlich für eine prinzipiell mögliche Funktion von Ataxin-2 als Spleißregulator spricht.⁸²

1.1.5.3. Funktionen von Ataxin-2 beim mRNA-Abbau

Kürzlich gemachte Entdeckungen in *D. melanogaster* lassen vermuten, dass Ataxin-2 auch am mikroRNA (miRNA)-vermittelten Gen-Silencing beteiligt ist. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass dAtx2 genetisch mit Me31b (maternale Expression bei 31b) und Ago1 (Argonaut 1) interagiert, die beide für ihre Funktion als miRNA-abhängige Translationsrepressoren bekannt sind. Außerdem erkannte man diesbezüglich,

dass die olfaktorische Langzeitgewöhnung der Tiere, an der ihre Gedächtnisleistung gemessen wird, durch o. g. Interaktionen gefördert wird. Gleiches galt zudem für die damit zusammenhängende synaptische Plastizität, die dadurch ebenfalls verbessert wurde. Dies zeigte also, dass zumindest dAtx2 *in vivo* über genetische Interaktion mit zwei Faktoren des miRNA-vermittelten mRNA-Abbaus neuronale Prozesse beeinflussen kann.⁸³

Weitere Untersuchungen in *S. cerevisiae* belegen zudem eine PBP1-vermittelte negative Regulation des Poly(A)-Nuklease (PAN)-Komplexes. Dieser Enzymkomplex, bestehend aus den Proteinen PAN2 und PAN3, katalysiert als Exonuklease die Deadenylierung v. a. langer 3'-Poly(A)-Ketten an mRNA-Transkripten, was deren Abbau begünstigt. Außerdem interagieren sowohl PBP1 als auch PAN3 mit PAB1 (s. o.), weshalb angenommen wird, dass deren kompetitive Bindung an PAB1 über das mRNA-Schicksal entscheidet. Daraus folgt somit, dass PBP1 in Hefezellen einen mRNA-stabilisierenden Einfluss ausübt, was demnach möglicherweise auch für Ataxin-2 zutreffen könnte.^{84,85} Insgesamt sind allerdings hinsichtlich einer Ataxin-2 vermittelten Regulation des mRNA-Abbaus noch viele Fragen ungeklärt.

1.1.5.4. Beteiligung von Ataxin-2 an endozytotischen Prozessen

Erste Hinweise auf eine mögliche Funktion von Ataxin-2 bei endozytotischen Prozessen, ergaben sich aufgrund des Nachweises seiner Bindung an die Endophiline A1 und A3. Diese Proteine sind nämlich z. B. an endozytotischen Einstülpungen der Plasmamembran beteiligt, oder sie dienen als Adapter für andere an diesem Prozess beteiligte Proteine wie Synaptojanin oder Dynamin, weshalb sie unter anderem auch für die synaptische Signalübertragung wichtig sind. Die o. g. Bindung erfolgt dabei über SH3 (Src-Homologie 3)-Domänen der Endophiline einerseits und zwei SH3-Bindemotive des Ataxin-2 andererseits, die N-terminal und zentral im Ataxin-2 lokalisiert sind, und beide der Klasse II angehören (Konsensussequenz: PXXPXR). In Bestätigung dieser Ergebnisse konnte außerdem beobachtet werden, dass o. g. Proteine in ER und Plasmamembran von Säugerzellen kolokalisieren können. Unabhängig davon wurde ferner in *ATXN2*-KO-Mäusen eine Ataxin-2-Assoziation mit der Ubiquitin-E3-Ligase Cbl (Casitas B-Linie Lymphom Proto-Onkogen) und CIN85 (Cbl interagierendes Protein 85kDa) nachgewiesen, die beide im Komplex mit Endophilin A1 die Internalisierung des EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptors (EGFR) vermitteln. Des Weiteren wurde dabei zudem ein hemmender Einfluss von Ataxin-2 auf die EGFR-Endozytose nachgewiesen, weshalb man davon ausgeht, dass Ataxin-2 ein Inhibitor endozytotischer Rezeptorinternalisierung ist.^{86,87,88,89}

Ebenfalls in o. g. KO-Mäusen konnte in diesem Zusammenhang darüber hinaus eine durch mAtx-2 regulierte posttranskriptionale Reduzierung der Insulin-Rezeptormenge festgestellt werden, die zusammen mit verstärkter pankreatischer Insulinproduktion letztendlich der Grund für die in diesen KO-Tieren beobachteten erhöhten Blutinsulinspiegel und deren Insulinresistenz ist. Man nimmt deshalb an, dass auch der prominenteste Phänotyp diese Mäuse, nämlich ihre Fettleibigkeit vom Verlust der Ataxin-2 Endozytose-Regulatorfunktion abhängt.^{90,91}

Schließlich sei erwähnt, dass Ataxin-2 möglicherweise nicht nur Funktionen an der Plasmamembran sondern auch an der Mitochondrienmembran ausüben könnte. Für sein Hefe-Ortholog PBP1 zeigte sich nämlich, dass es als Suppressor wachstumshemmender Effekte wirkt, die durch Verlust des mitochondrialen Membranproteins TIM18 (Translokon der inneren Mitochondrien-Membran 18) ausgelöst werden.⁹²

1.1.5.5. *Ataxin-2-Funktionen bei der geschlechtsspezifischen Entwicklung von Eukaryoten*

Eine noch nicht erwähnte Besonderheit der im letzten Teilabschnitt beschriebenen *ATXN2*-KO-Mäuse ist ihre verringerte Fruchtbarkeit bzw. Fekundität. Dabei sind besonders weibliche Embryos in ihrer Entwicklung gehemmt, was sich in deren anormaler Unterrepräsentation in der Nachkommenschaft heterozygoter Paarungen ausdrückt. Homozygote Paarungen führen hingegen meist zu einer allgemein schlechteren Fertilität. Man geht daher davon aus, dass mAtx-2 insbesondere die feminine Embryonalentwicklung in Mäusen kontrolliert.⁹⁰

Hinzu kommt, dass cAtx2 eine ähnlich wichtige Rolle bei geschlechtsrelevanten Prozessen in *C. elegans* hat. So wies man dort in RNA-Interferenz (RNAi)-Analysen die Sterilität von cAtx2-defizienten Würmern in der Parental (P0)-Generation nach. Diese ging zudem mit dem Ausbleiben der Ovulation sowie Befruchtungsincompetenz der Würmer einher. Darüber hinaus zeigten Analysen des siRNA-Knockdown (Kd) von cAtx2 eine damit verbundene Störung des strukturellen Zusammenhalts von Embryonen nach Dissektion sowie Zytokinesedefekte in der Embryogenese. Diese Ergebnisse konnten daraufhin mit gezielten cAtx2-Kd-Analysen bestätigt werden. Unabhängige Untersuchungen identifizierten cAtx2 außerdem als Verstärker der Funktion des Glp1-Proteins, einem Notch-ähnlichen Rezeptor, der während der Keimbahndifferenzierung den Eintritt der Gameten in die Meiose inhibiert. Dabei zeigte sich zudem, dass cAtx2 die Meiose auch unabhängig von Glp1 reguliert, wobei ihm v. a. ein spezifischer regulatorischer Effekt auf die Umschaltprozesse zwischen Spermatogenese und Oogenese in den Nematoden nachgewiesen werden konnte. Schließlich wurden in einer weiteren Studie in *C. elegans* prinzipiell ähnliche Ergebnisse erzielt. Dabei konnte allerdings zusätzlich festgestellt werden, dass die cAtx2-abhängige Regulation der Meiose und des Spermatogenese-zu-Oogenese-Wechsels indirekt über cAtx2-Regulation des Translationsrepressor Gld1 vermittelt wird. Diese Ergebnisse zeigen somit insgesamt, dass cAtx2 analog zu mAtx-2 in Mäusen ein Regulator der weiblichen Keimbahndifferenzierung in *C. elegans* ist.^{58,62,93,94,95}

Ähnliches gilt darüber hinaus zudem für *D. melanogaster*, denn auch dort konnte in dAtx2-Keimbahn-Mutanten eine durch dAtx2-Funktionsverlust vermittelte Sterilität sowie reduzierte Ei-Legefähigkeit und Oogenese der betroffenen Fliegen nachgewiesen werden, was zusätzlich für eine Rolle von Ataxin-2 in der weiblichen Keimbahnentwicklung spricht. Eine weitere Entdeckung dieser *D. melanogaster*-Experimente war ferner eine durch dAtx2-Funktionsverlust ausgelöste veränderte Oozyten-Positionierung in den Eikammern der Fliegen, die letztlich auf dosisabhängige indirekte Regulation der Aktinfilamentisierung durch dAtx2 zurückgeführt werden konnte.⁵⁶ Diesbezüglich sei zudem erwähnt, dass exogene Ataxin-2-Expression in einer Hefe-Deletionsmutante, der das aktinbündelnde Protein Fimbrin fehlt, starke synthetische Letalität auslöst. Außerdem komplexieren und kolokalisieren beide humanen Fimbrin-Orthologe (T- und L-Plastin) in Säugerzellen mit Ataxin-2, und darüber hinaus führte Ataxin-2-Überexpression dort zur Anreicherung von L-Plastin. Diese Ergebnisse zeigten somit, dass humanes Ataxin-2 sowie PBP1 mit Regulatoren der Aktinfilamentisierung interagiert, was die Ergebnisse o. g. Experimente in *D. melanogaster* zusätzlich bestärkt.⁸⁶

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang zudem, dass die Ataxin-2-Funktion als geschlechts-regulierender Faktor gewissermaßen sogar in *S. cerevisiae* konserviert ist. Es konnte nämlich für den bereits erwähnten PBP1-MKT1-Komplex (s. Abs. 1.1.5.1.) demonstriert werden, dass er in begrenztem Ausmaß die Aktivität der HO-Endonuklease posttranskriptionell reguliert. Die Nuklease ihrerseits spielt eine entscheidende Rolle beim Wechsel der Hefe-Paarungstypen (Typ α & α), die im weitesten Sinn als Geschlechter der Hefezellen angesehen werden können. Aus dieser Perspektive betrachtet, bedeutet das also, dass somit letztlich auch für das Ataxin-2-Hefe-Ortholog eine artspezifische Geschlechtsentwicklungs-Kontrollfunktion dargestellt werden konnte.⁷⁰

1.1.5.6. Einflüsse von Ataxin-2 auf Leben und Tod von Zellen

Kürzlich veröffentlichte Studien im *S. cerevisiae*-Modellsystem geben Hinweise darauf, dass Ataxin-2 auch Einfluss auf Zellalterungsprozesse haben könnte, da dort für PBP1 ein positiver Einfluss auf die replikative Lebensdauer der Hefezellen demonstriert werden konnte. Dieser Effekt wurde dabei auf PBP1-Bindung an intergenische RNA und damit einhergehender Inhibition von RNA-DNA-Hybriden zurückgeführt, wodurch lebensverkürzende ungleichmäßige Schwesterchromatidaustausche reduziert werden. Demnach könnte auch Ataxin-2 eine lebensverlängernde Funktion in replikativ aktiven Säugerzellen besitzen. Da es dort jedoch hauptsächlich zytoplasmatisch vorkommt, ist zweifelhaft ob ein solcher Effekt im Säugersystem eine große Rolle spielt. Ein pro-apoptotischer Einfluss von Ataxin-2 konnte demgegenüber in humanen Neuroblastomzellen beobachtet werden, wo dessen Überexpression zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber apoptotischen Einflüssen führte. Andererseits wurde in Untersuchungen mit *D. melanogaster* durch dAtx2-Funktionsverlust eine verstärkte Apoptose ausgelöst, wobei die Ursachen für diese Gegensätzlichkeit jedoch ungeklärt blieben.^{56,96,97}

1.1.5.7. Ataxin-2 und die zelluläre Stressantwort

Im Zuge der Reaktion auf exogene oder endogene Stressoren bilden eukaryontische Zelle im Zytoplasma sogenannte Stress-Granula (SG), d. h. dynamische, mikroskopisch sichtbare mRNP (messenger-Ribonukleoprotein-Partikel)-Granula. Diese dienen hauptsächlich der Translationsrepression während des Stresses sowie als Verteilerzentren für mRNA-Transkripte. Da mRNP-Granula jedoch in Abs. 1.2. ausführlich beschrieben werden, sei hier nur erwähnt, dass Ataxin-2 sowie sein Hefe- und Maus-Ortholog als Komponenten von SG identifiziert werden konnten. Diesbezüglich hatte sich z. B. für humanes Ataxin-2 gezeigt, dass es mit den spezifischen SG-Markerproteinen TIA-1 (T-Zell-beschränktes intrazelluläres Antigen 1) und G3BP (Ras-GAP SH3-Domänen Bindeproteine) in stressabhängigen zytoplasmatischen Strukturen, d. h. SG assoziiert ist. Außerdem konnte in diesem Zusammenhang die Ataxin-2-Kolokalisation mit und -Bindung an PABP1 nachgewiesen werden, das neben seiner polysomalen Funktion (s. Abs. 1.1.5.1.) zudem ein essentieller SG-Assemblierungsfaktor ist (s. Abs. 1.2.4.).^{60,65,98,99,100}

Ebenso hat sich auch Ataxin-2 als wichtiger Assemblierungsfaktor von SG herausgestellt. Allerdings ist es dabei vermutlich nicht essentiell für diesen Prozess wie Versuche zur Beteiligung von PBP1 an der SG-Assemblierung in *S. cerevisiae* zeigten. Dort führte nämlich die PBP1-Deletion zwar zu einer dezimierten, jedoch nicht gänzlich inhibierten SG-Bildung infolge von Glucosemangel-Stress, was anhand der Hefe-SG-Markerproteine PAB1 und PUB1 demonstriert wurde. Außerdem hatte sich dabei gezeigt, dass PBP1-Überexpression zur Bildung großer PAB1-Akkumulationen beiträgt, die wenig Ähnlichkeit mit den kleineren SG-Strukturen aufweisen.^{99,101}

Darüber hinaus ergaben weitere Hefe-Experimente das PBP1 zusätzlich mit EDC3 in einer weiteren Art von mRNP-Granula den sogenannten P-Bodies (PB) kolokalisieren kann (s. Abs. 1.2.). Diesbezüglich konnte ferner in Säugerzellen eine Interaktion sowie Kolokalisation von Ataxin-2 mit DDX6 (DEAD-Box Helikase 6) festgestellt werden, welches seinerseits sowohl in SG als auch in PB vorkommen kann. Zusätzlich konnten in diesen Experimenten auch erstmals Einflüsse von Ataxin-2 auf die Assemblierung beider Granulatypen in Säugerzellen demonstriert werden. So zeigte sich, dass Ataxin-2-Kd einerseits die SG-Bildung unterdrückt, und andererseits die PB-Bildung durch dessen Überexpression gehemmt wird.^{65,99}

Insgesamt bleibt somit festzustellen, dass Ataxin-2 eine in Eukaryonten gut konservierte Funktion bei der mRNP-Granula-Assemblierung hat, die v. a. SG betrifft. Zusätzlich scheint es außerdem auch allgemein die

Proteinassemblierung zu fördern wie o. g. Hefe-Experimente zur PBP1-Überexpression zeigten. Für eine Beschreibung möglicher Auswirkungen SG-relevanter Ataxin-2-Funktion auf die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen sei an dieser Stelle zudem auf Abschnitt 1.2 und besonders Teilabschnitt 1.2.7. verwiesen.

1.1.6. Mögliche Pathomechanismen von SCA2

Schon zu Beginn der 1990er Jahre schloss man aus strukturellen Analysen, dass sich PolyQ-Domänen, ähnlich wie Leucin-Zipper-Domänen, zu β -Faltblatt-Strukturen zusammenlagern können, die durch Wasserstoffbrücken fest verbundenen sind. Daher wurde vermutet, dass pathologische PolyQ-Expansionen diesen Prozess begünstigen und so zu einem toxischen Effekt durch PolyQ-Protein-Präzipitation führen könnten. Diese Hypothese wird dabei grundsätzlich von der Entdeckung neuronaler intranukleären Einschlüsse (NIE) in erkranktem Gehirngewebe von HK-, SCA1- oder SCA3-Patienten unterstützt, die wahrscheinlich toxisch wirken, und die mit den jeweiligen expandierten PolyQ-Proteinen angereichert sind. Außerdem nimmt man v. a. aufgrund der dominanten Vererbung von PolyQ-Erkrankungen an, dass dieser Effekt eher auf toxischem Funktionsgewinn der Aggregate als auf Funktionsverlust der PolyQ-Proteine beruht.^{102,103,104,105}

Allerdings konnten in diversen Studien an *post-mortem* Gehirnen von SCA2-Patienten bisher nahezu niemals Ataxin-2-positive NIE entdeckt werden. So wies man NIE zwar in wenigen pontinen Zellen und in einigen anderen, kaum von SCA2-betroffenen Hirnteilen nach, jedoch konnten diesbezüglich bisher keine cerebellären NIE beobachtet werden. Allerdings erkannte man in diesen Untersuchungen auch, dass Ataxin-2 in Zellen von SCA2-Patienten zytoplasmatische, ubiquitinpositive Akkumulationen bildet, die pathogenes Potential haben könnten. Ähnliche Ergebnisse lieferten überdies immunhistochemische Analysen von Gehirnen transgener SCA2Q58-Modellmäuse, die auf 58 Q-Repeats expandiertes Ataxin-2 unter Kontrolle des purkinjezell-spezifischen Pcp2-Promotors exprimieren. Dabei zeigte sich nämlich, dass in den Mauszellen ebenfalls keine NIE gebildet werden. Insgesamt spricht also vieles gegen eine große Bedeutung von NIE in der SCA2-Pathogenese.^{50,106-111}

In diesem Zusammenhang sei zudem erwähnt, dass sich transgene Mausmodelle wie das SCA2Q58-Modell generell als recht vielversprechend für die Erforschung der SCA2-Pathologie erwiesen haben. Das liegt daran, dass sie erstens SCA2-ähnliche Phänotypen zeigen, und zweitens CAG-Repeatexpansionen in ihnen stabil an die Nachkommenschaft vererbt werden können. Deshalb wurden neben der Q58-Linie noch andere Mausmodelle entwickelt. So wurde zum einen ein SCA2Q75-Modell konstruiert, in dem expandiertes Ataxin-2 mit 75 Q-Repeats unter Kontrolle seines eigenen Promotors exprimiert wird, wodurch dessen gewebsspezifische Verteilung im Vergleich zum Q58-Modell eher der im humanen System ähnelt. Zum anderen wurde darüber hinaus ein transgenes SCA2Q127-Modell generiert, in dem das expandierte Ataxin-2 unter Kontrolle des Pcp2-Promotor (s. o.) exprimiert wird. Vergleicht man nun diese drei Mausmodelle miteinander, lässt sich daran gut eine proportional zur PolyQ-Länge zunehmende Verstärkung der Ataxiephänotypen und Reduzierung des Einsatzalters motorischer Störungen erkennen, was somit der Situation im Menschen entspricht. Die Mäuse schnitten diesbezüglich z. B. umso schlechter beim Rotarod-Motorik-Test ab, je länger ihre PolyQ-Expansion war. Gleichzeitig setzen Motorikdefizite mit zunehmender Expansion früher ein, und auch der Grad cerebellärer Zerstörung nahm mit der Länge der PolyQ-Expansion der exprimierten Ataxin-2-Varianten zu.^{110,112,113,114}

Weiterhin wurde zudem kürzlich eine SCA2Q42-*Knock-in*-Maus erzeugt, wozu eine entsprechend expandierte CAG-Repeatsequenz via homologer Rekombination an der Stelle des mAtx-2-Gens eingefügt wurde, die der

CAG-Repeatregion von *ATXN2* entspricht, an der jedoch im *mAtx-2* natürlicherweise nur ein CAG-Codon vorkommt. Phänotypisch zeigten die *Knock-in*-Tiere dabei vergleichbar mild ausgeprägte und erst spät einsetzende Motorikdefizite. Zudem konnten in ihnen bis zum hohen Alter von zwei Jahren keine spezifischen atrophischen Änderungen des Cerebellums oder der Purkinje-Zellen festgestellt werden. Man erkannte allerdings an diesen Mäusen, dass die PolyQ-Expansion dazu führt, dass v. a. im Cerebellum mutiertes Ataxin-2 sowie sein Bindungspartner PABP1 (s. Abs. 1.1.5.1.) an Löslichkeit verlieren. Hinzu kommt, dass spezifisch in Hirngewebe alter SCAQ48-*Knock-in*-Mäuse zytoplasmatische Granula auftraten, die immunreaktiv für sowohl mAtx-2 als auch PABP1 waren. Dies könnte somit insgesamt für eine toxische Funktion dieser Ataxin-2-Strukturen sprechen, die auf ihrer Fähigkeit beruhen könnte PABP1 und möglicherweise auch weitere Proteine zu sequestrieren.⁷¹

Insgesamt weisen diese Resultate somit darauf hin, dass im Fall von SCA2 weniger nukleäre als vielmehr zytoplasmatische Zelleinschlüsse für deren Pathogenese bedeutsam sein könnten. Diesbezüglich sei hier daran erinnert, dass Ataxin-2 sowie sein Hefe-Ortholog PBP1 u. a. auch in zytoplasmatischen SG vorkommen, die selber im Prinzip natürliche, mRNA-enhaltende Proteinakkumulationen darstellen. Es wäre also demnach denkbar, dass die SG-Assemblierung eine Rolle bei der Entstehung potentiell toxischer zytoplasmatischer Ataxin-2-Akkumulationen spielen könnte (s. Abs. 1.2.7), was zudem mit der o. g. Regulatorfunktion von Ataxin-2 bezüglich der SG- und PB-Bildung (s. Abs. 1.1.5.7) zusammenhängen könnte. Aufgrund dessen lässt sich insgesamt vermuten, dass die SCA2-Pathogenese zumindest teilweise auf abberanter SG-Bildung, vermittelt durch pathogene Störungen SG-relevanter Ataxin-2-Funktionen, beruhen könnte (s. Abs. 1.2.7), wofür ferner auch o. g. Ataxin-2-Bindung an die SG-Kernkomponente PABPC1 (s. Abs. 1.1.5.1) wichtig sein könnte.^{60,65,101}

Unabhängig davon zeigten weitere Untersuchungen der o. g. SCAQ58-Mäuse, dass dort zwar das expandierte Ataxin-2 nicht jedoch dessen Wildtyp (WT)-Variante mit dem Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor Typ1 (IP3R1) interagiert, einem meist im ER lokalisierten Rezeptorkanal, der die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern ins Zytoplasma vermittelt und so Ca^{2+} -abhängige Signalkaskaden steuert. Diesbezüglich wurde zudem beobachtet, dass diese Interaktion die Empfindlichkeit des Rezeptor gegenüber seinem Liganden IP3 erhöht und so zu einer mutationspezifisch verstärkten Ca^{2+} -Ausschüttung bei IP3R1-Reizung führt. Ferner konnte darüber hinaus im SCA2Q127-Mausmodell eine Ataxin-2-mutationsabhängige Reduktion der IP3R1-Transkriptmenge festgestellt werden, was in diesem Zusammenhang auf eine mögliche, IP3R1-Hypersensibilität kompensierende Zellaktivität hindeuten könnte. Unabhängig davon wies eine in den SCA2Q127-Mäusen ebenfalls beobachtete mutationsabhängig verringerte Purkinje-Zell-Feuerrate zusätzlich darauf hin, dass in diesen die Ca^{2+} -abhängige Signalübertragung beeinträchtigt sein könnte. Zusammengefasst könnte somit ein gestörter Ca^{2+} -Haushalt aufgrund krankhafter IP3R1-Hypersensitivität auch bei der SCA2-Pathogenese im Menschen eine wichtige Rolle spielen.^{113,115,116}

Weiterhin zeigte sich in SCA2Q58-Mäusen zudem ein gegenüber WT-Individuen erhöhter Anteil kleiner PolyQ-positiver Proteinformen in Immunoblots, deren Größe etwa 39 – 42 kDa betrug. Sie entspricht damit in etwa der Größe des N-terminalen Spaltprodukts einer hypothetischen Caspase-3-Proteolyse von Ataxin-2 an dessen eingangs erwähnter Caspase-3-Schnittstelle (s. Abb. 1.1.1). Diesbezüglich zeigten außerdem mehrere Untersuchungen sowohl mit SCA2-Patientenmaterial als auch mit kultivierten Säugerzellen, dass dort ähnliche Ataxin-2-Isoformen existieren, wobei auch deren Mengen mutationsbedingt erhöht waren. Dabei konnte mittels eines Antikörpers gegen ein C-terminales Ataxin-2-Epitop zusätzlich eine Isoform entdeckt werden, die ausgehend von ihrer Größe vermutlich dem C-terminalen Ataxin-2-Produkt o. g. Caspasereaktion entspricht.

Deshalb geht man davon aus, dass Ataxin-2 *in vivo* durch Caspase-3 prozessiert wird, und die beobachteten Isoformen Ataxin-2-Spaltprodukten entsprechen. Hinzu kommt, dass in Säugerzellen demonstriert werden konnte, dass pathogene PolyQ-Expansionen im Ataxin-2 die Aktivierung von Caspase-3 begünstigen. Alles in allem wäre es daher durchaus möglich, dass durch Caspase-3 prozessierte Ataxin-2-Spaltprodukte für die SCA2-Pathogenese bedeutsam sein könnten, was wie erwähnt in ähnlicher Weise auch für andere neurodegenerative Erkrankungen wie beispielsweise HK gilt (s. Abs. 1.1.1.).^{7,110,117,118,119,120}

Darüber hinaus stellte man bei Überexpressions-Analysen in Säugerzelllinien fest, dass dort eine pathogene Ataxin-2-Expansion (108 Q-Repeats) zur Dispersion des Golgi-Apparates (GA) führt, die dabei zudem mit mutationsbedingt verstärktem Zelltod in Verbindung gebracht werden konnte. Deshalb wird angenommen, dass auch bei der SCA2-Pathogenese eine durch pathogene Ataxin-2-Expansion verursachte, gestörte GA-Integrität bzw. -Funktion eine Rolle spielen könnte. Für eine wichtige Funktion von Ataxin-2 am GA spricht dabei, dass eine nicht mit dem GA assoziiierende LSmAD-Deletionsmutante von nicht pathogenem Ataxin-2 ebenfalls zytotoxisch in den Säugerzellen wirkte. Andererseits hatte dieselbe Deletion in expandierten Ataxin-2-Varianten mit 58 oder 104 Q-Repeats bezogen auf die deletionslosen Formen keine Verstärkung ihrer zytotoxischen Effekte zur Folge. Trotz dieser Ergebnisse ist insgesamt allerdings relativ unklar in wie weit eine Ataxin-2-Interaktion mit dem GA zytotoxische Prozesse bzw. die SCA2-Pathogenese beeinflussen könnte.^{69,119,121}

Sehr aktuelle PAR-CLIP (*photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking IP*)-Untersuchungen in HEK293T-Zellen zeigten außerdem, dass Ataxin-2 besonders affin an uracilreiche Sequenzen in 3'-UTRs (untranslatierte Regionen) bestimmter mRNAs bindet. Dabei wurde ferner entdeckt, dass sowohl die PolyQ-Domäne als auch das PAM2-Motiv des Ataxins für diese Bindung wichtig sind, und dass sie offenbar eine Stabilisierung der mRNA-Transkripte bewirkt. Da für diese Ataxin-2 vermittelte mRNA-Stabilisierung darüber hinaus gezeigt werden konnte, dass sie durch PolyQ-Expansion abgeschwächt wird, könnte dieser Effekt letztendlich ebenfalls wichtig bei der SCA2-Pathogenese sein.¹²²

Bezüglich möglicher Gründe für die Gewebs- bzw. Zellspezifität der SCA2-Erkrankung gibt es bisher kaum Hinweise. Hierfür könnte allerdings die A2BP1-Bindung von Ataxin-2 und daraus resultierende Effekte auf das Spleißen von prä-mRNA-Transkripten wichtig sein, da alternative A2BP1-Spleißvarianten wie beschrieben gewebsspezifische Expressionsmuster zeigen (s. Abs. 1.1.5.2.).^{73,80,81}

Abschließend sei hier nur kurz auf zwei seltene, genetische Risikofaktoren für frühzeitiges Einsetzen von SCA2 hingewiesen, deren Rolle in der SCA2-Pathogenese jedoch noch ungeklärt ist. Diese sind erstens die Expansion einer CAG-Repeatregion im RAI1(*retinoic acid induced 1*)-Gen und zweitens ein Polymorphismus im mitochondrialen Komplex 1-Gen.^{123,124,125,126}

1.1.7. SCA2-Therapieansätze

Eine Heilungsmöglichkeit besteht für SCA2 derzeit nicht. Es existieren allerdings einige Ansätze für SCA2-Therapiemöglichkeiten, die teilweise auf den in Abs. 1.1.6. beschriebenen Ergebnissen basieren. So hat man z. B. bereits klinische Studien mit niedermolekularen Therapeutika durchgeführt, die helfen sollten, eine für SCA2-Patienten angenommene Störung des neuronalen Ca²⁺-Haushalts (s. Abs. 1.1.6.) zu korrigieren. Grundlage dafür waren v. a. Untersuchungen des im vorigen Abschnitt beschriebenen SCAQ58-Mausmodells, die zeigten, dass dort die Inhibition des Ryanodin-Rezeptors 1 (RyanR1), eines Ca²⁺-freisetzenden Zellmembran-Rezeptorkanals, mittels Dantrolen mildernd auf alle untersuchten mutationsbedingten Phänotypen wirkte. So wurde dadurch z. B. ein beobachteter verstärkter Zelltod von Purkinje-Zellen in den SCAQ58-Mäusen

unterdrückt. Ein Effekt der wahrscheinlich mit einer Apoptosehemmung durch Dantrolen zusammenhing, wie anschließende Analysen bezüglich glutamatinduzierter Apoptose in kultivierten Purkinje-Zellen bestätigten. Ferner konnte auch die defiziente Motorik der Tiere durch Dantrolen verbessert werden, und schließlich war zudem positiv aufgefallen, dass Langzeitverabreichung von Dantrolen nur selten Nebeneffekte zeigte. Insgesamt scheint Dantrolenverabreichung daher eine vielversprechende Maßnahme zur Behandlung von SCA2 zu sein. Allerdings konnte diesbezüglich in o. g. klinischen Studien kaum therapeutische Wirksamkeit von Dantrolen oder auch anderen niedermolekularen Therapeutika festgestellt werden, wofür v. a. Zulieferschwierigkeiten der Substanzen zum ZNS verantwortlich gemacht werden, die durch die Blut-Hirn-Schranke verursacht werden.^{3,115,116} Etwas erfolgreicher verliefen dagegen klinische Studien mit kubanischen SCA2-Patienten, die mit Zink behandelt wurden, da dadurch zumindest ein zuvor in diesen Patienten beobachteter pathologischer Zinkmangel in Serum und cerebrospinaler Flüssigkeit aufgehoben werden konnte.^{127,128}

Abgesehen davon erbrachten weitere Studien in SCA2-Tier- und Zellkulturmodellen (s. Abs. 1.1.6.) zudem Hinweise auf mögliche neue Therapieansätze deren Potential jedoch bisher nicht weiter erforscht wurde. So zeigten Untersuchungen im SCA2Q48-*Knock-in*-Mausmodell beispielsweise, dass FBXW8, eine Ubiquitin-E3-Ligase, der möglicherweise toxischen Akkumulationsbildung von expandierten Ataxin-2 entgegenwirkt (s. Abs. 1.1.6). Ferner ist diesbezüglich ebenfalls zu erwähnen ist, dass auch die Ubiquitin-E3-Ligase Parkin in Säugerzellen, die expandiertes Ataxin-2 (Q58 und Q104) überexprimierten, einer beobachteten Zytotoxizität von pathogenem Ataxin-2 entgegenwirkte. Dementsprechend könnte die Aktivierung dieser oder anderer Ubiquitin-Ligasen, wie z. B. der mit Ataxin-2 interagierenden Ligase Cbl (s. Abs. 1.1.5.4) ein möglicher Ansatz zur SCA2-Behandlung sein.^{71,117}

Neuere Ergebnisse aus Tests mit o. g. SCA2Q58-Mausmodell belegen außerdem ein verzögertes Eintreten der Symptome sowie verringerte motorische Defizite der Tiere durch Transplantation von mesenchymalen embryonalen Stammzellen. Dies stellt eine recht moderne Herangehensweise dar, sie hat allerdings im Hinblick auf die SCA2-Therapie den Nachteil das sie einen operativen Eingriff benötigt und zudem aus ethischer Sicht nicht unbedenklich ist.¹²⁹

Ferner weisen einige der bereits in Abs. 1.1.6. beschriebenen Studien zudem darauf hin, dass proteolytische mutmaßlich Caspase-3-abhängige Ataxin-2-Abbauprodukte zytotoxische Effekte vermitteln und somit die SCA2-Pathogenese beeinflussen könnten. Sollte sich dies bestätigen, könnte somit die Inhibition von Caspase-3 bzw. anderer Caspasen, die ebenfalls das DPND-Sequenzmotiv des Ataxin-2 erkennen, eine weitere potentielle SCA2-Therapiemöglichkeit darstellen.^{7,110,117,119,120}

Da außerdem mit Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase 5*) kürzlich eine Ataxin-2-Kinase entdeckt wurde, die über Phosphorylierung den Ataxin-2-Abbau anregt, könnte auch die Verstärkung der Cdk5-Aktivität therapeutisches Potential besitzen.^{3,130}

Darüber hinaus gibt es allerdings kaum Untersuchungen, die potentielle SCA2-Therapeutika direkt evaluieren. Eine theoretische Möglichkeit die SCA2-Pathogenese zu stoppen, könnten jedoch diverse Substanzen bieten, die anormale Konformationsänderungen von pathogenem Ataxin-2 bzw. dessen Oligomerisierung hemmen können. Zu diesen Therapeutikakandidaten gehören sowohl Inhibitoren der Bildung von β -Faltblattstrukturen (z. B. Trehalose, Kongo Rot) als auch ein kompetitiver Inhibitor der Aggregatbildung, der spezifisch an mutierte PolyQ-Domänen binden kann, und der deshalb PolyQ-bindendes Peptid 1 (PQB1) genannt wurde. Die Wirksamkeit dieser Stoffe, wurde allerdings vorerst nur in HK- und SCA3-Tiermodellen bestätigt, so dass man ähnliche Effekte auf die SCA2-Pathogenese nur vermuten kann.^{3,131,132,133,134}

Zusätzlich sind in Modellen für SCA1, SCA3 und HK Verstärker der zellulären Chaperonaktivität (z. B. Geldanamycin) als toxizitäts- und aggregationsreduzierend erkannt worden. Da es sich bei diesen Pathologien wie bei SCA2 um PolyQ-Erkrankungen handelt, könnte also auch SCA2 möglicherweise durch Chaperonaktivatoren therapierbar sein.^{3,134,135,136}

Ferner konnten in verschiedenen Neurodegenerations-Modellen (v. a. Maus und Kulturzellen) weitere niedermolekulare Substanzen mit therapeutischen Eigenschaften entdeckt werden, die potentiell auch zur SCA2-Therapie nützlich sein könnten. Darunter sind z. B. Verstärker der mitochondrialen Aktivität bzw. der zellulären Energieproduktion, wie Coenzym Q10 und Kreatin, oder auch Verstärker der Autophagie (z. B. Rapamycin), die für den Abbau größerer zellulärer Strukturen besonders wichtig ist (s. Abs.1.2.7). Insgesamt bleibt allerdings bei all diesen Ansätzen das o. g. potentielle Problem geringer Therapeutikaeffizienz durch unzureichende Zulieferung an das zentrale Nervensystem bestehen.^{3,116,134,137,138,139}

Eine etwas modernere Art Therapeutika, die nicht auf die Hemmung toxischer Funktionen pathogener PolyQ-Proteine sondern auf deren genetische Repression abzielen, sind ferner sogenannte kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle auch interferierende RNA genannt. Diese funktionieren prinzipiell, indem sie durch komplementäre Basenpaarung doppelsträngige RNA-Moleküle bilden, die von der Zelle erkannt und abgebaut werden, was die spezifische Genexpression äußerst stark reduziert. Solche interferierenden RNA-Moleküle sind z. B. kleine *hairpin*-RNAs (shRNAs), die u. a. bereits in SCA1-, SCA7- und HK-Mausmodellen erfolgreich zur Behandlung der Mäuse eingesetzt wurden. Des Weiteren wird zurzeit die therapeutische Wirksamkeit von antisense-Oligonukleotiden und selbstsspaltenden Ribozymen hinsichtlich Neurodegenerationen untersucht. Dabei wäre ein großer Vorteil dieser Herangehensweisen, dass durch Nutzung von Viren als Shuttle die Zulieferung der Therapeutika ins ZNS und damit deren Wirksamkeit, verglichen mit herkömmlichen Agenzien, verbessert werden könnte. Außerdem wäre diesbezüglich, durch geschicktes Design dieser Moleküle, in Patienten auch eine allelspezifische Genrepression möglich, was potentiell schädlichen Nebeneffekten durch Funktionsverlust von WT-Allelen vorbeugen könnte. Darüber hinaus könnten auf diese Weise anders als bei herkömmlichen Therapeutika zudem pathogene Einflüsse bekämpft werden, die sich bereits auf mRNA-Ebene manifestieren, was im Fall pathogen expandierter PolyQ-Protein-Transkripte durchaus vermutet werden kann. Aufgrund der Neuartigkeit dieser Therapeutika ist allerdings bisher nur wenig über deren eventuelle Nebenwirkungen bekannt, was derzeit noch einen Nachteil dieser Therapieansätze darstellt.^{3,116,134,140-146,}

Abgesehen davon werden SCA2-Patienten jedoch bislang ausschließlich symptomatisch behandelt. Dabei kommen z. B. dopaminerge oder anticholinerge Substanzen zum Einsatz zur Linderung von Bradykinesie (Bewegungsverlangsamung), Dystonie (Fehlhaltungen), Tremor und anderer auch für die Parkinson-Krankheit typischer Symptome. Außerdem werden Pharmaka wie Baclofen zur Behandlung von Spastizität oder Benzodiazepine gegen Intentionstremor eingesetzt. Ferner werden die Patienten zur Linderung von Muskelkrämpfen mit Chinin, Magnesium oder hohen Dosen von B-Vitaminen behandelt. Ein mildernder Einfluss auf die Tremorsymptome in SCA2-Patienten zeigte sich außerdem durch Tiefenhirnstimulation thalamischer und sub-thalamischer Regionen.^{2,3,134}

Alles in allem bleibt festzuhalten, dass das Wissen zu möglichen SCA2-Therapien verglichen mit dem für andere PolyQ-Erkrankungen derzeit noch sehr gering ist, was daran liegt, dass man erst in den letzten zwei Jahrzehnten angefangen hat zu verstehen wie Ataxin-2 funktioniert, und wie es seine pathogene Wirkung vermitteln könnte. Es sind daher diesbezüglich noch viele Fragen offen, für deren Beantwortung jedoch durch die Generierung o. g. Modelle allen voran der Mausmodelle nun zumindest die nötigen Werkzeuge zur Verfügung stehen.

1.1.8. SCA2 im Kontext anderer neurodegenerativer Erkrankungen

Wie im vorigen Abschnitt angedeutet, gibt es symptomatische Überschneidungen zwischen der Parkinson-Krankheit und SCA2. Deshalb wurden Studien durchgeführt die genetische Beziehungen zwischen beiden Erkrankungen aufdecken sollten. Dabei zeigte sich einerseits, dass *ATXN2*-CAG-Repeatexpansionen mittlerer Größe (25 – 37 Repeats), in seltenen Fällen ursächlich für autosomal-dominante Parkinson-Krankheit sind, und andererseits stellte man fest, dass einige Fälle von SCA2 mit Parkinsonismus (SCA2-P) ebenfalls mit einer intermediär verlängerten CAG-Region (32 – 39 Repeats) assoziiert sind. Zudem fand man dabei heraus, dass die mutierten SCA2-Allele meist durch CAA-Codons unterbrochene Expansionen trugen, was vermutlich zur stabilen Vererbung der Mutation und dem Ausbleiben weiterer Expansionen in der repetitiven Region beiträgt (s. a. Abs. 1.1.2).^{45,147–151}

Zusätzlich konnte in Untersuchungen mit Säugerzelllinien ebenfalls eine Verbindung zwischen der Parkinson-Krankheit und Ataxin-2 bzw. SCA2 hergestellt werden. Diese zeigten nämlich, dass Ataxin-2 mit Parkin interagiert und kolokalisiert, dessen mutierte Varianten das Parkinson-Syndrom verursachen können. Außerdem ist Parkin eine Ubiquitin-Ligase (s. Abs. 1.1.6) und damit am proteasomalen Proteinabbau beteiligt, und in der Tat konnte diesbezüglich bereits eine parkinabhängige Ataxin-2-Ubiquitylierung nachgewiesen werden. Diese war zudem effektiver bei einer auf 104 Q-Repeats expandierten Ataxin-2-Variante als im WT-Protein. Dementsprechend wurde ferner auch eine parkinabhängige Reduktion zellulärer Ataxin-2-Level festgestellt, die allerdings im Fall der Q104-Mutante langsamer verlief als für nicht pathogenes Ataxin-2. Dennoch wurde diesbezüglich festgestellt, dass Parkin einen mildernden Einfluss auf einen beobachteten, durch die Q104-Mutation verursachten, verstärkten Zelltod hatte. Die Zusammenhänge dieser Effekte sind allerdings ungeklärt, so dass ihre pathologische Bedeutung ungewiss ist. Möglicherweise könnte dabei jedoch ein kürzlich entdeckter Einfluss von Parkin auf die endozytotische Reinternalisierung des EGFR wichtig sein, die durch Parkinaktivität verzögert wird. Dies folgt daraus, dass wie schon beschrieben die EGFR-Internalisierung, auch von Ataxin-2 und der Cbl-E3-Ligase beeinflusst wird (s. Abs. 1.1.5.4.). Insgesamt ist es daher wahrscheinlich, dass sich die Pathogenese-Wege von Morbus Parkinson und SCA2 überschneiden.^{117,152}

Ferner konnte für *ATXN2* mit intermediär expandierten CAG-Repeatregionen festgestellt werden, dass es mit einem gesteigerten ALS-Erkrankungsrisiko und frühem ALS-Einsatzalter sowie einer nicht herkömmlichen ALS-Histopathologie assoziiert ist. Die Repeatexpansionen sind dabei zwischen 24 und 34 Triplets lang und wie die mit Parkinson assoziierten Expansionen (s. o.) von CAA-Codons durchbrochen. In diesem Zusammenhang zeigte sich zudem, dass PBP1 in *S. cerevisiae* und dAtx2 in *D. melanogaster* die zytotoxischen bzw. pathologischen Effekte von exogen exprimiertem TDP-43, dem Hauptkrankheitsprotein der ALS (Amyotrophe Lateralsklerose), dosisabhängig modifizieren. So führte diesbezüglich ein Funktionsverlust des jeweiligen Orthologs durch Deletion bzw. siRNA-Knockdown zur Abmilderung der pathologischen TDP-43-Effekte. Demgegenüber führte eine erhöhte PBP1/dAtx2-Expression zur Verstärkung dieser Effekte (s. Abs. 1.2.7.2.). Weitere Analysen in Säugerzellen zeigten darüber hinaus, dass Ataxin-2 und eine pathogene TDP-43-Form in zytoplasmatischen Akkumulationen kolokalisieren. Dies spricht insgesamt für einen evolutionär gut konservierten modifikatorischen Einfluss des Ataxin-2-Gens auf TDP-43. Zudem beobachtete man in o. g. Säugerzelluntersuchungen allerdings auch eine Ataxin-2-Kolokalisation mit Akkumulationen eines weiteren ALS-Krankheitsproteins, nämlich FUS/TLS (*Fused in Sarcoma/ Translocated in Liposarcoma*) bzw. einer ALS-assoziierten Mutante davon. Insgesamt lassen diese Ergebnisse somit vermuten, dass Ataxin-2 die TDP-43- sowie FUS-abhängige Pathogenese von ALS beeinflussen könnte, was ferner auch auf FTLD (Fronto-

Temporallappen-Degeneration) zutreffen könnte, die ebenfalls mit diesen beiden Proteinen assoziiert sein kann.^{153,100,154}

Eine genetische Verbindung wurde außerdem zwischen *SCA6* und SCA2 hergestellt, als gezeigt wurde, dass CAG-Repeatexpansionen im *SCA6*-Gen einen negativen Einfluss auf das Einsatzalters der SCA2-Symptome in SCA2-Patienten ausüben. Da *SCA6* ferner für die $\alpha 1A$ -Untereinheit eines spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals kodiert, könnte der Effekt auf SCA2 dabei zudem auf fehlregulierter Ca^{2+} -Signalübertragung beruhen, was, sofern zutreffend, gut zur o. g. Hypothese von SCA2-pathogenen Effekten aufgrund gestörter IP3R1- Ca^{2+} -Signalvermittlung (s. Abs. 1.1.6.) passen würde.¹⁵⁵

Weiterhin wurde auch eine Verbindung von Ataxin-2 und SCA3 in einem transgenen *D. melanogaster*-Modell entdeckt, in dem die dAtx2-Expression eine Ataxin-3 bedingte Zelldegeneration verstärkte, und darüber hinaus die Bildung Ataxin-3-positiver intranukleärer Einschlüsse beschleunigte. Dabei erkannte man zudem, dass dafür das PAM2-Motiv des Ataxin-2 notwendig (s. Abs. 1.1.4.) ist. Insgesamt sind diese Zusammenhänge jedoch noch weitgehend ungeklärt.¹⁵⁶ Ebenfalls noch wenig erforscht ist eine mögliche Verbindung zwischen SCA2 und SCA1, die aufgrund von Ergebnissen eines globalen Y2H-Screen angenommen werden kann, in dem eine Ataxin-2-Interaktion mit Ataxin-1 festgestellt werden konnte.⁷⁸

Es bleibt also festzuhalten, dass insbesondere für die Verbindungen von SCA2 zu Parkinson sowie ALS mehrere Hinweise existieren, wobei allerdings bislang nur sehr wenig über die diesen Verbindungen zugrunde liegenden, molekularbiologischen Zusammenhänge bekannt ist.

1.2. Ribonukleoprotein-Partikel-Granula & Neurodegeneration

1.2.1. Komponenten & Funktionen von P-Bodies

1.2.1.1. Die Rolle von P-Bodies beim konventionellen mRNA-Abbau

Prozessier-Körperchen, die man in Anlehnung an ihre englische Bezeichnung auch P-Bodies (PB) nennt, wurden erstmals 1997 in murinen und humanen Zelllinien als kleine zytoplasmatische Granula beschrieben, die daraufhin zudem in Hefe identifiziert werden konnten. Dabei zeigte man auch, dass PB mit Exoribonuklease 1 (XRN1) angereichert sind (s. Abb. 1.2), einem Enzym das den 5'-3'-Abbau eines Großteils zytoplasmatischer mRNA-Moleküle katalysiert. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Granula verschiedene mRNA-Spezies und -Abbauprodukte enthalten, und ihre Bildung außerdem mRNA-abhängig ist. Daher geht man davon aus, dass ihre Funktion die Prozessierung bzw. der Abbau von mRNA ist, wodurch sie auch ihren Namen erhalten haben.¹⁵⁷⁻¹⁶²

Für diese Funktion spricht zudem die Entdeckung weiterer, am 5'-3'-mRNA-Abbau beteiligter Proteine in PB, die insgesamt einen kompletten Satz der dafür notwendigen Komponenten bilden (s. Abb. 1.2). Diesbezüglich konnten dort z. B. beide Bestandteile des Enzymkomplexes aus DCP1 (*decapping enzyme 1*) und DCP2 nachgewiesen werden, der für die Entfernung der vor Abbau schützenden 5'-Kappenstruktur von mRNAs zuständig ist (5'-Dekappierung). Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch dafür wichtige Kofaktoren, d. h. DDX6, die LSm-Komplexproteine LSM1-LSM7 und Verstärker der 5'-Dekappierung wie EDC (*enhancer of mRNA-decapping*)-Proteine, in PB enthalten sind. Für eine generelle Funktion von PB beim RNA-Abbau spricht ferner, dass sie zusätzlich Proteinkomponenten besitzen können, die für die Deadenylierung des 3'-Poly(A)-Schwanzes der mRNAs wichtig sind, die als initialer Schritt des allgemeinen mRNA-Abbaus gilt. Dabei wurden

in den Granula v. a. Bestandteile des sogenannten CCR4 (*carbon catabolite repression 4*)-NOT (*negative regulator of transcription*)-Komplexes gefunden (s. Abb. 1.2B), der besonders affin an kurze Poly(A)-Sequenzen bindet, die zuvor von anderen Deadenylasen vorgekürzt worden sind. Bei diesen handelt es sich zum einen um den PAN2/PAN3-Deadenylasekomplex und zum anderen um die unkomplexierte PARN-Deadenylase, die allerdings nicht in PB vorkommen.^{157,158,160,162,163,164}

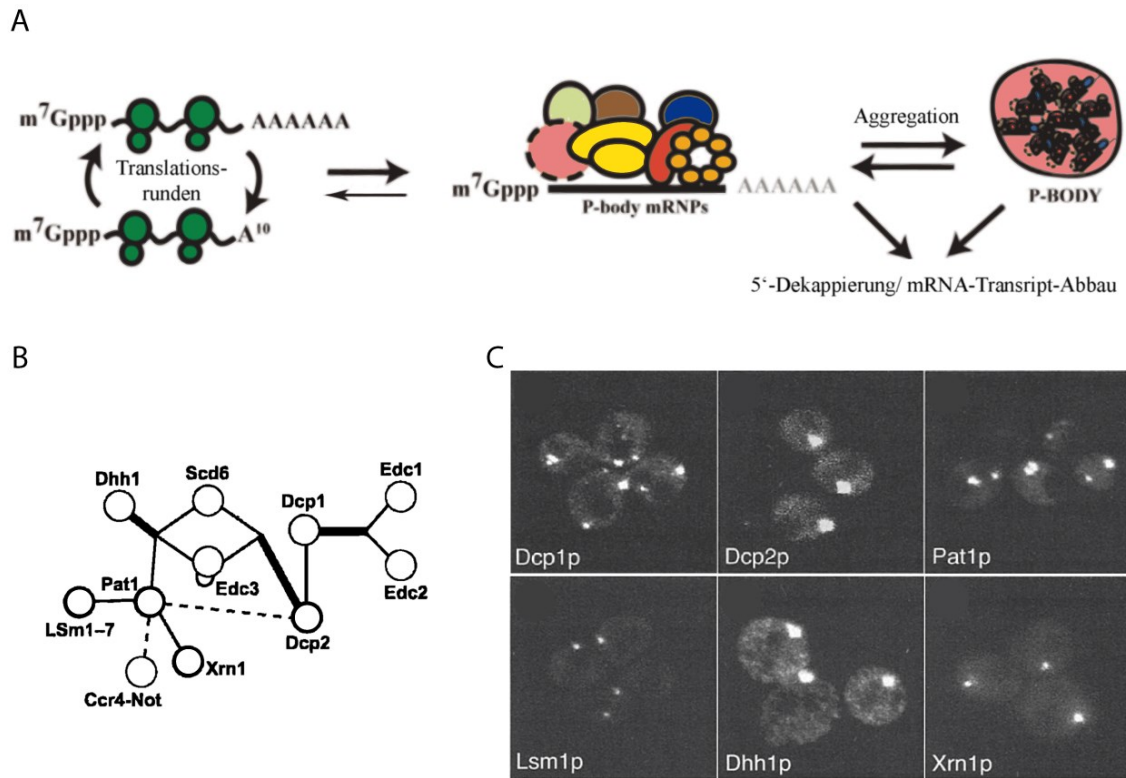


Abb. 1.2 P-Bodies (PB) in *S. cerevisiae*. (A) Schematische Darstellung der PB-Entstehung (bearbeitet nach Quelle 189). In Polysomen translatierende mRNA-Transkripte (links) gehen durch Anlagerung von PB-Kernkomponenten in PB-mRNP (Mitte) über. Die Reihenfolge der Assemblierung sowie die genauen Bindungsverhältnisse dieser PB-Proteine sind jedoch nicht komplett verstanden, so dass deren abgebildete Anordnung nur näherungsweise ihrer realen Anordnung entspricht. Schließlich lagern sich viele PB-mRNP zu mikroskopisch sichtbaren PB (rechts) zusammen. Der mRNA-Abbau kann dabei sowohl durch die mRNP als auch durch die PB vermittelt werden. (Ribosomen: dunkelgrün, LSm1-7: orange, PAT1: rot, DHH1: blau, DCP1 & DCP2: gelb, EDC3: braun, SCD6: hellgrün, XRN1: rosa) (B) Interaktionsnetzwerk hefespezifischer PB-Komponenten (bearbeitet nach Quelle 178) (durchgezogene Linien: bestätigte, direkte Interaktionen; gestrichelte Linien: direkte Interaktionen (noch) nicht nachgewiesen) (C) Mikroskopische Aufnahmen von Hefezellen die fluoreszenzmarkierte Fusionsproteine von PB-Komponenten exogen in *S. cerevisiae* exprimierten. Diese zeigen die ersten veröffentlichten Bilder zytoplasmatischer PB (aus Quelle 158).

Darüber hinaus sprechen jedoch noch weitere Befunde für die mRNA-Abbaufunktion von PB. So konnte in Studien mit *S. cerevisiae* eine Anreicherung von Zwischenprodukten des mRNA-Abbaus in PB sowie eine damit verbundene Granulavergrößerung durch verschiedene Arten von XRN1-Inhibition beobachtet werden. Dabei war zum einen die PB-Bildung in einer XRN1-Deletionsmutante untersucht worden und zum anderen die Anreicherung einer Reporter-mRNA, deren XRN1-Abbau durch artifiziell eingeführte *cis*-regulatorische Elemente gehemmt worden war. Außerdem konnte diesbezüglich eine ähnliche Anreicherung von Zwischenprodukten des mRNA-Abbaus in einer DCP1-Deletionsmutante festgestellt werden, in der entsprechend der Transkriptabbau durch Inhibition der 5'-Dekappierung gestört gewesen war.^{157,160,163}

Somit bleibt festzuhalten, dass es sich bei PB um XRN1-reiche, mRNP-Granula handelt, die in Eukaryoten von Hefe bis Mensch konserviert sind, und hauptsächlich dem mRNA-Abbau dienen. Es sei jedoch darauf

hingewiesen, dass die Granulabildung nicht essentiell für diesen Prozess ist. Dennoch wird dieser dadurch im Vergleich zu frei im Zytoplasma ablaufendem mRNA-Abbau sehr wahrscheinlich um ein Vielfaches effizienter.^{163,165}

1.2.1.2. P-Bodies und RNAi-vermittelter mRNA-Abbau

Neben ihrer Funktion beim konventionellen mRNA-Abbau, wurden PB in Metazoen auch mit RNAi-vermitteltem Abbau in Verbindung gebracht. Dies wird zum einen daraus gefolgert, dass sowohl miRNA als auch deren Ziel-mRNA-Moleküle in PB vorzufinden sind, und sich zum anderen sogenannte Argonaut (Ago)-Proteine ebenfalls dort anreichern. Letztere sind bei der RNAi-vermittelten Genrepression besonders wichtig, da sie komplementär gepaarte dsRNA-Hybride, die für den Abbau bestimmt sind, erkennen und binden, woraufhin sie den sogenannten RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISK) bilden. In diesem werden schließlich, durch eine intrinsische Nukleaseaktivität des Komplexes, die Transkripte abgebaut. Zusätzlich spricht für eine Funktion der PB beim RNAi-vermittelten mRNA-Abbau, dass mit dem Protein GW182 (GW-reich 182 kDa) eine weitere RISK-Komponente in PB entdeckt wurde. Dieses Protein gilt als verstärkender Kofaktor des RNAi-vermittelten Transkriptabbaus, was aus Untersuchungen in humanen Zelllinien und *D. melanogaster* folgt, die belegen, dass GW182-Funktionsverlust zu einer Hemmung dieses RNA-Abbauweges führt. Schließlich spricht für eine PB-Funktion beim RNA-Silencing auch, dass einige darin enthaltene Proteine der 5'-Dekappierung, d. h. DCP1, DCP2 und DDX6 ebenfalls am RNAi-vermittelten Transkriptabbau beteiligt sind und zudem mit Ago-Proteinen interagieren.^{157,163,166-170}

Insgesamt kann man also aufgrund o. g. Komponenten von PB davon ausgehen, dass diese am RNAi-Silencing beteiligt sein könnten. Dabei gilt jedoch wie für den konventionellen Abbau von mRNAs, dass auch die RNAi-vermittelte Translationsrepression nicht zwangsläufig von der PB-Bildung abhängig sein muss (s. Abs. 1.2.1.1.).^{157,163,167}

1.2.1.3. P-Bodies als Orte der Translationsrepression und Speicherung von mRNA-Transkripten

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, befinden sich alle Komponenten für den RNAi-vermittelten mRNA-Abbau in PB. Das RNAi-Silencing muss jedoch nicht zwangsläufig zum mRNA-Abbau führen, sondern kann auch lediglich in Form einer temporären Translationsrepression wirken, wodurch eine regulierte, bedarfsgerechte Translationskontrolle gewährleistet wird. Diese Hypothese der RNAi-vermittelten Translationsrepression wird v. a. durch die Erkenntnis gestützt, dass miRNAs oft die Proteinexpression ihrer Ziele hemmen ohne jedoch deren mRNA-Level entsprechend zu reduzieren. Das bedeutet, dass demnach auch in PB vorübergehend miRNA-reprimierte Transkripte existieren könnten.^{157,171}

Zudem konnte man in humanen Zellen auch PB-Komponenten identifizieren, die RNAi-unabhängige Translationsrepression vermitteln wie z. B. CPEB (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein*). Ebenfalls dazu gehört außerdem DDX6, das somit sowohl für die miRNA-abhängige als auch -unabhängige Translationsrepression wichtig ist (s. Abs. 1.2.1.2.). Daher wird angenommen, dass PB ganz allgemein für die temporäre Translationsrepression von mRNA-Transkripten bedeutsam sein könnten.^{157,167,172}

Eine damit verknüpfte weitere PB-Funktion könnte zudem die vorübergehende Speicherung stabilisierter, reprimierter mRNA-Transkripte unter bestimmten physiologischen Bedingungen sein. So könnten diese z. B. während zellulärem Stress vorübergehend in PB zurückgehalten werden, um nach Beendigung des Stresses wieder der Translationsmaschinerie zugeführt zu werden. Das schließt man hauptsächlich aus Untersuchungen in

S. cerevisiae. Diese zeigten nämlich zum einen, dass PB auch mRNA-stabilisierende Proteine wie PAB1 enthalten, die dem Transkriptabbau entgegenwirken, was vermutlich zumindest teilweise durch Hemmung der mRNA-Deadenylierung vermittelt wird. Zum anderen konnte im selben Modellsystem demonstriert werden, dass durch Glucosemangel-Stress eine PB-Vergrößerung ausgelöst wird, die mit einer Erhöhung des Gehalts an translationell reprimierter mRNA in den Granula einherging. Dies war ferner mit einer Verkleinerung der Hefe-Polysomen verbunden und an die Proteine DHH1 (DEAD-Box Helikase 6-Homolog 1) und PAT1 (Protein assoziiert mit Topoisomerase II 1) gekoppelt, die bereits als Translationsrepressoren bekannt sind. Man kann demnach davon ausgehen, dass unter Stresseinfluss die polysomale Translation angehalten wird, und reprimierte, zum Teil stabilisierte Transkripte von den Polysomen zu PB transportiert werden. Dort könnten sie dann infolge weiterer Signale entweder dem mRNA-Abbau oder wieder der Translation zugeführt werden. Die Bildung der PB wäre damit eine effektive Methode der Zelle sich an akute, potentiell zellschädigende Änderungen ihrer Umwelt anzupassen. Eine Funktion die sie dann mit einer anderen Art mRNP-Granula gemeinsam hätten, nämlich den bereits erwähnten SG (s. Abs. 1.1.5.7). Ob und in welchem Ausmaß die Translationsrepressionsfunktion und mRNA-Stabilisierung durch PB auch in Menschen wichtig ist, kann allerdings momentan noch nicht beantwortet werden.^{157,159,162,163,173,174}

1.2.1.4. P-Bodies und der NMD (nonsense-mediated mRNA-decay)

Einige Untersuchungen weisen auch auf eine Rolle von PB bei der mRNA-Qualitätskontrolle durch den sogenannten NMD hin. Dabei werden präterminale Stoppcodons, die aufgrund von Nonsense- oder Frameshift-Mutationen in der DNA entstehen, durch *downstream* des Stoppcodons befindliche Signale erkannt und daraufhin abgebaut. Dadurch wird die Entstehung potentiell schädlicher, trunkierter Proteinvarianten vermieden. In *S. cerevisiae* ist dafür ein Komplex aus den Proteinen UPF1, UPF2 und UPF3 (*up-frameshift* 1-3) zuständig, der sich infolge der UPF1-Phosphorylierung durch die SMG1 (*suppressor with morphological effect on genitalia-1* Homolog)-Kinase bildet und daraufhin mRNA-abbauende Proteine rekrutiert.^{164,175}

In weiteren *S. cerevisiae*-Analysen konnte diesbezüglich außerdem erkannt werden, dass die Hefe-PB alle Komponenten des UPF-Komplexes beinhalten. Ferner konnte für humane Zellen gezeigt werden, dass SMG7, ein in Hefe nicht konservierter, weiterer NMD-Faktor, der den Transkriptabbau in diesem System letztlich auslöst, dort ebenfalls in PB enthalten ist. Zusätzlich konnte dabei festgestellt werden, dass SMG7-Überexpression zu PB-Vergrößerung führt wodurch letztlich außerdem UPF1 und SMG5, ein weiterer mit SMG7 dimerisierender NMD-Faktor in den humanen PB identifiziert werden konnten. UPF2 und UPF3 konnten jedoch in humanen Granula nicht beobachtet werden. Schließlich konnte eine weitere Verbindung des NMD zu PB und der mRNA-Abbaumaschinerie durch die evolutionär konservierte Bindung von UPF1 an Proteine der 5'-Dekappierung hergestellt werden. Alles in allem ist die Rolle von PB beim NMD jedoch noch relativ unerforscht, so dass noch keine genaueren Aussagen darüber möglich sind.^{157,164,166,175}

1.2.2. Assemblierung von P-Bodies

Es ist noch nicht vollständig geklärt, welche die Kernkomponenten humaner PB sind, d. h. jene Proteine die essentiell für die Granula-Assemblierung sind und somit den PB-Kern bilden. Jedoch könnten GW182 (s. Abs. 1.2.1.2) oder Hedls (*human enhancer of decapping large subunit*, auch Ge-1) gute Kandidaten dafür sein, da sie die PB-Bildung dosisabhängig regulieren, und zudem sehr spezifisch für diese Granula sind. Da sie

allerdings keine Orthologe in *S. cerevisiae* besitzen, müssen zumindest in diesem Modellsystem, möglicherweise aber auch in humanen Zellen, noch weitere Kernkomponenten existieren.^{157,176,177}

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass sich besonders zwei Hefeproteine mit humanen Orthologen als sehr wichtig für die Initialisierung der PB-Bildung erwiesen haben. Dies war zum einen das EDC3-Protein, für das man in Studien an *S. cerevisiae* zeigen konnte, dass seine Deletion die PB-Bildung fast vollständig unterdrückt. Zum anderen konnte im Zuge dessen außerdem demonstriert werden, dass eine von der EDC3-Deletion unbeeinflusste, Rest-Granulabildung durch Deletion einer prionartigen, d. h. Q/N-reichen Domäne des LSM4-Proteins inhibiert werden konnte (s. Abs. 1.2.6). Somit können EDC3 und LSM4 als Kernkomponenten von Hefe-PB angesehen werden (s. Abb. 1.2), die auf zwei unterschiedlichen Wegen entstehen, wobei die EDC3-abhängige Granulabildung weitaus verbreiteter in den Hefezellen zu sein scheint. Zusätzlich konnte man diesbezüglich in Hefezellen auch DCP2 (s. Abs. 1.2.1.1) als besonders früh assemblierenden PB-Faktor identifizieren, der seinerseits die Rekrutierung von DCP1 vermittelt (s. Abb. 1.2). Demnach könnten also auch die EDC3-, LSM4- und DCP2-Orthologe in humanen Zellen essentiell für die PB-Bildung sein.^{178,179,180}

Diesbezüglich sei außerdem erwähnt, dass das zu Homodimerisierung neigende PAT1-Protein für die Assemblierung von Hefe-PB vermutlich ebenfalls sehr wichtig ist. Dies folgt aus der Beobachtung, dass auch dessen Deletion die Granulabildung bei Untersuchungen in *S. cerevisiae* hemmte. Das Ausmaß dieses Effekts war dabei allerdings besonders groß bei Glucosemangel-Stress, der normalerweise zur verstärkten PB-Bildung führt, was bei PAT1-Deletion jedoch ausblieb. Dennoch hat sich PAT1 in diesen Experimenten auch als notwendig für die Rekrutierung des LS_m-Komplexes zu den Granula erwiesen (s. Abb. 1.2.). Deshalb kann PAT1, wenn auch nicht als essentieller dann doch zumindest als einer der frühen Assemblierungsfaktoren von Hefe-PB betrachtet werden.^{179,180}

Schließlich konnte in denselben Untersuchungen auch das DHH1-Protein als wichtiger, wenn auch nicht essentieller, früher Assemblierungsfaktor von Hefe-PB identifiziert werden, das wie EDC3 als spezifische Komponente dieser Granula gilt (s. Abb. 1.2.). Dabei ist besonders zu erwähnen, dass DHH1 wie auch LSM4 (s. o.) prionartige Domänen enthalten, die generell eine wichtige Rolle bei der mRNP-Granulabildung spielen könnten. Der Grund für diese Annahme ist, dass diese Domänen Konformationen einnehmen können, die die Akkumulation der sie tragenden Proteine begünstigen, und die zudem ähnliche Konformationsänderungen in anderen prionartigen Proteinen induzieren. Diese Eigenschaft könnte dementsprechend die Basis für eine schnelle Zusammenlagerung vieler PB-Kernkomponenten bilden (s. Abs. 1.2.6). Diesbezüglich besteht zudem die prinzipielle Möglichkeit, dass ähnliche Prozesse auch in Säugerzellen ablaufen, da DHH1 analog zu EDC3, LSM4 und DCP2 ein humanes Ortholog besitzt, nämlich die bereits erwähnte Helikase DDX6 (s. Abs. 1.2.1.1.).^{179,181,182,183,184}

Erste Hinweise darauf, dass DDX6 tatsächlich zur PB-Assemblierung beitragen kann, lieferte dabei die Analyse seines Kd in einer humanen Zelllinie, durch den die Granulabildung effizient unterdrückt wurde. Es spricht also einiges für eine wichtige Funktion von DDX6 bei der PB-Assemblierung in Säugerzellen. Wie diese genau abläuft, und welche Rolle DDX6 dabei zukommt ist allerdings bisher ungeklärt.¹⁶⁷

Die o. g. Untersuchungen haben jedoch insgesamt dazu geführt, dass nun zumindest eine Reihe relativ spezifischer Markerproteine für PB bekannt sind, die für deren Untersuchung genutzt werden können. Dazu gehören in humanen Zellen GW182, Hedls, DDX6 sowie DCP1 und DCP2. In Hefezellen haben sich hingegen PAT1, EDC3, DCP2 und DHH1 als spezifische PB-Marker etabliert.^{157,167,176–180,183}

Da es sich bei PB um mRNP-Granula handelt, ist außerdem anzunehmen, dass ihr Zusammenbau auch von mRNA abhängig ist, was sowohl in Hefezellen als auch in humanen Zelllinien bestätigt werden konnte. So ist z. B. in humanen embryonalen Nierenzellen gezeigt worden, dass die Bildung von PB dort durch den Polymerase II-Inhibitor Actinomycin D inhibiert wird, was für deren allgemeine Abhängigkeit von der mRNA-Synthese spricht. Diesbezüglich konnte außerdem in Hefezellen eine Hemmung der Granulabildung durch Behandlung mit RNase A beobachtet werden, was deren direkte mRNA-Abhängigkeit unterstreicht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die assemblierenden mRNAs nicht translatierend, d. h. frei von Ribosomen, sind. Dies ergab sich aus Versuchen mit Cycloheximid (CHX), einem Translationsinhibitor der translatierende Transkripte in Polysomen arretiert, und dessen Anwendung die PB-Bildung in *S. cerevisiae* effektiv unterbindet.^{157,159,161,163}

Es konnten also bisher einige Parallelen zwischen PB in humanen Zellen und Hefe aufgedeckt werden. Dazu zählt z. B. die Abhängigkeit ihrer Assemblierung von nicht translatierender mRNA sowie den Proteinen DCP2, EDC3 und DHH1 bzw. DDX6. Darüber hinaus besitzen sie stets alle für den konventionellen 5'-3'-mRNA-Abbau benötigten Proteine, was für eine in Eukaryonten evolutionär konservierte PB-Funktion bei diesem Prozess spricht. Andererseits konnten jedoch auch einige Unterschiede in der Granulazusammensetzung zwischen humanen und Hefezellen beobachtet werden. Dies bezieht sich z. B. auf die nicht in Hefe konservierten PB-Bestandteile GW182 und Hedls oder *vice versa* auf das Hefeprotein PAT1. Zudem spricht einiges dafür, dass humane PB zusätzliche Funktionen z. B. beim miRNA-vermittelten mRNA-Abbau erworben haben.^{157,163}

Alles in allem sind jedoch noch viele Fragen zu PB ungeklärt und auch die eindeutige Bestimmung ihrer Bestandteile ist nicht unproblematisch, da PB sehr dynamische Strukturen sind, deren Komponenten einem stetigen Fluss unterliegen. Eine diesbezüglich sehr enge Verbindung haben PB zudem zu SG (s. Abs. 1.1.5.7), einer weiteren Art mRNP-Granula, die während der sogenannten integrierten Stressantwort gebildet werden. Diese Granula werden in den nächsten beiden Abschnitten beschrieben.

1.2.3. Komponenten & Funktionen von Stress-Granula

1.2.3.1. Stress-Granula speichern mRNA-Transkripte während der integrierten Stressantwort

Die Bildung sogenannter Stress-Granula (SG) wurde ursprünglich bereits 1983 als Reaktion von Tomatenzellen auf Hitzeschock entdeckt. Daraufhin konnte man in den folgenden Jahren demonstrieren, dass SG sich auch in weiteren Eukaryonten im Zuge der zellulären Antwort auf Hitze und andere Stressarten bilden. Somit war gezeigt worden, dass die SG-Bildung Teil einer allgemeinen Zellreaktion auf potentiell schädliche Umwelteinflüsse ist. Ein Prozess der heute auch als integrierte Stressantwort bezeichnet wird, und im Zuge dessen die Zelle ihre Genexpression dem Stress anpasst. Das bedeutet sie hemmt die Synthese nicht stressrelevanter Proteine, und verstärkt stattdessen die Expression stressspezifischer Reparatur- oder Qualitätssicherungs-Proteine.^{185,186,187,188}

Die Auslöser der Stressantwort reichen dabei von oxidativem Stress (z. B. ausgelöst durch Arsenit- oder Azidverbindungen, s. Abb. 1.3B) über UV-, Kälte- oder Hitze-Stress (s. Abb. 1.3A) bis zu osmotischem Stress (z. B. durch Sorbitol), Nährstoffmangel (z. B. durch Glucose-Entzug) oder viraler Infektion. Ebenso gehört die ER-vermittelte sogenannte UPR (*unfolded protein response*) dazu, die der Zellantwort auf einen erhöhten Anteil fehlgefalteter Proteine entspricht.^{185,189-193}

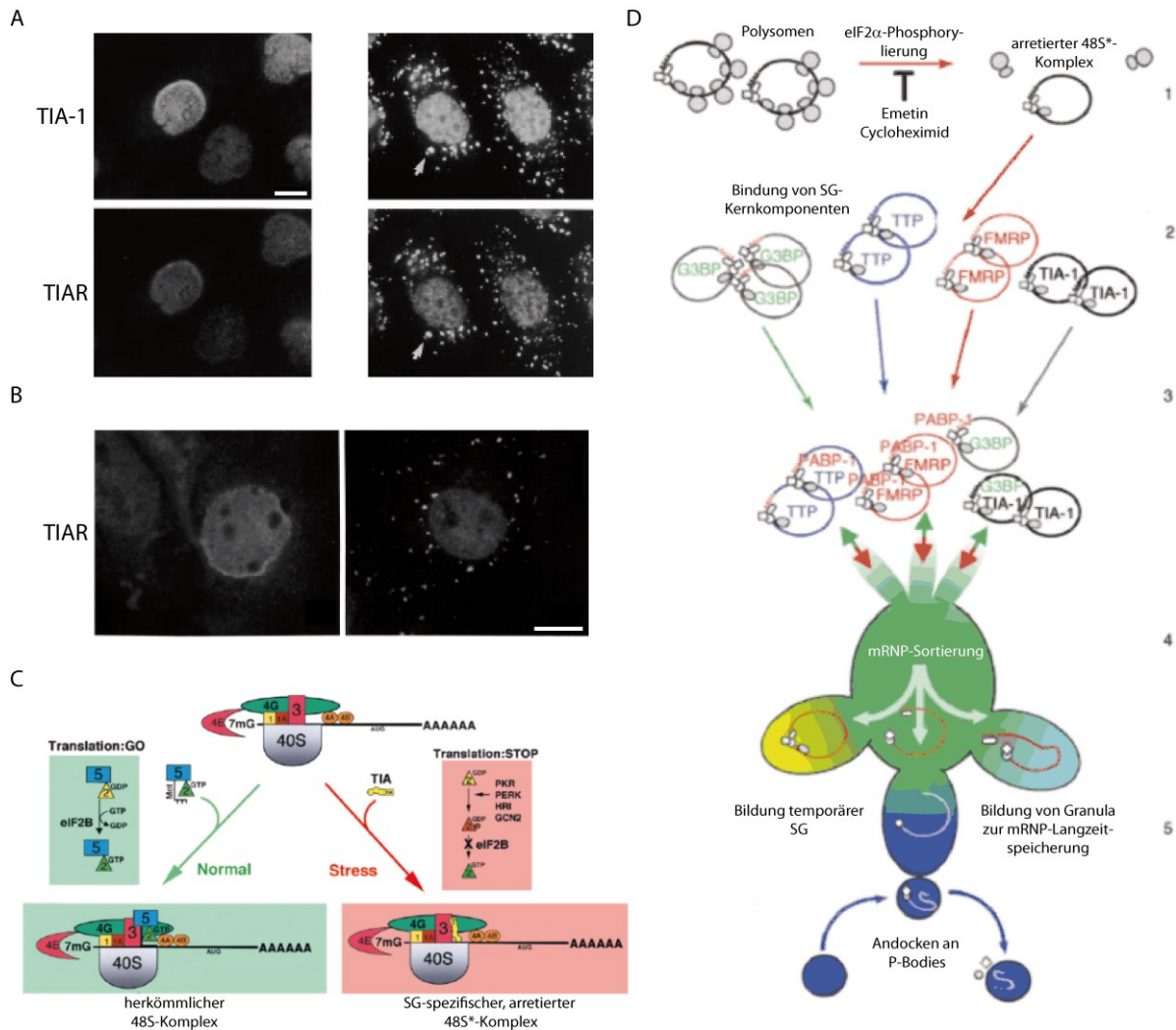


Abb. 1.3 Stress-Granula und deren Bildung in Säugerzellen. (A) Mikroskopiebilder unbehandelter (links) und hitzebehandelter (rechts) DU-145 Zellen. In den stressbehandelten Zellen ist die Bildung TIA-1- (oben) oder TIAR- (unten) positiver SG zu erkennen. (B) Aufnahmen unbehandelter (links) und mit Arsenit behandelter (rechts) COS-Zellen. In den mit Arsenit gestressten Zellen ist die Bildung TIAR-positiver SG zu erkennen. ((A) & (B) aus Quelle 186, Maßstabsbalken: 10µm) (C) Initiation der SG-Bildung und Entstehung arretierter, nicht herkömmlicher 48S*-Präinitiationskomplexe. Im Haupt-SG-Assemblierungsweg phosphorylieren die Kinasen PKR, PERK, HPI oder GCN2, den Translations-Initiationsfaktor eIF2α, wodurch die Translation angehalten und die Assemblierung von SG-Kernkomponenten wie TIA-1 am Transkript initiiert wird. (bearbeitet nach Quelle 194) (D) 1: Initiation der SG-Bildung (inhibierbar durch Emetin oder Cycloheximid) (s. (C)). 2: Assemblierung von SG-Kernkomponenten an Transkripten, wodurch diverse mRNPs gebildet werden. 3: Assemblierung der mRNPs zu mikroskopisch sichtbaren SG, sowie Rekrutierung weiterer Faktoren. 4: reversible Umstrukturierungs- und Sortierungsprozesse im SG. 5: Neben der Bildung temporärer SG, deren mRNA-Transkripte wieder in die Translation übergehen können, besteht zudem die Möglichkeit, dass Granula zur mRNA-Langzeitspeicherung durch SG-Umstrukturierungen entstehen. Zudem können SG an P-Bodies andocken bzw. mit ihnen fusionieren und dabei mRNPs an diese übertragen, wodurch der mRNA-Abbau der betroffenen Transkripte eingeleitet wird. (bearbeitet nach Quelle 183)

Eingeleitet wird die integrierte Stressantwort dabei von einem weitreichenden Translationsstopp, der durch stressspezifische, zelluläre Signalwege vermittelt wird (s. Abs. 1.2.4.). Im Zuge dieses Prozesses wird die Bildung von Translations-Initiationskomplexen gehemmt, und noch aktiv translatierende Ribosomen wandern sukzessive von ihren mRNA-Transkripten und damit auch von den Polysomen ab. Währenddessen bilden sich zudem erste SG-mRNP an den Transkripten, die sich weiter zu mikroskopisch sichtbaren SGs zusammenlagern (s. Abb. 1.3) Diese SG-mRNP bestehen dabei jeweils aus der ribosomalen 40S-Untereinheit, den eukaryontischen Initiationsfaktoren eIF3, eIF4B und eIF4F (mit den Untereinheiten eIF4A, G und E) und PABP1 sowie natürlich den mRNA-Transkripten. Dementsprechend können die Kerne der SG-mRNP als eine Art pausierende, strukturell leicht abgewandelte ribosomale Präinitiationskomplexe angesehen werden, weshalb

man in diesem Zusammenhang auch von arretierten (nach engl. *stalled*) 48S-Präinitiationskomplexen spricht (s. Abb. 1.3C). Diese Komplexe werden zudem von SG-spezifischen Proteinen stabilisiert, die zugleich Keime für die SG-Assemblierung bilden, und demnach als SG-Kernkomponenten angesehen werden (s. Abs. 1.2.4).^{165,184,188,193,194,195,196}

Alles in allem bieten SG der Zelle demnach eine effiziente Möglichkeit als Reaktion auf einen Stressreiz eine große mRNA-Transkriptmenge zu reprimieren und zu stabilisieren und somit in einem Zustand pausierter Translation zu halten. Dies sichert ihr einerseits Material- und Energiereserven für die Expression und Aktivität stressspezifischer Proteine und hat zudem den Vorteil, dass die Transkripte nach Abklingen des Stress-Stimulus schnell wieder in die Translation eintreten können.^{163,184,194}

1.2.3.2. Transkript-Verteilerfunktion von Stress-Granula und ihre Beziehung zu P-Bodies

Wie bereits in Abs. 1.2.2. kurz erwähnt konnte man bereits einige Verbindungen zwischen SG und PB herstellen. Diesbezüglich wurde z. B. in Säugerzellen mittels FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) demonstriert, dass ein reger dynamischer Austausch von Protein- und mRNA-Komponenten zwischen diesen beiden mRNP-Granula stattfindet. Dadurch wird natürlich die Zuordnung spezifischer Bestandteile und Funktionen zu den beiden Granulatypen insbesondere unter Stressbedingungen erschwert, zugleich zeigen die Ergebnisse aber auch die enge Verbundenheit zwischen PB und SG. Einige der Proteinkomponenten, die dabei zwischen beiden Granula-Arten ausgetauscht werden können, sind z. B. CPEB, XRN1, DDX6 oder UPF1 bzw. auch deren Hefe-Orthologe sofern vorhanden. Ferner konnten mikroskopische Kollokalisationsanalysen diesbezüglich zeigen, dass beide Granula-Arten oft eng benachbart auftreten und außerdem dynamisch miteinander fusionieren und voneinander lösen können. Zudem konnte festgestellt werden, dass offenbar in Hefe unter Stress ein Reifungsprozess von PB zu SG stattfindet. Dies wird zudem von globalen mikroskopischen Analysen zur Zusammensetzung von Hefe-SG und -PB unterstützt, bei denen nur sehr wenig exklusive SG-Komponenten identifiziert werden konnten. Das bedeutet, dass dort viele SG-Proteine auch ein PB-Stadium durchlaufen können. Für humane SG konnte ein derartiger PB-abhängiger Reifungsprozess allerdings bisher nicht direkt beobachtet werden, was auf Unterschiede in den SG-Assemblierungsmechanismen in Mensch und Hefe hindeuten könnte.^{99,163,172,183,193,195,197,198}

Insgesamt hatte sich somit gezeigt, dass SG in der Lage sind Komponenten von PB- oder Polysomen aufzunehmen, und dass umgekehrt auch SG-Bestandteile an PB übertragen werden bzw. nach Stressbeendigung wieder in die ribosomale Translation eintreten können. Dies führte schließlich zu einem Modell, bei dem SG sozusagen als Logistikzentren fungieren, die vermittelt durch noch unbekannt Signale, darüber entscheiden ob bestimmte translationell arretierte mRNA-Transkripte gespeichert (v. a. in SG), abgebaut (v. a. in PB) oder wieder translatiert werden (s. Abb. 1.3D).^{99,163,193,195,197,198}

1.2.3.3. Stress-Granula und zelluläre Signalübertragung

Ein relativ neues Konzept hinsichtlich der SG-Funktion ist, dass sie auch als signalvermittelnde Instanzen der Zelle dienen können, wobei davon ausgegangen wird, dass dies via Retention von Signalproteinen in den Granula vermittelt wird. Diesbezüglich hatte sich nämlich gezeigt, dass SG zytoprotektive Funktionen durch Sequestrierung von apoptotischen Signalproteinen vermitteln können.¹⁸⁴

So konnte z. B. demonstriert werden, dass RACK1 (Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1) in SG sequestriert, und auf diese Weise aus dem zytoplasmatischen Pool aktiver Proteine entfernt wird. Da RACK1 ein effizienter

Verstärker der MTK1/MAP3K4 (mitogen aktivierte Protein Kinase-Kinase-Kinase 4)-Aktivität ist, die ihrerseits stressinduzierte Apoptose vermittelt, hatte dessen Sequestrierung in SG damit letztlich einen anti-apoptischen Effekt in stressbehandelten Zellen.¹⁹⁹ Ähnliche Wirkung hatte zudem eine unabhängig davon beobachtete Sequestrierung von TRAF2 (Tumor-Nekrosefaktor (TNF) α -Rezeptor assoziierter Faktor 2) in SG unter Hitzestress. Diese inhibierte die Aktivität des TNF α -Rezeptors, der wiederum für die Aktivierung des pro-apoptischen Transkriptionsfaktors NF- κ B zuständig ist, dessen Aktivität somit indirekt durch die TRAF2-Sequestrierung gehemmt wurde.²⁰⁰ Für eine detailliertere Beschreibung der zu diesem Thema gewonnenen Erkenntnisse sei allerdings an dieser Stelle auf den hier zitierten Übersichtsartikel von Kedersha *et. al.* aus dem Jahr 2013 verwiesen.¹⁸⁴

Abschließend sei hier noch eine etwas andere Art der Signalübertragung durch SG erwähnt, die durch dessen nicht essentielle Komponente HuR (humanes Antigen R) vermittelt wird. Diesbezüglich hatte sich nämlich gezeigt, dass unter Stressbedingungen die HuR-Bindung an bestimmte miRNAs deren Repressionsfähigkeit senkt, was zu erhöhter Expression der miRNA-Zieltranskripte führt. Ein Mechanismus der somit vermutlich durch die SG-Assemblierung gefördert wird.^{157,197,201,202}

Zusammenfassend bleibt somit festzuhalten, dass SG regulatorischen Einfluss auf Signalproteine haben, was durch deren Sequestrierung in den SG vermittelt wird und speziell Apoptosesignalwege betrifft. Andererseits beeinflussen SG bzw. deren Komponente HuR zudem die miRNA-vermittelte Translationsrepression bestimmter mRNA-Transkripte unter Stress. Diese SG-Eigenschaften könnten möglicherweise zudem für die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wichtig sein, was in Abs. 1.2.7. näher erläutert wird.

1.2.4. Entstehung und Abbau von Stress-Granula

1.2.4.1. Assemblierung von Stress-Granula

Wie in Abs. 1.2.3.1. erwähnt, wird die SG-Assemblierung von verschiedenen extra- oder intrazellulären Stimuli im Zuge der integrierten Stressantwort ausgelöst, die zunächst einen Translationsstopp initiieren.^{184,187}

Ein gut untersuchtes integratives Signal dieser Kaskade ist dabei die Phosphorylierung der α -Untereinheit des Initiationsfaktors eIF2 an Serin 51. Diese wird hauptsächlich von vier derzeit bekannten Kinasen vermittelt, die damit direkte Verbindungen zwischen den verschiedenen Stressreizen und der Stressantwort bilden (s. Abb. 1.3C). So dient die HRI (Häm-regulierter Initiationsfaktor 2 α)-Kinase als Sensor für Redoxstress. PKR (Protein Kinase RNA-aktiviert) hingegen reagiert sensibel auf virale Infektion, UV-Stress und Hitze, während die PKR-artige ER-Kinase (PERK) die UPR (s. Abs. 1.2.3.1.) sowie die zelluläre Reaktion auf Kältestress vermittelt. Schließlich wurde außerdem mit GCN2 (*general control nonderepressible 2*) auch eine durch Nährstoffmangel (z. B. Aminosäureentzug) aktivierte Kinase identifiziert.^{184,187,192,195,203–207}

Die Translationsrepression durch eIF2 α -Phosphorylierung ist dabei besonders weitreichend, da der Initiationsfaktor speziell für den ersten Translations-Initiationsschritt sehr bedeutsam ist. Das liegt daran, dass er als Teil eines ternären Komplexes aus eIF2, GTP und einer Initiator-methionin-tRNA (Met-tRNA) dafür sorgt, dass letztere mit der ribosomalen 40S-Untereinheit verbunden wird. Dies leitet wiederum die Bildung des 48S-Präinitiationskomplex am 5'-Ende des zu translatierenden Transkripts ein, der sich daraufhin mit der ribosomalen 60S-Untereinheit verbindet, wodurch schließlich die Proteinbiosynthese gestartet wird (s. Abb. 1.3C).^{185,196} In stressbehandelten Zellen führt jedoch die Phosphorylierung von eIF2 α zur Dissoziation des Initiationsfaktors von o. g. ternärem Komplex, wodurch die Zulieferung der Met-tRNA zum Ribosom

unterbunden wird. Dadurch wird jedoch die Bildung des 48S-Präinitiationskomplexes nicht komplett inhibiert, so dass unter Rekrutierung von SG-Kernkomponenten ein nicht konventioneller Komplex entstehen kann. Dieser wird in diesem Fall auch als arretierter 48S-Präinitiationskomplex bezeichnet, da er bis auf die o. g. stressspezifischen Unterschiede in seiner Zusammensetzung noch sehr dem herkömmlichen 48S-Komplex gleicht (s. Abb. 1.3C).^{185,196,206}

Die SG-Kernkomponenten sind dabei allerdings vielfältig und führen zu unterschiedlichen Arten von SG. Sie haben jedoch stets drei gemeinsame Eigenschaften. So induziert jede von ihnen bei Überexpression SG-Bildung. Zweitens sind sie stets Teil der SG, deren Assemblierung sie initiiert haben, und drittens ist ihre stressunabhängige Akkumulierung immer von nicht polysomalen 48S-Komplexen abhängig. Zu den SG-Kernkomponenten, die diese Kriterien erfüllen, zählen z. B. TIA-1, TIAR (*TIA-1-related protein*), G3BP, Tristetraprolin (TTP), Brefeldin 1 (BRE1) und CPEB (s. Abb. 1.3D), sowie deren entsprechende Homologe, sofern vorhanden (s. Abs. 1.1.5.7 & 1.2.1.3). Darüber hinaus wurden zudem einige humane Krankheitsproteine als SG-Kernkomponenten identifiziert. Diese sind u. a. SMN1 (*Survival of Motor Neuron 1*), FMRP (*Fragile X mental retardation protein*), FXR1 (*Fragile X mental retardation syndrome related protein 1*), TDP-43 sowie Ataxin-2 (s. Abs. 1.2.7.). Aufgrund der Vielseitigkeit und Dynamik von SG sowie mRNP-Granula im Allgemeinen ist jedoch für viele dieser Proteine ihr Status als SG-Kernkomponente nicht endgültig geklärt. Allerdings sind TIA-1, TIAR und PABP1 und die SG-Assemblierung initiiierenden eIF-Proteine per Definition SG-Kernproteine (s. o.) und werden deshalb auch häufig als SG-Marker genutzt. In diesem Zusammenhang hat sich außerdem G3BP aufgrund seiner konsistenten und spezifischen SG-Assoziation ebenfalls als SG-Markerprotein etabliert.^{60,172,184,185,188,190,193,197,208–212}

Die Kernkomponenten rekrutieren daraufhin im folgenden Assemblierungsschritt über homo- und gelegentlich auch heterotypische Bindungen zusätzliche SG-Proteine und bauen so den SG-mRNP weiter auf (s. Abb. 1.3D). Diesbezüglich nimmt man an, dass diese Protein-Protein-Interaktionen hauptsächlich über intrinsisch ungeordnete Proteinregionen wie z. B. die prionartigen Q/N-reiche Domänen in TIA-1 vermittelt werden (s. Abs. 1.2.6.). Fest steht jedoch, dass sich letztendlich die SG-mRNP zu mikroskopisch beobachtbaren SG zusammenlagern (s. Abb. 1.3).^{184,185,209,213}

An dieser Stelle sei ferner darauf hingewiesen, dass der SG-Aufbauprozess neben den o. g. Proteinen außerdem von nicht translatierender mRNA abhängig ist. Dies schließt man aus Experimenten, bei denen die Effekte von CHX (s. Abs. 1.2.2.) oder Emetin, die beide eine Transkript-Blockierung in Polysomen bewirken, auf die SG-Assemblierung untersucht wurden, und die zeigten, dass diese durch beide Translationsinhibitoren gehemmt wird. Andererseits konnte diesbezüglich beobachtet werden, dass Puromycin, ein Antibiotikum das Ribosom-mRNA-Bindungen löst, zur SG-Vergrößerung beiträgt. Zusammen sprechen diese Ergebnisse somit für einen von freien mRNA-Transkripten abhängigen SG-Assemblierungsmechanismus, eine Eigenschaft die SG demzufolge mit den bereits erwähnten PB gemeinsam haben (s. Abs. 1.2.2.).^{99,163,198,208}

Abschließend sei angemerkt, dass zumindest in *S. cerevisiae* ein von der eIF2 α -Phosphorylierung unabhängiger Nebenweg zur SG-Assemblierung entdeckt wurde, den die Hefezellen bei Hitzestress einschlagen können. Dabei wurde zudem festgestellt, dass die so gebildeten SG den Initiationsfaktor eIF3 enthalten, was für eIF2 α -abhängig induzierte Granula bisher nicht nachgewiesen wurde.²¹⁴ Dabei steht dieses Ergebnis beispielhaft dafür, dass trotz großen Wissenszuwachses bezüglich der SG-Assemblierung in den letzten 10 – 15 Jahren, noch viele Fragen dazu offen sind, was jedoch noch stärker auf die Granula-Disassemblierung zutrifft, die Thema des nächsten Abschnitts ist.

1.2.4.2. Disassemblierung von Stress-Granula

Die während der zellulären Stressantwort gebildeten SG sind in der Lage sich nach Beendigung des Stresses während der sogenannten Erholungsphase innerhalb weniger Minuten wieder zurückzubilden. Diesbezüglich konnte zudem beobachtet werden, dass diese SG-Disassemblierung weniger einer Fragmentierung als vielmehr einer Auflösung der SG gleicht. Wie dieser Prozess genau abläuft ist jedoch zurzeit noch ungewiss. Fest steht jedoch, dass die SG-Disassemblierung mit der Wiederaufnahme der zellulären Translationsaktivität korreliert, d. h. je weiter der SG-Abbau voranschreitet, umso größer ist auch der zelluläre Rückgewinn an Translationsaktivität. Die diesbezüglichen kausalen Zusammenhänge sind allerdings ebenfalls unklar.^{163,185,193,208}

Da SG dynamische Strukturen sind, ist jedoch vorstellbar dass ihre Disassemblierung auf Inhibition der Zulieferung von SG-Komponenten basieren könnte, wobei die SG durch fortlaufendes Abwandern ihrer Bestandteile z. B. zu PB oder Polysomen kontinuierlich abgebaut würden. Ein solcher Mechanismus könnte dabei möglicherweise durch das Protein Staufen-1 vermittelt werden. Diesbezüglich konnte nämlich erkannt werden, dass Staufen-1 bei Überexpression hemmend auf die SG-Bildung wirkt, wohingegen sein Funktionsverlust zur verstärkten SG-Assemblierung beiträgt. Außerdem zeigte sich in diesem Zusammenhang das Staufen-1 seine Wirkung über Polysomen vermittelt, so dass man davon ausgehen kann, dass es mRNA-Transkripte in Polysomen zurückhält und so ähnlich CHX oder Emetin (s. Abs. 1.2.4.1.) die SG-Neubildung hemmt. Dem gegenüber stehen allerdings Berichte über mRNP-assemblierungsfördernde Effekte von Staufen-1, so dass dessen Funktion bei der SG-Disassemblierung noch nicht vollständig geklärt ist.^{163,215,216}

Weiterhin könnten auch Chaperone bedeutsam für den SG-Abbau sein, da sie häufig in SG beobachtet werden, und für diese darüber hinaus bereits Einflüsse auf die SG-Disassemblierung festgestellt werden konnten. Dies könnte besonders bei Hitze-Stress oder der UPR bedeutsam sein, bei denen Chaperone in einem Titrationsprozess die SG-Disassemblierung regulieren könnten. Diesen stellt man sich so vor, dass Chaperone unter Stressbedingungen durch ihre Funktion bei der Protein-Qualitätskontrolle nur wenig Einfluss auf die Dynamik von SG haben, so dass diese sich effizient bilden können. Ferner geht man diesbezüglich davon aus, dass in der anschließenden Erholungsphase fortlaufend mehr Chaperone zur Verfügung stehen, um die SG zu disassemblieren. Wie im Fall von Staufen-1, konnten jedoch für Chaperone auch assemblierungsverstärkende Effekte auf SG beobachtet werden, so dass über ihren Einfluss auf die SG-Dynamik keine eindeutige Aussage möglich ist.^{163,188,213,217}

Außerdem konnte kürzlich demonstriert werden, dass SG in Hefe- und Säugerzellen auch durch Autophagie entfernt werden können, welche im Allgemeinen dem Abbau großer zellulärer Strukturen wie Zellorganellen dient. Allerdings kann dieser SG-Abbauweg nicht als Disassemblierung im eigentlichen Sinn bezeichnet werden, da dieser Begriff einen schrittweisen Rückbau impliziert, der bei der Autophagie nicht stattfindet. Unabhängig davon stellt dieser Mechanismus jedoch eine sehr effiziente Möglichkeit zur Entfernung von SG aus dem Zytoplasma dar. Weitere Details sind diesbezüglich allerdings nicht bekannt, so dass die biologische Bedeutung dieses Abbauweges noch ungeklärt ist.^{163,218}

Schließlich könnten SG zusätzlich durch verstärkten Transkriptabbau disassemblieren, was entweder indirekt über PB (s. Abs. 1.2.3.2) oder direkt in den SG geschehen könnte. Der SG-spezifische mRNA-Abbau wird dabei als möglich angesehen, da XRN1 auch als SG-Bestandteil identifiziert wurde. Der indirekte Weg scheint jedoch diesbezüglich, v. a. aufgrund der PB-Spezialisierung auf den mRNA-Abbau, für eine schnelle SG-Disassemblierung eher geeignet zu sein.^{99,159,163,193,197,198}

1.2.5. Neuronale Transportgranula

Ein weiterer mRNP-Granulatyp sind die sogenannten neuronalen Transport-Granula (NTG), bei denen es sich dem Namen entsprechend um neuronenspezifische Granula handelt. Von diesen weiß man allerdings bisher nur wenig. Sie dienen jedoch offenbar insbesondere dem mikrotubuliabhängigen Transport vom neuronalen Soma zu Dendritenspitzen oder ins Axon bis hin zu den Synapsen. Dabei besteht offenbar eine wichtige Funktion von NTG zudem darin, die von ihnen transportierten mRNAs solange translationell inaktiviert zu halten, bis sie ihren Zielort erreicht haben. An diesem verharren die NTG mitsamt ihren reprimierten Transkripten, bis deren Translation durch spezifische Signale induziert wird, woraufhin sie schließlich abgebaut werden. NTG haben also eine Transport- sowie mRNA-Translationsrepressions- und –Speicherfunktion (s. Abb. 1.3D), die für orts- und zeitabhängige Translation neuronaler mRNAs wichtig sind. Dazu passend konnte man in NTG beide ribosomalen Untereinheiten nachweisen, was darauf hinweist, dass diese eine effiziente Vor-Ort-Translation der gespeicherten mRNA-Transkripte unterstützen könnten.²¹⁹

Einen prinzipiellen Beweis für die Existenz derartiger ortsabhängiger Translationsregulation lieferten dabei Untersuchungen in Neuroblastomazellen. Dort konnte nämlich gezeigt werden, dass ZBP1 (Zip-Code bindendes Protein 1) im Zellkern das β -Aktin-Transkript bindet und dieses während seines anschließenden zytoplasmatischen Transports zur Zellperipherie reprimiert. Dort wird ZBP1 schließlich zu gegebener Zeit durch eine Src-Kinase phosphoryliert, was zur Lösung der Protein-mRNA-Bindung führt, und so eine kontrollierte Vor-Ort-Synthese des β -Aktin-Proteins ermöglicht. Zusätzlich wurden kürzlich unabhängig davon in lebenden Mausneuronen ebenfalls lokalisationsabhängige Veränderungen an ähnlichen β -Aktin-reichen mRNP-Granula festgestellt, deren mRNP-Dichte sich dabei mit zunehmender Entfernung der Granula zum Zellsoma stetig reduzierte. Ein Effekt der darüber hinaus in anderen Test auch durch Erregung von Neuronen erreicht wurde.^{219,220,221}

Abgesehen davon hat man ferner festgestellt, dass NTG einige Komponenten mit PB und SG gemeinsam haben, wie z. B. Staufen-1 (s. Abs. 1.2.4.2), CPEB (s. Abs. 1.2.1.3. und 1.2.4.1.) oder G3BP (s. Abs. 1.2.4.1). Das weist darauf hin, dass alle drei Granulatypen zumindest einige ihrer Bestandteile untereinander austauschen können. Diesbezüglich konnte zudem in Ratten-Oligodendrozyten beobachtet werden, dass Staufen-1 während zellulären Stresses tatsächlich von NTG zu SG übergeht, wodurch zumindest in diesem Fall ein Komponentenaustausch zwischen beiden mRNP-Granula bestätigt werden konnte. Außerdem sprechen weitere Untersuchungen an Ratten-Hippocampus-Neuronen ebenfalls für einen solchen dynamischen Austausch von Komponenten zwischen o. g. mRNP-Granula, da dabei in den neuronalen Dendriten häufiges Andocken von NTG und PB beobachtet werden konnte.^{157,163,219,222,223}

Unterschiede zeigen NTG, PB und SG hingegen v. a. hinsichtlich der in ihnen enthaltenen ribosomalen Bestandteile. So enthalten NTG sowohl 60S- als auch 40S-Ribosomen-Untereinheiten (s. o.), während SG nur 40S-Untereinheiten als Bestandteil arretierter 48S-Präinitiationskomplexe besitzen (s. Abs. 1.2.4.1.), und in PB keine der beiden Ribosomen-Untereinheiten nachgewiesen werden konnte (s. Abs. 1.2.2.). Diese unterschiedlichen Zusammensetzungen entsprechen dabei gut den Hauptfunktionen, die man den Granula zuordnet, welche im Fall der NTG die kontrollierte Translation, für SG die temporäre Translationsrepression und im Fall der PB der mRNA-Abbau sind.²¹⁹ Abschließend sei noch erwähnt, dass sich NTG natürlich auch durch ihre Neuronenspezifität von den anderen Granulatypen unterscheiden, weshalb sie grade hinsichtlich neurodegenerativer Prozesse sehr bedeutsam sein könnten.²¹⁹

1.2.6. Prinzipielle Merkmale von mRNP-Granula

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben induziert zellulärer Stress die SG-Assemblierung (s. Abs. 1.2.3.). Außerdem verstärkt dieser zusätzlich die PB-Bildung (s. Abs. 1.2.1.3.). In diesem Zusammenhang konnte ferner demonstriert werden, dass auch der Zellzyklus Einfluss auf die PB-Entstehung hat. Es zeigte sich nämlich in verschiedenen Säugerzellmodellen, dass während der Mitosephase nur wenige PB assemblieren, wohingegen sie in der S- oder G2-Phase verstärkt gebildet werden.^{157,177}

Man kann daher davon ausgehen, dass SG und PB prinzipiell für die Zelle besonders in Situationen wichtig sind, in denen diese aufgrund unterschiedlicher Reize ihre Genexpression umstellt. Diesbezüglich ist die Granulabildung offenbar ein effizientes Mittel für die Zelle mit einer großen Menge nicht mehr benötigter mRNA-Transkripte umzugehen, die sich zum Zeitpunkt der Umstellung noch im Zytoplasma befinden. So können diese Transkripte dadurch zum einen bei akuten Reizen wie Stress sehr schnell vorübergehend in SG zwischengespeichert und je nach Bedarf in PB abgebaut werden. Zum anderen können sie im Zuge evolutionär etablierter Programme wie z. B. dem Zellzyklus, durch verstärkte PB-Bildung auch direkt, d. h. ohne Zwischenspeicherung effizient abgebaut werden. Dies wäre in diesem Fall zudem insofern sinnvoll, als dass die älteren Transkripte vermutlich größtenteils ohnehin nicht im entsprechenden folgenden Programmschritt benötigt werden.^{157,163,165,177}

In diesem Zusammenhang wird zudem vermutet, dass besonders die lokale Anreicherung bestimmter Proteine (v. a. Translationsrepressoren) und RNAs in den mRNP-Granula dazu führt, dass diese ihre Funktionen sehr energie- und zeiteffizient ausführen können. Wobei besonders die Translationsrepression als eine generelle Funktion von sowohl PB und SG als auch NTG (s. Abs. 1.2.5.) hervorzuheben ist. Man muss jedoch dazu sagen, dass die Bildung mikroskopisch sichtbarer Granula in diversen Studien für die durch PB und SG vermittelten Funktionen (s. Abs. 1.2.1. & 1.2.3.) nicht essentiell war. Deshalb geht man momentan davon aus, dass bereits die kleineren mRNP diese Funktionen ausüben können. Trotzdem scheint die Granulabildung nicht nur die Folge unspezifischer Anreicherungen aggregationsaffiner mRNP-Proteine zu sein. Dafür spricht einerseits, dass die granularelevanten zellulären Prozesse wie z. B. mRNA-Abbau und Translationsrepression durch Granula-Assemblierung eine überproportional große Effektivitätssteigerung erfahren. Andererseits weisen zusätzlich auch die signalabhängige Entstehung und die signalvermittelnden Eigenschaften der Granula auf eine funktionelle Bedeutung von mRNP-Granula-Assemblierungsvorgängen hin.^{157,163,165,184,185}

1.2.6.1. Grundlegende Umbauprozesse in mRNP und deren Granula

Bezüglich der mRNP-Assemblierung geht man derzeit von einem allgemeinen Modell aus, nach dem mRNA-Transkripte von ihrer Entstehung im Nukleus bis zu ihrem zytoplasmatischen Abbau Teil von mRNPs sind, die verschiedene Funktionen ausüben. Diese reichen von Transkription und Spleißing über nukleozytoplasmatischen Transport bis hin zu Prozessen wie lokalisationsabhängiger Translation (via NTG, s. Abs. 1.2.5.), mRNA-Stabilisierung und Translationsrepression (via PB und SG, s. Abs. 1.2.1 & 1.2.3) sowie mRNA-Abbau (via PB). Diesbezüglich wird zudem angenommen, dass die einzelnen mRNP durch Umbauprozesse kontinuierlich ineinander übergehen, die man auch als mRNP-Remodellierung (von engl. *mRNP-Remodelling*) bezeichnet.^{165,219} Deren Ablauf stellt man sich so vor, dass zunächst mRNP-spezifische RNA-bindende Proteine (RBP), vermittelt durch bestimmte *upstream*-Signale (z. B. eIF2 α -Phosphorylierung) bzw. mRNA-Markierungen (z. B. 5'-Kappe) an ihre Ziel-mRNA angelagert werden. Die RBP rekrutieren daraufhin weitere sogenannte

mRNP-Kernkomponenten (s. Abs. 1.2.2. & 1.2.4.), d. h. sowohl Proteine als auch kurze und lange nicht kodierende RNA-Moleküle, wodurch der mRNP-Kern gebildet wird. Dabei geht man davon aus, dass die Art der spezifischen mRNP-Kernkomponenten die Funktion und den Typ des dadurch entstehenden *downstream*-mRNP bestimmt. Im weiteren Verlauf der mRNP-Entstehung können außerdem zusätzliche modulierende Faktoren mehr oder weniger spezifisch an den mRNP-Kern binden und so dessen Funktion regulieren oder erweitern. In diesem Zusammenhang nimmt man zudem an, dass durch einzelne mRNP auch ganze Transkriptgruppen für spezifische zelluläre Funktionen effizient und koordiniert reguliert werden können. Für diese Gruppen wurde deshalb der Begriff mRNP-Regulon, in Anlehnung an das bakterielle Operon eingeführt.^{165,224}

Die o. g. mRNP-Kernkomponenten enthalten dabei häufig nicht nur mehrere RNA-bindende Motive sondern auch Dimerisierungsdomänen (z. B. die LSM-Domäne). Darüber hinaus besitzen sie meist größere unstrukturierte Bereiche die auch als intrinsisch ungeordnete Regionen (IDR von engl. *intrinsically disordered regions*) bekannt sind. In diesen wiederum konnten zudem kleinere strukturarme Proteindomänen identifiziert werden, die akkumulationsfördernde Eigenschaften vermitteln können. Dazu zählen prionogene Q/N-reiche sowie P, G, S- oder T-reiche Regionen und ebenso Kombinationen daraus, wobei diese oft einfach als prionartige Proteindomänen zusammengefasst werden (s. Abs. 1.2.7.). Diese Domänen sind in der Lage zwischen akkumulationsaffinen und löslichen Konformationen zu wechseln, was wahrscheinlich sehr wichtig für die stabile aber dennoch reversible Assemblierung der mRNP-Kernkomponenten ist (s. Abs. 1.2.2. & 1.2.4.1). Dafür sprechen zumindest *in vitro* Untersuchungen des prionogenen FUS-Proteins, die zeigten, dass dieses unter den gegebenen Bedingungen zu Strukturen mit Hydrogelcharakter assembliert.^{163,178,180,184,213,225,226}

Außerdem sei erwähnt, dass es auch Hinweise auf eine Regulation der mRNP-Remodellierung durch posttranslationale Proteinmodifikationen gibt. So konnte z. B. für einige PB- oder SG-Komponenten festgestellt werden, dass sich ihre Lokalisation in Abhängigkeit von ihrem Phosphorylierungsstatus ändert, und zusätzlich konnte unabhängig davon gezeigt werden, dass sich o. g. FUS-Hydrogele durch FUS-Phosphorylierung auflösen. Allerdings sind auch hierzu noch viele Fragen ungeklärt.^{163,165,184,226}

Im Anschluss an die mRNP-Bildung bzw. parallel dazu können sich ferner viele ähnliche oder gleiche mRNP zu höher geordneten, mikroskopisch sichtbaren Granula wie SG, PB oder NTG zusammenlagern (s. Abs. 1.2.2. & 1.2.4.). Ein Prozess an dem auch das Zytoskelett und damit assoziierte Motorproteine beteiligt sind. Jedoch sind die dazu erzielten Ergebnisse komplex, und weisen zudem auf eher spezifische, vom mRNP-Typ abhängige Effekte der Motorproteine beim Granula-Umbau hin. Abgesehen davon ist schließlich wie bereits erwähnt der dynamische Fluss nicht translatierender zytoplasmatischer mRNA für die mRNP-Granula-Assemblierung ebenfalls sehr wichtig.^{159,162,163,165,194,195,197,227}

Insgesamt lässt sich somit festhalten, dass v. a. PB und SG sehr wichtig für eine effiziente Zellantwort auf sich verändernde interne oder externe Lebensbedingungen (insbesondere Stress) sind. Zusätzlich beeinflussen sie dabei möglicherweise entscheidend, ob eine Zelle in die Apoptose eintritt oder nicht (s. Abs. 1.2.3.3.), was speziell hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen von großer Bedeutung sein könnte, auf deren Verbindungen zu mRNP-Granula im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.^{163,165,184,185,199,200}

1.2.7. Bedeutung von mRNP-Granula für neurodegenerative Erkrankungen

1.2.7.1. Gemeinsamkeiten von pathologischen neuronalen Zelleinschlüssen und Stress-Granula

Ein allgemein bekanntes sehr auffälliges Merkmal diverser neurodegenerativer Erkrankungen ist das Vorkommen proteinreicher Zelleinschlüsse in den betroffenen Geweben, die oft amyloiden Charakter haben. Das bedeutet u. a., dass sie ähnlich den Amyloid- β (A β)-Peptid-Plaques, die sich bei der Alzheimer-Krankheit bilden, aus ungeordneten, fibrillären Proteinakkumulationen bestehen, die man entsprechend als Amyloidfibrillen bezeichnet. Von diesen ist bekannt, dass sie reich an β -Faltblattstrukturen sind, was zu einer sehr dichten Zusammenlagerung der darin enthaltenen Proteine führt, und sie somit schwer löslich werden lässt. Außerdem besitzen sie eine sogenannte intrinsische Akkumulationsneigung, was letztlich ihre Zusammenlagerung zu mikroskopisch sichtbaren amyloiden Aggregaten bewirkt, die man auch als Aggresomen bezeichnet.^{228,229}

Diesbezüglich hat sich ferner gezeigt, dass u. a. auch das Prion-Protein dazu neigt in Form toxischer Amyloidfibrillen zu aggregieren, was auf dessen strukturell ungeordnete Q/N-reiche Regionen zurückgeführt wurde. Später wurden daraufhin ähnliche Proteinbereiche auch in anderen aggregierenden Krankheitsproteinen wie z. B. FUS, TDP-43 oder hnRNPA1 (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A1) gefunden, die daraufhin als prionartige Domänen definiert wurden (s. v. Abs.). Man geht daher davon aus, dass Proteine mit prionartigen Domänen in mehreren neurodegenerativen Erkrankungen zur Bildung toxischer Aggresomen beitragen. Gleichzeitig sind grade diese Proteine zudem für die Assemblierung physiologischer, d. h. nicht toxischer mRNP-Granula sehr wichtig wie z. B. DHH1 oder LSM4 im Fall der Hefe-PB-Bildung (s. Abs. 1.2.2.) und TIA-1, G3BP oder Ataxin-2 bei der Säuger-SG-Assemblierung (s. Abs. 1.2.4.1.).^{163,181,184,230,231,232}

Diese Erkenntnisse führten zu der Vermutung, dass die Amyloidbildung nicht ausschließlich auf stochastischen Prozessen beruhen könnte, wie lange angenommen wurde, sondern dass auch fehlregulierte mRNP-dynamische Prozesse dafür wichtig sein könnten. Diese Hypothese wird dabei von mehreren Beobachtungen gestützt. So konnten erstens bereits einige Proteine, deren mutierte Gene mit Neurodegeneration assoziiert sind, zugleich als SG-Komponenten identifiziert werden, wie z. B. die ALS- und FTLD-spezifischen Proteine TDP-43 und FUS, die ALS- sowie MSP (Multisystem-Proteinopathie)-relevanten Proteine hnRNPA1 und hnRNPA2 oder das SCA2-assoziierte Ataxin-2. Hinzu kommt, dass speziell bei diesen neurodegenerativen Erkrankungen die mutierten Krankheitsproteine häufig in zytoplasmatischen pathologischen Aggregaten lokalisiert sind, was somit insgesamt für eine Verbindung zwischen physiologischen mRNP-Granula, d. h. in diesem Fall SG, und neurodegenerativen Prozessen spricht.^{60,65,110,163,190,210,232–236}

Unterstützt wird diese Annahme zusätzlich durch die Beobachtung, dass TDP-43-positive pathogene Aggregate in Zellen aus FTLD-T (TDP-43) und ALS-Patienten mit den humanen SG-Markern eIF3, TIA-1 sowie PABP1 kolokalisieren. Ähnliches gilt ferner für pathogene neuronale Aggresomen des Proteins tau, die charakteristisch für die sogenannten Tauopathien sind, zu denen u. a. auch die Alzheimer-Krankheit und einige FTLD-Fälle (FTLDTau) gehören. Diese tau-Aggresomen kolokalisierten nämlich in erkrankten murinen und humanen Zellen ebenfalls mit TIA-1, was zudem auf eine direkte Bindung von TIA-1 an tau zurückgeführt werden konnte, und sie waren ferner in den Nagerzellen mit G3BP kolokalisiert. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass pathologische Proteinaggregationen eine SG-ähnliche Zusammensetzung haben können.^{163,193,211,233,237}

Hierzu wurde ferner in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellsystemen gezeigt, dass pathogene Mutanten neurodegenerativer Krankheitsproteine meist eine gegenüber den WT-Formen erhöhte Akkumulationsneigung

besitzen, und man stellte außerdem fest, dass die mutierten Proteine und gelegentlich auch ihre WT-Varianten bei Überexpression in Kulturzellen häufig die Bildung mikroskopisch sichtbarer zytoplasmatischer Foki induzieren, die ähnlich den o. g. pathogenen Zelleinschlüssen mit SG-Markern kolokalisieren. So konnte z. B. für Aggresomen von mutiertem TDP-43 in Kulturzelllinien, ähnlich wie in ALS- und FTLD-Patientenzellen, Kolokalisation mit eIF3 und TIA-1 festgestellt werden. Ferner wurde für toxische zytoplasmatische FUS-Aggregate eine Kolokalisation mit TIA-1 sowie TIAR nachgewiesen, und darüber hinaus konnte in zytotoxischen hnRNP1- und hnRNP2-Aggresomen der SG-Marker eIF4G identifiziert werden. Ähnliches gilt zudem für Akkumulationen von überexprimiertem WT-SMN1 in humanen Zelllinien, die dort mit TIA-1 und G3BP kolokalisieren.^{154,209,211,233,234,236,238}

Bezüglich PolyQ-Erkrankungen konnte außerdem beobachtet werden, dass perinukleäre Aggresomen aus pathogenen Htt-Exon1-Peptiden mit expandierten PolyQ-Domänen ebenfalls den SG-Marker TIA-1 enthalten. Darüber hinaus wurde zudem festgestellt, dass pathogene PolyQ-expandierte Ataxin-2-Mutanten in Kulturzellen akkumulationsaffiner als das nicht pathogene WT-Protein sind, und es zeigte sich ferner, dass sowohl pathogen expandiertes als auch nicht expandiertes Ataxin-2 bei Überexpression zur Akkumulationsbildung neigt. Diesbezüglich wurde allerdings bisher lediglich für nicht expandiertes Ataxin-2 eine Kolokalisation mit dem SG-Markern PABP1 und DDX6 nachgewiesen (s. Abs. 1.1.5.7.). Dennoch sprechen diese Ergebnisse insgesamt erneut dafür, dass SG bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen allgemein wichtig sein könnten, was vermutlich im Speziellen auch auf PolyQ-Erkrankungen zutrifft, wie die Analysen am Htt-Exon-1-Modell und zur Ataxin-2 Überexpression zeigten.^{60,65,119,153,239,240}

Weitere Gemeinsamkeiten zwischen SG und o. g. pathologischen Zelleinschlüssen mutierter Krankheitsproteine wurden zudem in Untersuchungen an Kulturzellen erkannt, die demonstrierten, dass zytotoxische Proteinaggregate auf externe Einflüsse ähnlich reagieren können wie SG. Das bedeutet beispielsweise, dass durch Inhibitoren der SG-Assemblierung auch die Bildung pathologischer Proteinaggregate unterdrückt werden kann, was für Aggregate von TDP-43- und FUS-Mutanten demonstriert wurde, deren Bildung durch CHX inhibiert werden konnte. Außerdem führte die Anwendung von Emetin, einem weiteren Inhibitor der SG-Assemblierung, zu starker Reduktion der Akkumulationsbildung des SMN1-Proteins.^{209,211,233,236}

Ferner gibt es darüber hinaus Hinweise auf Parallelen bezüglich des Abbaus pathogener Proteinakkumulationen und SG, die auf dem kürzlich erbrachten Nachweis beruhen, dass zelluläre SG durch Autophagie entsorgt werden können. In diesem Zusammenhang ist nämlich bekannt, dass v. a. viele ALS-assoziierte Mutationen Proteine bzw. Gene betreffen, die eine Funktion bei autophagischen Prozessen ausüben wie z. B. Optineurin, p62 oder VCP (*Valosin-containing protein*). Zudem konnte in ALS-Mausmodellen nachgewiesen werden, dass Lithiumverbindungen oder Trehalose die Krankheitssymptome der Versuchstiere abschwächen, was auf zellulärer Ebene durch verstärkte Autophagie vermittelt wurde. Diese Untersuchungen zeigen somit, dass SG und pathologische Aggresomen beide über Autophagie abgebaut werden, was erneut für deren Ähnlichkeit spricht (s. Abs. 1.2.7.2.).^{163,218,241,242,243}

Abschließend sei noch erwähnt, dass NTG ebenfalls insbesondere für neurodegenerative Erkrankungen bedeutsam sein könnten. Dies liegt jedoch nicht nur an ihrem neuronenspezifischen Vorkommen sondern auch daran, dass sie viele Komponenten mit SG teilen, von denen einige zudem mit neurodegenerativen Prozessen in Verbindung stehen. Dies sind z. B. FMRP, SMN1, TDP-43 und FUS, wobei FMRP darüber hinaus bereits eine wichtige Rolle bei synaptischen Prozessen nachgewiesen wurde.^{163,236,244}

1.2.7.2. Beziehungen zwischen Stress-Granula-Komponenten und Krankheitsproteinen

Neben den im letzten Abschnitt beschriebenen gemeinsamen Bestandteilen von SG und pathologischen Aggresomen, wurden zusätzlich auch funktionelle Verbindungen zwischen SG-Komponenten und Krankheitsproteinen identifiziert. In diesem Zusammenhang konnten v. a. zum SG-Marker TIA-1 einige aufschlussreiche Entdeckungen gemacht werden. So ergaben z. B. Untersuchungen an humanen Knochenmarks-Epithelzellen, dass TIA-1-Überexpression in diesen die Entstehung von teilweise mit TIA-1 assoziierten Aggresomen aus hyperphosphoryliertem, d. h. pathogen wirkendem tau-Protein fördert. Außerdem führte dabei die gemeinsame Überexpression von tau und TIA-1 im Vergleich zu der jedes einzelnen Proteins zu erheblich verstärkter SG-Bildung infolge oxidativen Stresses, und ferner induzierte auch hyperphosphoryliertes tau *per se* die SG-Bildung. Demzufolge nimmt man für die Tauopathie-Pathogenese an, dass ihr ein sich selbst verstärkender Zyklus von anormaler, d. h. hypersensibler und hyperaktiver SG-Bildung und tau-Aggregation zugrunde liegt. Dieser könnte zudem durch mRNA-Bindung von TIA-1 noch verstärkt werden, was auch eine Erklärung dafür wäre, dass RNA die Aggregation von hyperphosphoryliertem tau stimuliert.^{236,237,239,245}

Zusätzlich könnte auch das v. a. mit ALS und FTLT-T assoziierte SG-Protein TDP-43 die Tauopathie-Pathogenese gleich mehrfach beeinflussen. Diese Annahme basiert grundsätzlich auf der Beobachtung, dass die Tauopathie-Entstehung insbesondere auf Fehllokalisierung von hyperphosphoryliertem tau in neuronale Somata und Dendritenfortsätze beruht, d. h. weg vom hauptsächlichen tau-Wirkungsort, dem Axon. Deshalb wird angenommen, dass die o. g. hypersensible und -aktive SG-Bildung in den Somata von an Tauopathie erkrankten Neuronen dort für eine sehr effiziente tau-Sequestrierung in den anormalen SG sorgen und dadurch pathogen wirken könnte.^{237,239,246}

Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass TDP-43 an dieser Stelle die Tauopathie-Pathogenese indirekt beeinflussen könnte, da gezeigt wurde, dass es die SG-Bildung differentiell über TIA-1 und G3BP regulieren kann. Diesbezüglich fand man nämlich heraus, dass die zellulären Level von TIA-1 sowie dessen SG-Bildung durch TDP-43 herabreguliert werden, wohingegen es genau umgekehrt auf die G3BP-Level und -SG-Bildung wirkt. Dabei zeigte sich außerdem, dass pathogene Mutationen in TDP-43 seine SG-regulatorische Funktion kompromittieren, und dadurch die Entstehung TIA-1-positiver SG verstärkt wird. Demnach könnte ein ähnlicher TDP-43-Funktionsverlust über verstärkte Bildung von tau-zurückhaltenden TIA-1-SG (s. o.) auch die Tauopathie-Pathogenese begünstigen. Ferner zeigten weitere Experimente, dass verschiedene pathogene TDP-43-Mutationen darüber hinaus den axonalen NTG-Transport hemmen. Damit existiert zusätzlich eine zweite Möglichkeit wie TDP-43 zur Tauopathie-Entstehung beitragen könnte, und zwar in diesem Fall durch Begünstigung der Misslokalisierung von hyperphosphoryliertem tau. Insgesamt ist somit also demonstriert worden, dass das ALS- und FTLT-assozierte SG-Protein TDP-43 ein Regulator der TIA-1-SG-Bildung und des NTG-Transports ist, wodurch es die pathogene Wirkung von tau zweifach beeinflussen könnte.^{212,237,239,247}

Dies verleiht gleichzeitig den in Abs. 1.1.8. erwähnten Modifikatoreffekten von intermediär expandiertem Ataxin-2 auf die Symptomatik von ALS-Patienten sowie der Ataxin-2-Orthologe auf die TDP-43-Zytotoxizität in *S. cerevisiae* oder *D. melanogaster* (s. u.) zusätzliche Bedeutung. Diese weisen nämlich darauf hin, dass Ataxin-2 ein dem TDP-43 übergeordneter regulatorischer Faktor in einer hypothetischen pathologischen Kaskade sein könnte, die einerseits direkt zu SCA2 führt, und andererseits via TDP-43 Einfluss auf die ALS-, FTLT-T/tau- und Alzheimer-Krankheit-Pathologien hat. Diesbezüglich liegt zudem die Vermutung nah, dass besonders SG als Teil dieser Kaskade wichtig für die Vermittlung pathogener bzw. modifizierender Ataxin-2-Effekte sein könnten. Diese basiert v. a. darauf, dass alle o. g. pathogenesemodifizierenden Proteine, d. h. TIA-1,

TDP-43 und Ataxin-2 erstens kolokalisierende SG-Bestandteile sind, und dass zweitens insbesondere TIA-1 und Ataxin-2 zudem sehr wichtige SG-Assemblierungsfaktoren darstellen. Es ist somit insgesamt wahrscheinlich, dass die Ataxin-2 vermittelte SG-Assemblierung bzw. dessen Funktion in SG eine Vielzahl neurodegenerativer Krankheitsproteine indirekt reguliert, die selber häufig mRNP-Granula-Proteine sind. Dementsprechend könnten sich verschiedene Mutationen in *ATXN2* durch differentielle Störungen seiner SG-spezifischen Funktionen auf diverse Weise pathologisch auswirken, was, sofern zutreffend, eine mögliche Erklärung für unterschiedliche pathogene Einflüsse langer und moderat verlängerter *ATXN2*-PolyQ-Expansionen sein könnte.^{65,100,101,153,154,188} Insgesamt hatte sich damit in o. g. Untersuchungen besonders TDP-43 als potentieller zentraler Faktor eines mutmaßlich SG-abhängigen verzweigten Pathogeneseweges für Tauopathien, FTLT-T und ALS herausgestellt, der am häufigsten in ALS endet.

Diese Assoziation mit einer Motoneuronen-Erkrankung hat TDP-43 dabei mit SMN1 gemeinsam, das seinerseits für SMA (Spinale Muskelatrophie) verantwortlich gemacht wird. Da SMN1 zudem ebenfalls ein SG-Protein ist, wäre es somit denkbar, dass es ähnlich TDP-43 die SG-Bildung beeinflussen und dadurch pathogene oder pathogenesemodifizierende Eigenschaften vermitteln könnte. In diesem Zusammenhang durchgeführte erste Studien mit humanen Kulturzellen bestätigten diese Annahme insofern, als dass dort die SMN1-Überexpression zu verstärkter SG-Bildung führt. Zusätzlich konnte dabei für kultivierte SMA-Patientenzellen, deren SMN1-Funktion gestört ist, gezeigt werden, dass deren TIA-1-SG-Bildung im Vergleich zu Kontrollproben sehr schwach ist. Dabei waren die verbliebenen TIA-1-positiven SG in den SMA-Zellen zudem kleiner und, anders als in den Kontrollen, nicht mehr mit SMN1 kolokalisiert. Alles in allem wurde daraus geschlossen, dass möglicherweise auch die SMA-Pathogenese, auf der beobachteten gestörten TIA-1-SG-Bildung beruhen könnte.^{209,236}

Weiterhin könnte zudem auch eine hypoaktive SG-Assemblierung eine Rolle bei der Pathogenese von Prion-Erkrankungen spielen, wofür Untersuchungen mit murinen und humanen Zelllinien sprechen. Dort konnte nämlich festgestellt werden, dass die Bildung von Prion-Aggregaten die SG-Assemblierung inhibiert und ferner eine Hypersensibilisierung der Zellen gegenüber oxidativem Stress auslöst. Allerdings konnte dabei zudem eine durch das Prion-Protein vermittelte Induktion der PKR-abhängigen eIF2 α -Phosphorylierung erkannt werden. Die Prion-Aggregaten inhibieren dementsprechend vermutlich einen stromabwärts der eIF2 α -Phosphorylierung gelegenen SG-Assemblierungsschritt. Dieser Zusammenhang zwischen Prion-Protein-Aggregation und SG-Bildung ist allerdings derzeit noch größtenteils unerforscht. Unabhängig davon jedoch untermauern die o. g. Ergebnisse erneut, dass gestörte zelluläre Stressantworten und abberante SG-Dynamiken vermutlich sehr weitreichende und diverse neuropathogene Einflüsse ausüben können.^{236,248}

Einige eher indirekte Hinweise auf eine Verbindung zwischen der SG-Bildung und neurodegenerativen Prozessen konnten außerdem aus Toxizitätsmodifikatoren-Screens in *S. cerevisiae* erhalten werden, die prinzipiell demonstrierten, dass Gendelektionen bestimmter SG-Assemblierungsfaktoren toxische Effekte exogen exprimierter Krankheitsproteine abmildern können. So zeigte z. B. ein Hefe-Screen, dass die Deletionen von LSM7 oder PUB1, dem Hefe-Ortholog von TIAR, zu einer reduzierten Zytotoxizität des FUS-Proteins führen. Außerdem entdeckte man bei einem ähnlichen Screen den bereits erwähnten mildernden Einfluss der PBP1-Deletion auf die TDP-43-Zytotoxizität in Hefe (s. Abs. 1.1.8), wozu hier jedoch angemerkt sei, dass PBP1 in diesem Modellsystem eher eine akzessorische SG-Komponente darstellt.^{153,154,249}

Darüber hinaus wurden zudem auf Grundlage o. g. Studien zu TDP-43-Toxizitätsmodifikatoren auch Untersuchungen zu Einflüssen des dAtx2-Knockdown auf die TDP-43-abhängigen pathologischen Effekte in

D. melanogaster unternommen. Dabei stellte sich in Analogie zu den Hefe-Experimenten heraus, dass auch der dAtx2-Knockdown den pathologischen Effekte von TDP-43 in den Versuchstieren entgegenwirkte (s. Abs. 1.1.8). Ferner wurde ebenfalls in *D. melanogaster* beobachtet, dass Inhibition einer eIF2 α -Phosphatase, die eine verstärkte SG-Assemblierung bewirkt, zudem einen Anstieg der zellulären TDP-43-Menge sowie eine Zunahme der Motorikdefizite betroffener Fliegen auslöst, was insgesamt die Vermutung unterstützt, dass SG-Assemblierung und Neurodegeneration miteinander in Beziehung stehen ^{153,249}

Außerdem hatte sich schließlich bezüglich des Abbaus von SG bzw. Aggresomen im *D. melanogaster*-Modellsystem auch ergeben, dass mutationsbedingter Funktionsverlust des Autophagiefaktors VCP eine TDP-43-abhängige Zelldegeneration vermittelt. Dies unterstreicht somit zusätzlich die o. g. Gemeinsamkeit zwischen SG und pathogenen Aggresomen hinsichtlich ihres Abbaus durch Autophagie, die in diesem Fall auch als Aggrephagie bezeichnet wird (s. Abs. 1.2.7.1.). ^{163,218,250}

1.2.7.3. Ein aktuelles Modell zur Stress-Granula-vermittelten Entstehung pathogener Aggresomen

Die in den letzten beiden Abschnitten geschilderten Ergebnisse führten schließlich zu einer modernen Hypothese zur Bildung amyloider Aggregationen, die auch dynamische mRNP-Umbauprozesse mit einbezieht. Sie erweitert damit das ursprüngliche Konzept von einer allein vom Massenwirkungsgesetz abhängigen Aggresombildung. ^{163,230,236}

Gemäß dieser Hypothese geht man davon, dass pathogene Mutationen der v. a. in SG-Proteinen häufig auftretenden prionartigen Domänen deren Aggregationsneigung verstärken, wobei auch PolyQ-Domänen als prionartig angesehen werden, da sie im Prinzip den Extremfall einer Q-reichen Sequenz darstellen. Man nimmt zudem an, dass diese Mutationen die Wahrscheinlichkeit der Umwandlung herkömmlicher in sogenannte persistierende SG erhöhen, in denen die normalerweise reversiblen Verbindungen der prionartigen Domänen hyperstabil geworden sind (s. Abb. 1.4). Diese sehr beständigen SG-artigen amyloiden Akkumulationen werden dabei als Vorläufer pathogener Amyloidaggregate angesehen, wobei für die Bildung der Aggresomen weiterhin ein stochastischer Mechanismus angenommen wird. Ferner werden diesbezüglich die persistierenden von den herkömmlichen SG insofern klar abgegrenzt, als dass nur letzteren eine zelluläre Schutzfunktion zugesprochen wird. ^{230,251,252,253} Dieser Hypothese entsprechend, würde somit unter pathologischen Bedingungen zellulärer Stress die Aggresombildung fördern, was auch erklären könnte, warum insbesondere Neuronen davon betroffen sind, da diese durch ihren hohen Energieverbrauch relativ starkem und lang anhaltendem oxidativem Stress aufgrund der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ausgesetzt sind. ^{254,255}

Ferner glaubt man, dass persistierende SG aufgrund ihres dichten und stabilen amyloiden Zusammenschlusses ineffizient disassemblieren und zudem für proteasomalen Abbau nur schwer zugänglich sind. Letzteres würde dabei auch erklären, warum pathogene Zelleinschlüsse oft hyperubiquitinyliert sind. Demzufolge wird davon ausgegangen, dass besonders Autophagie für die Entfernung SG-artiger Amyloide verantwortlich ist, deren prinzipielle Rolle beim Abbau herkömmlicher SG sowie pathogener Proteinaggregationen bereits belegt werden konnte. Dies würde zudem begründen, warum Mutationen autophagierelevanter Gene neurodegenerative Prozesse auslösen bzw. modifizieren können, und weshalb niedermolekulare Autophagie-Aktivatoren degenerativen Prozessen in ALS-Mausmodellen entgegenwirken (s. Abs. 1.2.7.1). ^{230,236}

Als Hauptgrund für die Zytotoxizität der SG-ähnlichen Aggresomen wird in diesem Zusammenhang ferner eine gestörte, zelluläre Ribostase angesehen, ein Begriff der in Analogie zur Proteostase eingeführt wurde. Ribostase beschreibt dementsprechend die Fähigkeit von Zellen ein auf die jeweils aktuellen Lebensbedingungen

abgestimmtes spezifisches Transkriptom dynamisch aufrechtzuerhalten. Für eine effektive räumlich und zeitlich koordinierte Ribostase, ist deshalb die Bildung von mRNP-Granula in eukaryontischen Zellen mit Sicherheit wichtig, was insbesondere für die SG-Assemblierung im Zuge der integrierten Stressantwort gilt.^{230,236}

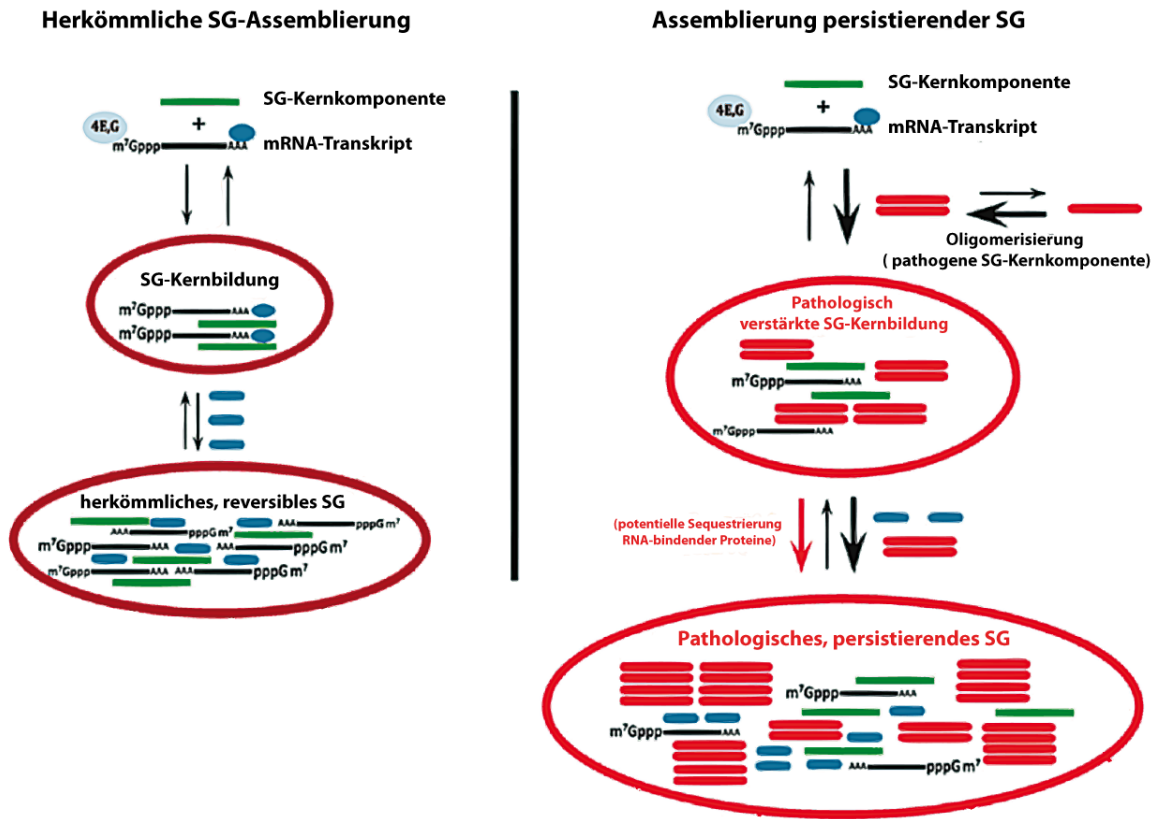


Abb. 1.4 Arbeitsmodell zur Aggresomenbildung via abberanter Stress-Granula-Assemblierung. Links: Bildung herkömmlicher, reversibel assemblierender SG. Rechts: Entstehung pathologischer, stabiler SG verursacht durch krankheitsassoziierte Mutationen in SG-Kernkomponenten. Von den abberanten SG wird angenommen, dass ihre pathogene Wirkung zumindest teilweise auf Sequestrierung noch unbekannter RNA-bindender Proteine beruhen könnte, und dass solche Prozesse ebenfalls von krankheitsassoziierten Mutationen beeinflusst werden könnten. (bearbeitet nach Quelle 234)

Die Annahme einer durch die Bildung SG-artiger Amyloide verursachten Ribostase-Störung, basiert dabei erstens darauf, dass viele neurodegenerativen Krankheitsproteine RNA-Bindemotive besitzen. Zweitens konnte in einer Untersuchung diverser RNA-bindender Proteine gezeigt werden, dass darunter viele wichtige SG-Komponenten existieren, die zudem als stark prionartig prognostiziert worden sind, und bei denen es sich ferner relativ häufig um neurodegenerative Krankheitsproteine handelt (z. B. FUS oder TDP-43). Drittens konnte man für derartige Proteine zudem zeigen, dass ihre Zytotoxizität eher durch deren RNA-Bindedomänen als durch ihre prionartigen Domänen vermittelt wird, und viertens betreffen viele der krankheitsassoziierten Mutationen dieser Proteine ebenfalls ihre RNA-Bindemotive. Deshalb wird davon ausgegangen, dass im Krankheitsfall häufig RNA-spezifische Funktionen neurodegenerativer Proteine gestört sein könnten.^{154,181,230,232,236}

Insgesamt könnte somit auch die SCA2-Pathogenese über Assemblierung hyperstabiler SG ablaufen, da Ataxin-2 wie erwähnt im Prinzip ein Sonderfall eines RNA-bindenden Proteins mit prionartiger PolyQ-Domäne ist. Zudem könnte entsprechend auch der modifizierende Einfluss von Ataxin-2 auf die TDP-43-Pathologie mit abberanter SG-Bildung zusammenhängen, da hieran gleich zwei RNA-bindende prionartige SG-Komponenten beteiligt sind (s. Abs. 1.1.8. & 1.2.7.2). Ferner könnte dafür auch der für Ataxin-2 nachgewiesene

dosisabhängige Einfluss auf PB- und SG-Assemblierung wichtig sein (s. Abs. 1.1.5.7). Letztendlich ist zu diesen Zusammenhängen jedoch zurzeit zu wenig bekannt, um konkrete Aussagen darüber machen zu können.

Schließlich wurden ferner drei prinzipiell mögliche Mechanismen postuliert, wodurch die hyperstabilen SG-artigen Amyloide toxische Effekte ausüben könnten. So könnten sie zum einen dafür sorgen, dass durch ihre Bildung das aggregierende Protein selbst aus dem Pool freier funktioneller Proteinmoleküle abgezogen wird, was dann über dessen Funktionsverlust zytotoxisch wirken könnte (s. Abb. 1.4). Darüber hinaus könnten die Aggresomen zudem andere mRNP-Komponenten sequestrieren und so deren Funktion stören, wobei diese Faktoren sowohl (RNA-bindende) Proteine als auch miRNA oder lange nicht kodierende RNAs sein können. In diese Kategorie könnte auch die bereits erwähnte Sequestrierung apoptotischer Signalproteine wie z. B. TRAF2 in herkömmlichen SG fallen (s. Abs. 1.2.3.3.), die in persistierenden SG-Amyloiden entsprechend verstärkt sein könnte. Allerdings sind die bisher identifizierten in SG zurückgehaltenen Signalproteine oft pro-apoptotisch wirksam. In diesen Fällen käme jedoch auch eine durch SG-Amyloidisierung verstärkte Repulsion dieser Proteine als zellulärer Pathomechanismus für neurodegenerative Erkrankungen in Frage. Schließlich könnte auch eine durch Bildung SG-artiger Aggresomen ausgelöste verstärkte Sequestrierung oder Repulsion von mRNA-Transkripten zu Veränderungen in der Ribostase führen, die letztendlich zytotoxisch wirken könnten. Darüber hinaus sind natürlich auch kombinierte Mechanismen denkbar, doch kann über diese Prozesse derzeit nur spekuliert werden.^{165,184,200,230,236,256}

Als letzter Punkt sei noch erwähnt, dass sowohl in Zellkultur als auch in humanem Gewebe die Proteinmengen des essentiellen SG-Assemblierungsfaktor TIA-1 mit zunehmendem Lebensalter bzw. steigender Passagenzahl herabreguliert worden waren. Dies gibt Grund zu der Annahme, dass auch altersbedingte Störungen der Assemblierung herkömmlicher SG zu zellulären neurodegenerativen Prozessen beitragen könnten, was auch erklären könnte, warum die Symptome vieler neurodegenerativer Erkrankungen v. a. in höherem Alter einsetzen.^{163,257}

2. Ziele der Arbeit

Derzeit ist über die Pathogenese von SCA2 nur sehr wenig bekannt und im Gegensatz zu anderen PolyQ-Erkrankungen wie Chorea Huntington oder SCA3 spielen dabei offenbar intranukleäre Zelleinschlüsse des entsprechenden Krankheitsproteins (Ataxin-2 im Fall von SCA2) keine große Rolle. Man konnte allerdings feststellen, dass in Geweben von SCA2-Patienten physiologische Ataxin-2-Proteinabschnitte spezifisch angereichert sind, die vermutlich den Spaltprodukten einer durch Caspase-3 vermittelten proteolytischen Prozessierung von Ataxin-2 entsprechen.^{7,50,110} Diese physiologischen Ataxin-2-Spaltprodukte könnten somit für die SCA2-Pathogenese bedeutsam sein. Das wird auch dadurch bekräftigt, dass im Fall anderer neurodegenerativer Erkrankungen bereits Teilabschnitte der spezifischen Krankheitsproteine (z. B. TDP-43 bei ALS oder Htt bei Chorea Huntington) mit deren Pathogenese in Verbindung gebracht wurden.^{232,258,259,260,261}

Deshalb war ein Ziel dieser Arbeit mehr über die zellbiologischen Eigenschaften o. g. Ataxin-2-Spaltprodukte zu erfahren, um dadurch optimalerweise Schlüsse auf deren pathologisches Potential ziehen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Spaltprodukte zunächst im *S. cerevisiae*-Modellsystem hinsichtlich ihrer Zytotoxizität sowie ihrer Fähigkeit zur Fokibildung untersucht, wozu Wachstumsanalysen und fluoreszenzmikroskopische Studien durchgeführt wurden. Zudem sollten gegebenenfalls beobachtete Fluoreszenzfoki hinsichtlich ihrer Kolokalisation mit Zellkompartiment-Markerproteinen sowie ihres Stress-Granula-Charakters analysiert werden. Der Hauptgrund für letztgenannte Untersuchungen war dabei, dass für Ataxin-2 sowie für sein Hefe-Ortholog PBP1 bereits sowohl Zugehörigkeit zu Stress-Granula als auch eine Funktion bei deren Assemblierung festgestellt werden konnte.^{60,99,101} Schließlich sollten die Ataxin-2-Spaltprodukte zudem, zur Validierung der Ergebnisse der Hefe-Analysen, auch in humanen HeLa-Zellen mit Hilfe konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie hinsichtlich ihrer Fokibildung und Kolokalisation mit zellulären Markerproteinen untersucht werden.

Darüber hinaus hatte sich kürzlich gezeigt, dass Ataxin-2 auch Einfluss auf die Auswirkungen von TDP-43 in verschiedenen Modellsystemen sowie auf die Pathogenese von ALS hat.¹⁵³ Dies war der Anlass dafür in dieser Arbeit die Beziehung von Ataxin-2 und TDP43 ebenfalls näher zu untersuchen, wobei hier im Speziellen gemeinsame Regulatoren beider Proteine identifiziert werden sollten. Dazu wurden Hefe-Screens mit ausgewählten Deletionsstämmen durchgeführt, bei denen Deletionen bestimmt werden sollten, die sowohl das Wachstum Ataxin-2- als auch TDP-43 exprimierender Zellen gleichartig negativ beeinflussen. Die dabei untersuchten Deletionen waren ferner auf Komponenten von Stress-Granula oder den damit in Verbindung stehenden P-Bodies beschränkt, da TDP-43 ebenso wie Ataxin-2 (s. o.) bereits als SG-Komponente identifiziert worden war.^{190,210,211,212} Außerdem sollte daraufhin im Fall der erfolgreichen Identifikation gemeinsamer Regulatoren beider Krankheitsproteine im HeLa-Zellkultur-Modell überprüft werden, ob die humanen Orthologe dieser Regulatoren dort ebenfalls Einfluss auf Ataxin-2 oder TDP-43 haben.

Schließlich sollte in weiteren Versuchen mehr über die größtenteils unbekanntere PBP1-Funktion in Hefe in Erfahrung gebracht werden, um daraus optimalerweise Rückschlüsse auf die ebenso nur wenig verstandene Ataxin-2-Funktion in menschlichen Zellen ziehen zu können. Da diesbezüglich zudem einige Studien bereits eine Beteiligung von Ataxin-2 an der Translationsregulation vermuten ließen, wurden zu diesem Zweck massenspektrometrische Analysen zu Effekten der PBP1-Deletion auf das *S. cerevisiae*-Proteom durchgeführt.^{68,69,72}

3. Material & Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Werkzeuge

Tab. 3.1: Genutzte elektronische Geräte und weitere Werkzeuge

Bezeichnung	Hersteller
<i>Elektronische Geräte</i>	
Agarose-Gelkammer und Zubehör	MPI-Werkstatt
Applied Biosystems™ 7900HT Fast RT-PCR-System	Thermo-Fisher
Axio Imager Z1-Mikroskop	Zeiss
Brutschränke	Heraeus oder New Brunswick Scientific
Elektronische Mehrschrittpipette Research®Pro (5-100 µl)	Eppendorf
FastPrep™-24 Zellhomogenisator	MP Biomedicals
Foto-Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Geldokumentationssystem AlphaImager	Alpha Innotech
Kamera LH-DC10	Canon
LSM510Meta-Mikroskop	Zeiss
LSM700-Mikroskop	Zeiss
Magnetrührer	IKA Combimag-REO
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand
Mikrozentrifuge 5415D	Eppendorf
Mini-PROTEAN®II-Gelkammern	Bio-Rad
Nano-Drop™-ND2000-UV/VIS-Spektralphotometers	Thermo-Fisher
Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad
Präzisionswaagen AT250 & PM3000	Mettler Toledo
Schüttelinkubator Innova 44	Heraeus
Spektralphotometer 6700 Vis.	Jenway
Sterilbank	Heraeus
Taumel-Rollenmischer RM5	CAT
Thermocycler Peltier PTC100	MJ Research
Thermocycler VapoProtect	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultrazentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter
UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert
Wipptisch Shaker DRS-12	Neo-Lab
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
<i>Nicht elektronische Werkzeuge</i>	
1 ml Spritze	Braun
384-Kammer Mikrotiterplatten	Thermo-Fisher
96-Kammer Mikrotiterplatten	Techno Plastic Products AG (TPP)
Deckgläschen quadratisch (18x18 mm)	Roth oder Menzel
Deckgläschen rund (d = 12 mm)	Roth
Glasperlen (versch. Durchmesser)	MPI-Werkstatt
Glasplatten	Bio-Rad
Impfeschlingen (1 µl, 10 µl)	Sarstedt oder Nunc
Klebefolien Microamp	Thermo-Fisher
Kryogefäße (2 ml)	Thermo-Fisher
Medizinischer Röntgenfilm	Fuji
Mehrkanal-Mikroliterpipette Research®(100µl)	Eppendorf
Mikroliterpipetten (diverse)	Eppendorf oder Gilson
Neubauer-Zählkammer	Roth

Nicht elektronische Werkzeuge (Fortsetzung)

Objektträger	Roth oder Menzel
Parafilm [®]	American National Can Company
Pasteurpipetten	VWR International
PCR-Gefäße (Multiply [®] -µStrip je 8 × 0,2 ml)	Sarstedt
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettierhilfen pi-pump [®] 2500	Roth
Plastik-Küvetten (VIS)	Sarstedt
PVDF-Membran Imobilion-P	Millipore
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf oder Sarstedt
Röntgenfilm-Kassette	Fuji
Säuregewaschene Glaskügelchen (425 – 600 µm)	Sigma
SDS-PAGE-Gelkämme (15-fach)	Bio-Rad
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Spritzen-Kanülen Sterican [®] (d = 0,9 mm, l = 40 mm)	Braun
Verpackungsfolie Sarogold [®] -Pro	Saropack AG
Whatman-Papier (3 mm)	GE Healthcare
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Techno Plastic Products AG (TPP)
Zellkulturplatten (6, 12, 24 Kammern)	Techno Plastic Products AG (TPP)
Zentrifugationsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt oder Greiner

3.1.2. Medien, Puffer, Lösungen & Chemikalien

Eine Zusammenstellung der verwendeten Lösungen, Puffer sowie der Hefe- und Zellkulturmedien zeigt Tabelle 3.1. Alle Hefemedien wurden zunächst als zweifach konzentrierte Stammlösungen ohne zusätzliche Komponenten, d. h. Monosaccharide, Aminosäuren oder Uracil hergestellt, die bei 121°C für 15 min autoklaviert wurden. Diese wurden dann bei Bedarf zur Herstellung von Flüssig- und Festmedien genutzt. Die Puffer und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert. In der Tabelle wurden nur Volumenprozentangaben als solche gekennzeichnet. Alle sonstigen Prozentangaben entsprechen Gewichtsprozentangaben. Außerdem wurden folgende Chemikalien genutzt: Methanol (99,8 % (v/v)), Ethanol (96 % (v/v)), 1 M Natronlauge, Salzsäure (37 %) und Glycerol (alle Merck) sowie DMSO & Ethidiumbromid (beide Sigma-Aldrich), 50 mM MgCl₂ (NEB), Hoechst 33342 (Thermo-Fisher) und Agarose (Biozym).

Tab. 3.2: Medien, Puffer und Lösungen (Reagenzien-Hersteller in Klammer; Alle Prozentangaben beziehen sich, soweit nicht anders vermerkt, auf Masseanteile).

Bezeichnung(en)	Zusammensetzung
Hefe-Medien	
1xYPD (<i>yeast peptone dextrose</i>)-Medium = Vollmedium:	2 % Bacto [™] -Trypton (BD) + 1 % Bacto [™] -Hefe-Extrakt (BD) in <i>Aqua bidest.</i> + 2 % Glucose (Sigma-Aldrich) vor Gebrauch zugefügt (sterile Bedingungen) (Glucose-Stammlösung: 40 %)
1xCSM/ Glc-Medium (-H/-U/-H & U) = Selektionsmedium	0,75 % Difco [™] -YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i>) ohne Aminosäuren (BD) + 0,07 % CSM (<i>Complete Supplement Mixture</i>) ohne Adenin, Leucin, Histidin, Tryptophan und Uracil (MP Biomedicals) in <i>Aqua bidest.</i> + 2 % Glucose vor Gebrauch zugefügt (s. o.) + 0,06 g/l Leucin + 0,04 g/l Tryptophan + 0,01 g/l Adenin (alle Sigma-Aldrich) vor Gebrauch zugefügt + je nach Selektionsart ggf. 0,02 g/l Histidin oder 0,01 g/l Uracil (beide Sigma-Aldrich)

Hefe-Medien Fortsetzung)

1xCSM/ Gal-Medium
(-H/-U/-H & U)
= Induktionsmedium

Wie 1xCSM/ Glc-Medium jedoch mit 2 % Galaktose (Sigma-Aldrich) anstatt Glucose (Gal-Stammlösung: 20 %)

Festmedien
(1xYPD, 1xCSM/ Glc, 1xCSM/ Gal)
= Hefe-Agar

Wie die entsprechenden Flüssigmedien (s. o.)
+ 2 % Bacto™-Agar (BD)

Bakterien-Medien

LB (Luria-Bertani)-Medium pH 7,0

1 % Bacto™-Pepton (BD)
+ 0,5 % Bacto™-Hefe-Extrakt
+ 0,5 % NaCl

LB_{Amp}-Selektionsmedium

Wie LB-Medium + 100 µg/ ml Ampicillin

LB-Festmedien (Agar)

Wie LB-(Selektions-)Medium + 1,5 % Bacto™-Agar

HeLa-Zellkulturmedien:

Vollmedium

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) inkl. 4,5 g/l Glucose & 4 mM L-Glutamin (Gibco™, steril)
+ 10 % (v/v) FBS (*fetal bovine serum*; Biochrom AG);
+ 1 % Penicillin/ Streptomycin (P/S; Gibco™) (Lagerung bei 4°C)

Stressinduktionsmedium

Wie Vollmedium + 0,5mM Natriumarsenit (Merck)

Einfriermedium

Wie Vollmedium jedoch mit 20 % (v/v) FBS
+ 10 % DMSO

Puffer:

PBS-Puffer (10x) pH 7,4

1,37 M NaCl (Merck)
+ 27 mM KCl (Merck)
+ 0,10 M Dinatriumhydrogenphosphat (Merck)
+ 20 mM Kaliumdihydrogenphosphat (Merck)

TBST-Puffer pH 7,4
= Immunoblot-Waschpuffer

10 mM Tris-HCl (Merck)
+ 100 mM NaCl
+ 0,2 % (v/v) Tween® 20 (Sigma-Aldrich)

TAE-Puffer pH 8,0

0,04 M Tris-Base (Sigma-Aldrich)
+ 0,02 M Essigsäure (Merck)
+ 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich)

TE-Puffer (10x) pH 7,5

0,10 M Tris-Base
+ 10 mM EDTA

Taq-Polymerase Puffer (10x), pH 8,8

0,67 M Tris-HCl
+ 0,16 M Ammoniumsulfat (Merck)
+ 25 mM Magnesiumchlorid (Merck)
+ 0,1 % Tween 20

MS-Lysepuffer pH 8,0

20 mM Tris-HCl
+ 8 M Harnstoff (Sigma-Aldrich)
+ 75 mM NaCl (Lagerung bei 4°C)
+ Protease-/Phosphatase-Inhibitoren (Roche) vor Gebrauch zugefügt

Puffer (Fortsetzung):

HeLa-Lysepuffer pH 7,4	20 mM Tris-HCl + 0,15 M NaCl + 1 mM EDTA + 1 % (v/v) Triton [®] X-100 (Merck) (Lagerung bei 4°C) + 0,01 % Benzonase (Merck) vor Gebrauch zugefügt + Protease-Inhibitoren vor Gebrauch zugefügt
6x Agarose-Gelelektrophorese-Ladepuffer	10 mM Tris-HCl + 0,10 M EDTA + 30,0 % (v/v) Glycerol + 0,02 % SDS (Roth) + 0,25 % Bromphenolblau (Sigma-Aldrich) + 0,25 % Xylencyanol (Roth)
5x Lämmli-Ladepuffer	0,25 M Tris-Base + 0,10 M DTT (Sigma-Aldrich) + 0,5 % Bromphenolblau + 50 % (v/v) Glycerol + 10 % SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer pH 6,8	0,50 M Tris-Base + 0,1 % SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer pH 8,8	1,50 M Tris-Base + 0,1 % SDS
10x SDS-PAGE Laufpuffer	0,25 M Tris-Base + 2,50 M Glycin (Merck) + 1 % SDS
Immunoblot-Transferpuffer pH 8,3	25 mM Tris + 192 mM Glycin + 0,037 % SDS + 20 % (v/v) Methanol
Immunoblot-Blockier- und Antikörperpuffer	TBST pH 7,4 + 5 % Trockenmilchpulver
Immunfluoreszenz (IF)-Blockierpuffer	PBS pH 7,4 + 5 % BSA (Sigma-Aldrich) + 0,1 % (v/v) Triton [®] X-100 + 0,05 % (v/v) Tween [®] 20 + 0,05 % Natriumazid (Merck)
Lösungen:	
Hefe-Transformations-Mix 1	0,1 M Lithiumacetat (Sigma-Aldrich) + 1,0 M Sorbitol (Sigma-Aldrich) + 0,5x TE-Puffer (s. o.)

Lösungen (Fortsetzung):

Hefe-Transformations-Mix 2	0,1 M Lithiumacetat + 40 % PEG-3350 (Sigma-Aldrich) + 1x TE-Puffer
Heringssperma-DNA-Lösung	0,2 % DNA-Natriumsalz (Sigma-Aldrich) + 0,5 mM EDTA
dNTP-Lösungen	100 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (GE Healthcare) (Für PCR-dNTP-Mixe wurden alle dNTPs zu gleichen Teilen gemischt)
Formaldehyd-Lösung (Zellfixierer)	4 % (v/v) Formaldehyd in <i>Aqua bidest.</i>

3.1.3. Gebrauchsfertige Reagenzien, Lösungen & Kits

Tabelle 3.3: Gebrauchsfertige Reagenzien, Lösungen und Kits

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
Bradford-Proteinfärbelösung	Protein-Konzentrationsbestimmungen	Bio-Rad
Quickload [®] -1kb	DNA-Größenstandard	NEB
Wizard [®] -SV-PCR-cleanup system-Kit	PCR-Produkt Aufreinigung	Promega
10x Trypsin/EDTA-Lösung	Ablösen adhärenter Säugerzellen	Biochrom AG
Attractene	Säugerzell-Transfektionsreagenz	Qiagen
Lipofectamine [™] RNAiMAX	siRNA-Transfektionsreagenz	Thermo-Fisher
RNaseZAP	RNase-Dekontaminationsmittel	Thermo-Fisher
RNeasy-Mini-Kit	RNA-Isolation aus Säugerzellen	Qiagen
M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (10x)	Reverse Transkription von mRNA	Promega
Fast-SYBR [®] -Green-Mastermix	cDNA-Detektion bei qRT-PCR	Thermo-Fisher
GeneJET Plasmid Extraction Miniprep-Kit	Plasmid-Isolation aus Bakterien (klein)	Thermo-Fisher
Nucleobond [®] -Xtra-Midi	Plasmid-Isolation aus Bakterien (mittel)	Machery-Nagel
PageRuler [™] Plus Prestained	Protein-Molekulargewichts-Standard	Thermo-Fisher
Western-Lightning [®] -Plus ECL-Kit	Protein-Detektion auf Immunoblot	Thermo-Fisher
Fluoromount G	Mounting-Medium für Mikroskopie	SouthernBiotech
Immersionsöl	Optimierung mikroskopischer Bilder	Zeiss

3.1.4. Bakterienstämme, Hefestämme und Zelllinien

Der verwendeten Mikroorganismenstämmen sind in Tab 3.4 aufgelistet. Für weitere zellbiologische Untersuchungen wurde außerdem die humane Zervixkarzinom-Epithelzelllinie HeLa (ATCC[®]) verwendet. Ferner stammten bis auf ΔPBPI-sm alle genutzten Hefe-Deletionsstämmen sowie der WT-Hefestamm BY4741 aus der Euroscarf (*European Saccharomyces cerevisiae archive for functional analysis*)-Deletionsbank und wurden über die Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt bezogen.

Tabelle 3.4: Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Quelle	Genotyp
Bakterienstamm		
XL1-Blue	Stratagene	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq Z_M15 Tn10 (Tetr)]</i>
Hefestämme		
BY4741 (WT)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1;leu2Δ0;meth15Δ0;ura3Δ0</i>
YAL021C (ΔCCR4)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1;leu2Δ0;meth15Δ0;ura3Δ0;CCR4Δ::kanMX4</i>

Hefestämme (Fortsetzung)

YDL160C (ΔDHH1)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; DHH1Δ::kanMX4</i>
YKL204W (ΔEAP1)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; EAP1Δ::kanMX4</i>
YDR206W (ΔEBS1)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; EBS1Δ::kanMX4</i>
YLR192c (Δelf3j/HCR)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; HCRΔ::kanMX4</i>
YGR162W (Δelf4G1/TIF4631)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; TIF4631Δ::kanMX4</i>
YGL049C (Δelf4G1/TIF4632)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; TIF4632Δ::kanMX4</i>
YJL124C (ΔLSM1)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; LSM1Δ::kanMX4</i>
YHR121W (ΔLSM12)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; LSM12Δ::kanMX4</i>
YOL111C (ΔMDY2)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; MDY2Δ::kanMX4</i>
YBR212W (ΔNGR1)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; NGR1Δ::kanMX4</i>
YGR178C (ΔPBP1 = ΔPBP1-DB)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; PBP1Δ::kanMX4</i>
YDL053C (ΔPBP4)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; PBP4Δ::kanMX4</i>
YNR052C (ΔPOP2)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; POP2Δ::kanMX4</i>
YHL034C (ΔSBP1)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; SBP1Δ::kanMX4</i>
YPR129W (ΔSCD6)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; SCD6Δ::kanMX4</i>
YJL080C (ΔSCP160)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; SCP160Δ::kanMX4</i>
YBR111W-A (ΔSUS1)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; SUS1Δ::kanMX4</i>
YHR077C (ΔUPF2)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; UPF2Δ::kanMX4</i>
YGR072W (ΔUPF3)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; UPF3Δ::kanMX4</i>
YOR359W (ΔVTS1)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; VTS1Δ::kanMX4</i>
YGL173C (ΔXRN1)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; XRN1Δ::kanMX4</i>
YGR250C (ΔYGR250c)	s. o.	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; YRG250cΔ::kanMX4</i>
YGR178C (ΔPBP1 = ΔPBP1-sm)	A. Günther (AG Krobitsch) ²⁶²	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; ura3Δ0; PBP1Δ</i>
ERG6-RFP	AG O'Shea ²⁶³	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; ERG6-mRFP-KanMX6</i>
NIC96-RFP	AG O'Shea ²⁶³	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; NIC96-mRFP-KanMX6</i>
PEX3-RFP	AG O'Shea ²⁶³	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; PEX3-mRFP-KanMX6</i>
SAC6-RFP	AG O'Shea ²⁶³	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; SAC6-mRFP-KanMX6</i>
SEC13-RFP	AG O'Shea ²⁶³	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; SEC13-mRFP-KanMX6</i>
SIK1/NOP56-RFP	AG O'Shea ²⁶³	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; NOP56-mRFP-KanMX6</i>
SPC42	AG O'Shea ²⁶³	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; SPC42-mRFP-KanMX6</i>
ANP1-RFP	AG O'Shea ²⁶³	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; ANP1-mRFP-KanMX6</i>
SNF7-RFP	AG O'Shea ²⁶³	<i>MATα his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; SNF7-mRFP-KanMX6</i>
PBP1-GFP	Invitrogen ²⁶³	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; uraΔ0; PBP1-GFP-HIS3MX</i>
DHH1-GFP	Invitrogen ²⁶³	<i>Mat a his3Δ1; leu2Δ0; meth15Δ0; uraΔ0; DHH1-GFP-HIS3MX</i>

3.1.5. Plasmidvektoren und siRNAs

Die siRNA-Pools für die siRNA-Knockdown-Experimente stammten von Dharmacon und sind im Folgenden aufgelistet:

- hCNOT6 ON-TARGETplus SMARTpool (Dharmacon: L-019101-00-0005)
- hCNOT6L ON-TARGETplus SMARTpool (Dharmacon: L-016411-00-0005)
- hCNOT7 ON-TARGETplus SMARTpool (Dharmacon: L-012897-00-0005)
- hCNOT8 ON-TARGETplus SMARTpool (Dharmacon: L-018791-00-0005)
- ON-TARGETplus Non Targeting Pool (NT-siRNA, Dharmacon: D-001810-10-20)

Die in dieser Arbeit genutzten Plasmide zeigt die folgende Tabelle.

Tab. 3.5: Verwendete Hefe- und Säugerzell-Expressionsvektoren (M. R. = Markus Ralser, F. W. = Franziska Welzel, A. G. = Anika Günther, K. E. = Katharina Erbe, F. G. Flaviano Giorgini, A. M. = Anatoli Meriin, B. J. = Brian Johnson, R. B. = Ross Buchan)

Bezeichnung	Promotor	Fusions-Tag(s)	Marker	Quelle
Hefe-Expressionsvektoren				
p423Gal-L	GAL1	/	AmpR, HIS3	ATCC® (87335) ²⁶⁴
p423Gal-A2-Q22	GAL1	/	AmpR, HIS3	AG Krobitsch (M. R.) ⁸⁶
p423Gal-A2-Q79	GAL1	/	AmpR, HIS3	AG Krobitsch (F. W.)
p423Gal-A2-C3NT-Q22	GAL1	/	AmpR, HIS3	AG Krobitsch (A. G.)
p423Gal-A2-C3NT-Q79	GAL1	/	AmpR, HIS3	AG Krobitsch (A. G.)
p423Gal-A2-C3CT	GAL1	/	AmpR, HIS3	AG Krobitsch (A. G.)
p423Gal-A2-C3NT-Q22-RS	GAL1	Redstar™	AmpR, HIS3	AG Krobitsch (K. E.)
p423Gal-A2-C3CT-RS	GAL1	Redstar™	AmpR, HIS3	AG Krobitsch (A. G.)
p423Gal-A2-C3NT-Q22-GFP	GAL1	GFP	AmpR, HIS3	AG Krobitsch (A. G.)
P423Gal-A2-C3CT-GFP	GAL1	GFP	AmpR, HIS3	AG Krobitsch (A. G.)
p426Gal-L	GAL1	/	AmpR, URA3	ATCC® (87341) ^{264,63}
p426Gal-TDP43	GAL1	/	AmpR, URA3	AG Gitler (B. J.) ²⁶⁵
p426Gal-TDP43-GFP	GAL1	GFP	AmpR, URA3	AG Gitler (B. J.)
p416GPD	GPD	/	AmpR, URA3	ATCC® (87360) ²⁶⁴
p416GPD-A2-C3NT-Q22-RS	GPD	Redstar™	AmpR, URA3	AG Krobitsch (A. G.)
p416GPD-A2-C3CT-RS	GPD	Redstar™	AmpR, URA3	AG Krobitsch (A. G.)
pYES2-SCA1-Q30	GAL1	Flag*, GFP	AmpR, URA3	AG Lindquist (F. G.)
pYES2-SCA1-Q80	GAL1	Flag*, GFP	AmpR, URA3	AG Lindquist (F. G.)
pYES2-Htt-Q25 (Exon1)	GAL1	Flag*, GFP	AmpR, URA3	AG Lindquist (A. M.) ²⁶⁶
pYES2-Htt-Q103 (Exon1)	GAL1	Flag*, GFP	AmpR, URA3	AG Lindquist (A. M.) ²⁶⁶
pRP-EDC3-mCh	EDC3	mCherry	AmpR, URA3	AG Parker (R. B.) ⁹⁹
pRP-Pub1-mCh	PUB1	mCherry	AmpR, URA3	AG Parker (R. B.) ⁹⁹
BG1805-CCR4	GAL1	HexaHis, HA, Protease 3C, Protein A (ZZ-Domäne)	AmpR, URA3	yeast ORF collection (GE Lifescience)
BG1805-POP2	GAL1	HexaHis, HA, Protease 3C, Protein A (ZZ-Domäne)	AmpR, URA3	yeast ORF collection (GE Lifescience)
Säuger-Expressionsvektoren				
pCMV-Myc	CMV-IE	c-Myc	AmpR	Clontech
pCMV-Myc-A2-Q22	CMV-IE	c-Myc	AmpR	AG Krobitsch (M. R.)
pCMV-Myc-A2-Q79	CMV-IE	c-Myc	AmpR	AG Krobitsch (F. W.)
pCMV-Myc-A2-C3NT-Q22	CMV-IE	c-Myc	AmpR	AG Krobitsch (A. G.) ²⁶²
pCMV-Myc-A2-C3NT-Q79	CMV-IE	c-Myc	AmpR	AG Krobitsch (A. G.)
pCMV-Myc-A2-C3CT	CMV-IE	c-Myc	AmpR	AG Krobitsch (A. G.) ²⁶²

* N-terminaler Tag (alle sonstigen Tags waren C-terminal angefügt worden)

3.1.6. Oligonukleotid-Primer

Für die reverse Transkription mittels M-MLV-Reverse Transkriptase (Promega) wurden Oligo(dT)15-Primer von Promega verwendet. Die Herstellung aller weiteren Oligonukleotid-Primer erfolgte durch die BioTeZ GmbH (Berlin-Buch). Die Designer der Primer sind in Tab. 3.6 angegeben.

Tabelle 3.6: Liste der genutzten Oligonukleotid-Primer (s. = sense, as. = antisense)

Bezeichnung	Sequenz (5'–3')	Quelle
GAPDH-fw (s.)	CCACTCCTCCACCTTTGAC	Raynes <i>et. al.</i> ²⁶⁷
GAPDH-rev (as.)	ACCCTGTTGCTGTAGCCA	
B2M-fw (s.)	ACTGAATTCACCCCACTGA	Dr. F. Welzel (AG Krobitch) ²⁶⁸
B2M-rev (as.)	CCTCCATGATGCTGCTTACA	
CNOT7-fw (s.)	ATGCCAGCGGCAACTGTAG	Harvard Primerbank (ID 85067506c1) ²⁶⁹
CNOT7-rev (as.)	TCGGTGTCCATAGCAACGTAA	
CNOT8-fw (s.)	CTGCGGTGCAATGTTGACC	Harvard Primerbank (ID 31542314c2) ²⁶⁹
CNOT8-rev (as.)	GATTCCAGAAGGATACTCTCCCT	
Ataxin-2-fw (s.)	ATCAGTTGTTGGCTCCAAATGT	Dr. F. Welzel (AG Krobitch) ²⁷⁰
Ataxin-2-rev (as.)	CGGCATCAAGTACCAAATCACA	
TDP-43-fw (s.)	CCGAACAGGACCTGAAAGAG	Dr. C. Kähler (AG Krobitch)
TDP-43-rev (as.)	AAAGCCAAACCCCTTTGAAT	
DeltaValid-fw (s.)*	GATGTCCACGAGGTCTCT	<i>Saccharomyces Genome Deletion Project</i> ²⁷¹
DeltaValid-rev (as.)*	CGGTGTCGGTCTCGTAG	
DeltaValid Seq-fw (s.)*	CTCGACATCATCTGCCCAGA	
DeltaValid-Seq-rev (as.)*	GTCTGCAGCGAGGAGCCGTA	

*Primer zur Validierung von Hefe-Deletionsbankstämmen s. Abs. 3.2.2. & 3.2.5.2.. Alle weiteren Primer waren analytische qRT-PCR-Primer

3.1.7. Antikörper

Tabelle 3.7: Übersicht verwendeter Primär-Antikörper (IB = Immunoblot, IF = Immunfluoreszenz)

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung IB	Verdünnung IF	Quelle
m-α-Tubulin-β	Maus	/	1:200	Sigma-Aldrich
rb-α-GRP94	Kaninchen	/	1:200	Abcam
rb-α-DDX6	Kaninchen	/	1:300	Novus Bio.
m-α-DCP1	Maus	/	1:400	Sigma-Aldrich
m-α-TIAR	Maus	/	1:200	BD
rb-α-TDP-43	Kaninchen	/	1:200	Proteintech
m-α-Myc	Maus	/	1:500	Millipore
rb-α-Myc	Kaninchen	/	1:500	Sigma-Aldrich
rb-α-CNOT7	Kaninchen	1:500	/	Sigma-Aldrich
rb-α-CNOT8	Kaninchen	1:100	/	S. Winkler (University of Nottingham)
rb-α-CNOT6	Kaninchen	1:100	/	S. Winkler (University of Nottingham)
rb-α-CNOT6L	Kaninchen	1:100	/	S. Winkler (University of Nottingham)
m-α-GAPDH	Maus	1:10.000	/	Applied Biosystems

Tabelle 3.8: Übersicht verwendeter, konjugierter Sekundär-Antikörper (HRP = *horse radish peroxidase*)

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung IB	Verdünnung IF	Quelle
AlexaFluor®488 gt- α -m-IgG	Ziege	/	1:1000	Thermo-Fisher
AlexaFluor®594 gt- α -m-IgG	Ziege	/	1:1000	Thermo-Fisher
gt- α -m-IgG-HRP	Ziege	1:10.000	/	Sigma-Aldrich
gt- α -rb-IgG-HRP	Ziege	1:10.000	/	Sigma-Aldrich

3.1.8. Software

Alle genutzten internetbasierten Anwendungen sowie Datenbanken werden in den entsprechenden Teilen von Abs. 3.2., Abs. 4. und Abs. 5. vorgestellt. Eine Liste der verwendeten fest installierten Software zeigt Tab. 3.9.

Tabelle 3.9: Fest installierte Rechnerprogramme

Bezeichnung (Version)	Anwendung	Hersteller/Entwickler
Word (14.0.5128.5000)	Textverarbeitung	Microsoft
Excel (14.0.5128.5000)	Tabellenkalkulation	Microsoft
Illustrator (14.0.0)	Bildpräsentation	Adobe
Photoshop (11.0)	Bildbearbeitung	Adobe
ImageJ (1.45s)	Zellzählungen für quantitative Mikroskopie	Wayne Rasband (Open Source)

3.2. Methoden

3.2.1. Bioanalytische Methoden

3.2.1.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von via Kit isolierter Plasmid-DNA (pDNA), aufgereinigten PCR-Amplikons und mRNA (s.u.) wurden mittels eines Nano-Drop™-UV/VIS-Spektralphotometers bestimmt. Damit wurden die UV-Lichtabsorptionen bei $\lambda = 260\text{nm}$ von je $1\ \mu\text{l}$ der Nukleinsäurelösung sowie einer Blindprobe gemessen, aus deren Verhältnis schließlich die Nukleinsäurekonzentration berechnet wurde.

3.2.1.2. Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford (für Immunoblots & MS-Analysen)

Die Protein-Konzentrationsbestimmungen in Hefe- oder Säugerzelllysaten wurden nach der Bradford-Methode mit Hilfe einer gebrauchsfertigen Proteinfärbelösung durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Bindung eines braunen Farbstoffs an Proteine und der damit einhergehenden Bildung blauer Protein-Farbstoff-Komplexe deren Lichtabsorption bei $\lambda = 595\ \text{nm}$ (A_{595}) photometrisch gemessen und auf die einer Blindprobe bezogen wird. Auf diese Weise war ferner anhand einer BSA-Standardreihe ein Faktor von 5,21 zur Berechnung der Proteinkonzentration (in mg/ml) aus den Absorptionswerten ermittelt worden. Für die Protein-Konzentrationsbestimmungen der Lysate wurden schließlich zu $800\ \mu\text{l}$ in Küvetten vorgelegtem PBS weitere $200\ \mu\text{l}$ Proteinfärbelösung pipettiert, gefolgt von $5\ \mu\text{l}$ Probe bzw. Lysepuffer im Fall der Blindproben. Die verschlossenen Küvetten wurden daraufhin invertiert, die Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend wurden die A_{595} -Werte der Proben gemessen.

3.2.1.3. HPLC-Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Für die MS-Analysen wurden zunächst je 2ml YPD/Glc-Flüssigmedium mit Einzelklonen des WT-Hefestamms BY4741 oder der Deletionsstämme $\Delta\text{PBP1-DB}$ bzw. $\Delta\text{PBP1-sm}$ inokuliert und diese Zellsuspensionen über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurde die OD_{600} der Kulturen gemessen, um aus ihnen anschließend Hauptkulturen mit einer OD_{600} von 0,2 herzustellen, wozu entsprechende Kulturvolumina in je 300 ml YPD/Glc-Flüssigmedium verdünnt wurden. Die Hauptkulturen wurden anschließend bei 30°C schüttelnd inkubiert, bis sie eine OD_{600} von 0,6 – 0,8 erreicht hatten. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert, lysiert (s. dazu Abs. 3.2.5.2.) und anschließend wurde die Proteinkonzentration der Lysate mittels Bradford-Test (s. v. Abs.) bestimmt.

Die Proben wurden schließlich zur weiteren Aufbereitung und massenspektrometrischen Analyse an die MS-Service-Einrichtung des Max-Planck-Instituts übergeben. Dort wurden für die MS-Analyse Lysat-Aliquots mit äquivalenten Proteinnengen zunächst mittels Dithiothreitol reduziert, daraufhin mit Chlorazetamid alkyliert und schließlich tryptisch verdaut. Der enzymatische Verdau erfolgte dabei über Nacht in einer 1,5 M Harnstoff-Lösung in 50 mM Tris, (pH 8.0) bei einem Enzym-Protein Verhältnis von 1:50. Dieselbe Enzymmenge wurde am Folgetag nochmals hinzugegeben und der Verdau eine weitere Stunde fortgeführt, woraufhin er durch Zugabe von 100 % Ameisensäure gestoppt und die Ansätze mittels C18-Pipettenspitzen (Pierce) entsalzt wurden. Die Eluate wurden daraufhin vakuumgetrocknet und in 5 % Acetonitril/ 2 % Ameisensäure wieder gelöst.

Nach diesen Vorbereitungen folgte die MS-Analyse, wobei ein „Nanoflow“ Reversed-Phase Flüssigkeits-Chromatographie (LC)-System (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific, USA) online gekoppelt an ein „Q-Exactive Plus Orbitrap“ Massenspektrometer (Thermo Scientific) genutzt wurde. Die LC wurde dabei mittels analytischer PicoFrit-Säulen (75 µm Innendurchmesser × 25 cm Länge, Innendurchmesser Spitze: 15 µm (New Objectives, Woburn, MA, USA)) durchgeführt die vor Ort mit 3 µm C18 Resin (Reprosil-AQ Pur) gepackt wurden. Die Peptide wurden anschließend über 192 min bei einer Fließrate von 266 nl/min in einem Gradienten von 3,8 – 98 % des Lösungsmittels B eluiert (Lösungsmittel A: 0,1 % Ameisensäure; Lösungsmittel B: 80% Acetonitril & 0,08 % Ameisensäure). Die Erzeugung des Nano-Elektrosprays für die MS-Analyse erfolgte daraufhin bei 3 kV. Dabei folgten jedem Zyklus eines vollständigen FT-Scan-Massenspektrums (300 – 1700 m/z, Auflösung von 35000 bei m/z = 200) zwölf datenabhängige MS/MS-Scans mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 25 eV. Die MS-Rohdaten wurden schließlich mittels der Software MaxQuant (Version 1.5.0.0) verarbeitet, wobei das dort integrierte MaxLFQ-Werkzeug für labelfreie Quantifizierungen genutzt wurde.^{272,273}

3.2.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1. Hefe-Plasmidtransformationen (für Tropftests und Fluoreszenzmikroskopie)

Für die Transformationsansätze wurde zunächst von jedem Hefestamm eine 2ml Suspensionskulturen in YPD/Glc-Flüssigmedium hergestellt. Dafür wurden die bei 4°C gelagerten, auf YPD/Glc-Festmedium angewachsenen Hefezellen mit einer 10 µl Impfschlinge in 15 ml Zentrifugationsröhrchen mit 3 ml Vollmedium überführt. Die Kulturen wurden daraufhin über Nacht bei 30°C geschüttelt.

Am nächsten Tag wurden diese Übernachtskulturen mit sterilem, YPD/Glc-Medium auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,4 eingestellt, und in Erlenmeyerkolben weitere 4 – 5 h bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Suspensionen in 50ml Zentrifugationsröhrchen überführt, und die Zellen bei 2800 Umin⁻¹ für 8 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin mit 10 ml 1x TE-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert (s. o.). Danach wurde es in 1 ml Hefetransformations-Mix 1 resuspendiert und darin für 10 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen die Transformationsansätze vorbereitet. Dazu wurden je 230 µl Mix 2 vorgelegt und 5 µl Heringssperma-DNA dazugegeben. Schließlich wurden je nach Konzentration 0,5 µl oder 1 µl pDNA (≈ 300 – 600 ng) hinzugefügt. Für Ko-Expressions-Analysen wurde dem Ansatz an dieser Stelle zusätzlich 0,5 µl oder 1 µl einer zweiten pDNA hinzugefügt. Nach der Inkubation wurde 40 µl der Mix 1-Suspension in die Mix 2-Ansätze überführt und beide gründlich vermischt. Darauf folgte eine halbstündige Inkubation der Transformationsansätze im Schüttelinkubator bei 30°C.

Anschließend wurden 30 µl DMSO zu den Ansätzen gegeben und diese erneut gut gemischt, woraufhin sie für 7 min im 42°C warmen Wasserbad schwimmend einem Hitzeschock ausgesetzt wurden. Nach der Inkubation wurden die Hefezellen abzentrifugiert (5000 Umin⁻¹, 5 min), mit je 1 ml *Aqua bidest.* gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 40 – 50 µl *Aqua bidest.* resuspendiert, und die Hälfte der Suspension auf zuvor präparierte Selektionsagarplatten aufgebracht. Dabei handelte es sich je nach transformiertem Plasmid-Auxotrophiemarker um Histidin- oder Uracil-Mangelagar. Bei Kotransformationen fehlten dem Agar entsprechend beide Stoffe. Der Transformationsansatz wurde schließlich mit Glasperlen auf dem Festmedium verteilt und trocknen lassen. Die verschlossenen Platten wurden abschließend kopfüber im Brutschrank für zwei bis vier Nächte (je nach Wachstum) bei 30°C inkubiert.

Zur Anreicherung von Zellmaterial für nachfolgende Experimente wurden außerdem Einzelklone mit sterilen Pipettenspitzen aufgelesen und auf frischen Selektionsagarplatten neu ausgestrichen, woraufhin sie wie zuvor inkubiert wurden. Diese Platten wurden zudem bei 4°C für maximal 4 Wochen gelagert.

3.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (für Deletionsstamm-Validierung)

Die hier genutzten Euroscarf-Deletionsbankstämme trugen alle spezifische DNA-Sequenz-Tags stromaufwärts und stromabwärts des jeweils, deletierten Gens (UP- und DOWN-Tag), wodurch sie eindeutig identifizierbar waren. Diese Tags zu amplifizieren war Zweck der hier beschriebenen PCR. Die PCR-Ansätze waren dabei folgendermaßen zusammengesetzt: 3 µl Hefezelllysate mit genomischer DNA (s. Abs. 3.2.5.2.), je 5 pmol Sense- und Antisense-Primer (d. h. je 0,5 µl einer 10 µM-Stammlösung), 0,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 0,75 µl MgCl₂ (50 mM) sowie 2,5 µl 10-fach Taq-PCR-Puffer und 0,1 µl Taq-Polymerase. Diese Ansätze wurden schließlich mit *Aqua bidest.* auf 25 µl aufgefüllt, gemischt und für die enzymatische Kettenreaktion in einen vorgeheizten Thermocycler gestellt. Dabei wurden die Proben im Eisbad angesetzt und bis zum PCR-Start dort belassen. Für die anschließende Amplifikation wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

- 1) 94°C für 2 min
- 2) 94°C für 15 s
- 3) 55°C für 15 s
- 4) 72°C für 30 s
- 5) Wiederholung der Schritte 2 – 4 (35mal)
- 6) 72°C für 10 min
- 7) Abkühlung auf 4°C (bis zur Entnahme)

So sollte im Optimalfall für jeden Stamm ein ca. 1,5 kbp großes Amplikon produziert werden, das sowohl die UP- als auch DOWN-Tag-Sequenz enthält, was mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft wurde (s. n. Abs.)

3.2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese (für Deletionsstamm-Validierung)

Für die Agarose-Gelelektrophoresen wurden horizontale 2 % (w/v) Agarose/TAE-Puffer-Gele gegossen, die zudem 0,5 g/ml Ethidiumbromid zur DNA-Detektion enthielten. Die zu untersuchenden PCR-Proben wurden dabei zunächst mit 6-fach Agarose-Gelelektrophorese-Ladepuffer im Verhältnis 5:1 gemischt und auf die Gele geladen. Der Gellauf fand dann bei 60 V in TAE-Puffer statt. Zum Größenabgleich der Amplikons wurde der Quickload[®]-1kb-DNA-Standard verwendet. Positiv getestete Proben wurden anschließend für die Sequenzierung weiter aufgearbeitet (s. n. Abs.)

3.2.2.4. Sequenzierung von PCR-Amplikons zur Deletionsstamm-Validierung

Die Sequenzierungen von PCR-amplifizierten UP- und DOWN-Tag-Sequenzen, die aus genomischer DNA von Hefe-Deletionsstämmen gewonnen wurden (s. Abs. 3.2.2.2.), wurden durch die Firma Eurofins durchgeführt. Dazu mussten die PCR-Produkte jedoch zunächst aufgereinigt werden, wozu das „Wizard[®]-SV-PCR-cleanup system“-Kit genutzt wurde. Dieses basiert auf DNA-Adsorption an Silika-Säulen die in 1,5 oder 2 ml-Reaktionsgefäßen zentrifugierbar sind. Die Aufreinigung der Amplikon-DNA wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt, und die DNA dabei in je 40 µl nukleasefreiem *Aqua bidest.* eluiert. Daraufhin

wurde die DNA-Konzentration der Proben bestimmt, und es wurde mit nukleasefreiem Wasser eine 10 ng/ μ l DNA-Lösung in einem Gesamtvolumen von 15 μ l hergestellt. Zu dieser wurden ferner zwei Sequenzierungs-Primer (DeltaValid Seq-fw & DeltaValid Seq-rev) gegeben, so dass deren Konzentration 2 pmol/ μ l betrug. So präpariert wurden die Proben schließlich zum Sequenzieren verschickt. Die Übereinstimmung der Tag-Sequenzen wurde nach der Sequenzierung mit Hilfe einer entsprechenden Tabelle von Euroscarf überprüft.

3.2.2.5. Plasmidtransfektionen in HeLa-Zellen (für IF-Mikroskopie)

Um HeLa-Zellen mit rekombinanten Expressionsplasmiden zu transfizieren wurde das Attractene-Reagenz entsprechend den Herstellerangaben angewendet, wobei die Transfektionen in 24-Kammer-Zellkulturplatten durchgeführt wurden. Alle Reagenzien und Plasmidlösungen wurden bis zu ihrer Verwendung im Eisbad gekühlt. Da die behandelten Zellen später mikroskopiert werden sollten, wurden die Transformationen auf sterilen Mikroskopie-Deckgläsern durchgeführt, die auf dem Kammerboden positioniert worden waren. Auf diese Gläschen wurden pro Kammer 4×10^4 Zellen ausgesät, denen über Nacht Zeit gegeben wurde sich zu setzen. Daraufhin wurde am nächsten Tag für die Transfektions-Mastermixe hergestellt, wobei ein einfacher 24-Kammer-Ansatz dabei folgende Zusammensetzung hatte: 60 μ l DMEM (ohne FBS oder P/S) plus 0,4 μ g pDNA plus 1,5 μ l Attractene. Der Mastermix wurde daraufhin gevortext und für 20 – 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die zuvor gesäten Zellen mit PBS gespült und danach mit 500 μ l neuem DMEM-Vollmedium bedeckt. Schließlich wurde der Mastermix in entsprechenden Aliquots tropfenweise auf die Kammern verteilt, und die Zellen für 4 – 5 h bei 37°C inkubiert. Um toxische Wirkungen des Transfektionsreagenz gering zu halten, fand daraufhin ein Mediumwechsel zu frischem DMEM-Vollmedium statt. Nach insgesamt 24 h transienter Plasmidexpression bei 37°C wurden die Zellen schließlich für die Mikroskopie aufgearbeitet.

3.2.2.6. Transfektionen mit siRNA in HeLa-Zellen (für Immunoblots, qRT-PCR & IF-Mikroskopie)

Die siRNA-Transfektionen wurden mit dem Lipofectamine™ RNAiMAX-Reagenz nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieses wurde wie auch die siRNAs bis zur Verwendung im Eisbad gekühlt. Für die Transfektionen wurden sowohl 24- als auch 12-Kammer-Zellkulturplatten genutzt. Im Fall der 24-Kammer-Ansätze (für IF-Mikroskopie) wurden am Tag vor der Transfektion je Kammer 2×10^4 Zellen auf Deckgläschen (s. Plasmidtransfektionen) ausgesät. Pro 12-Kammer-Ansatz (für Immunoblot und qRT-PCR) wurden hingegen 4×10^4 Zellen direkt auf den Kammerboden ausgesät. Am nächsten Tag wurden daraufhin zunächst Transfektions-Mastermixe hergestellt, wobei jeder 24-Kammer-Einzelansatz wie folgt zusammengesetzt war: 60 μ l antibiotikafreies DMEM (ohne FBS) plus 12 pmol siRNA plus 1,5 μ l RNAiMAX. Für jeden 12-Kammer-Einzelansatz wurden dieselben Komponenten in doppelter Menge verwendet. Die Mastermixe wurden schließlich gevortext und für 20 – 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden entsprechende Aliquots tropfenweise auf die Zellen gegeben, deren Medium zuvor auf antibiotikafreies DMEM/ FBS umgestellt worden war. Dabei war für 12-Kammeransätze 1 ml und für 24-Kammeransätze 500 μ l Medium verwendet worden. Der siRNA-Knockdown (Kd) erfolgte dann über 72 h im Inkubator bei 37°C. Nach der Inkubation wurde im Fall der qRT-PCR- und Immunoblot-Proben (12-Kammeransätze) das Zellmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült. Die Platten wurden anschließend, bevor sie lysiert wurden, über Nacht bei -80°C tiefgekühlt, um die Integrität der Zellen zu zerstören. Die Proben für die IF-Mikroskopie (24-Kammeransätze) wurden hingegen nach Absaugen des Mediums direkt für die Mikroskopie vorbereitet (s. Abs. 3.2.6.5.)

3.2.2.7. RNA-Aufreinigung aus HeLa-Zellen (für qRT-PCR)

Zur mRNA-Isolation aus HeLa-Zellen wurde das „RNeasy Mini“-Kit verwendet, das auf selektiver mRNA-Bindung an Silikamembransäulen beruht, die in 1,5 oder 2 ml Reaktionsgefäßen zentrifugierbar sind. Um dabei RNase-Kontaminationen der Umgebung zu minimieren wurde der Arbeitsplatz vor jeder Aufreinigung mit RNase-Dekontaminationsmittel gesäubert.

Die RNA-Extraktion erfolgte ferner gemäß den Empfehlungen des Kit-Herstellers, wobei die zuvor in 12-Kammer-Zellkulturplatten angesetzten und bei -80°C tiefgekühlten Zellproben (s. v. Abs.) mittels einer 1 ml-Spritze mit 0,9 mm-Kanüle lysiert wurden. Dabei wurde 350 µl Lysepuffer direkt in die Plattenkammern gegeben, und dieser mit den Zellen mehrfach durch die Spritzenkanüle gepresst. Außerdem wurde bei jeder Aufreinigung ein im Kit-Handbuch als optional aufgeführter DNase-Verdau durchgeführt. Zudem wurde stets ein optionaler einminütiger Zentrifugationsschritt zwischen letztem Waschschritt und Elution in die Prozedur eingebaut, um durch eine trockenere Säule höhere mRNA-Ausbeuten zu erzielen. Die mRNA wurde dann in 40 µl DEPC-Wasser eluiert, und ihre Konzentration an einem Spektralphotometer gemessen (s. Abs. 3.2.1.1.). Die Lagerung der RNA-Eluat erfolgte anschließend bei -80°C.

3.2.2.8. Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR-Untersuchungen musste zunächst aus HeLa-Zellen isolierte mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die dafür notwendigen Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt, und es ging ihnen stets eine RNase-Dekontamination des Arbeitsplatzes voraus.

Für die Erststrang-cDNA-Synthese wurde hier M-MLV-Reverse Transkriptase nach Herstellerangaben verwendet. Für die Synthese von 1 µg cDNA wurde entsprechend je 1 µg mRNA-Eluat in 9,5 µl DEPC-Wasser verdünnt und 0,5 µl Oligo(dT)15-Primer hinzugefügt. Der Ansatz wurde anschließend zum Primer-Annealing für 5 min bei 70°C in einen Thermocycler gestellt. Danach wurden 5 µl des 5-fachen M-MLV-Puffers sowie 0,5 µl einer 10 mM dNTP-Lösung und 9,4 µl DEPC-Wasser hinzugefügt. Als letztes wurde in jeden Ansatz 0,1 µl Enzym gegeben. Für die cDNA-Synthese wurden die Ansätze daraufhin 1 h lang im Thermocycler bei 42°C gehalten, gefolgt von 10 min bei 65°C zur Inaktivierung der Transkriptase. Die cDNA-Proben wurden schließlich bei Bedarf über eine Nacht bei -20°C gelagert oder direkt für die quantitative PCR vorbereitet.

Die Proben für die quantitative PCR wurden daraufhin in 384-Kammer-Mikrotiterplatten angesetzt, wobei alle dafür benötigten Komponenten auf Eis gekühlt wurden. Für die PCR-Reaktion wurde der „SYBR[®]-Green-Mastermix“ verwendet. Dieser beinhaltet den mit DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]-Green, der in Form von DNA-Farbstoff-Komplexen Licht ($\lambda=561$ nm) emittiert, und so die Amplikon-Detektion ermöglicht. Um unspezifisches Primer-Annealing zu vermeiden, wurden die Ansätze jedoch nicht direkt in die Mikrotiterplatten pipettiert, sondern es wurden zunächst separate cDNA- und Primer-PCR-Mastermixe mit SYBR[®]-Green hergestellt, die schließlich in den Plattenkammern gemischt wurden. Jeder Einzelansatz enthielt dabei letztendlich 5 µl DEPC-Wasser, 2,5 µl SYBR[®]-Green-Mastermix, 2 µl revers transkribierte cDNA (≈ 40 ng) und je 0,5 µl zweier analytischer qRT-PCR-Primer (Sense und Antisense), deren Stoffmenge damit bei 2,5 pmol lag. Die verwendeten analytischen Primer (s. Abs. 3.1.6.) waren dabei bereits zuvor von Dr. F. Welzel (AG Krobtsch) via qPCR-Dissoziationskurven-Analyse von cDNA-Verdünnungsreihen hinsichtlich ihrer Spezifität validiert worden. Die Platten wurden schließlich mit durchsichtiger Schutzfolie bedeckt, und die

Messungen daraufhin unter Nutzung des „Applied Biosystems™ 7900HT Fast Real-Time-PCR-Systems“ durchgeführt, wobei folgendes Programm genutzt wurde:

- 1) 50°C für 2 min
- 2) 95°C für 10 min
- 3) 95°C für 15 sec
- 4) 60°C für 30 sec
- 5) Wiederholung der Schritte 3 & 4 (40 mal)
- 6) Abkühlung auf 4°C (bis zur Entnahme)

Prinzipiell wurden dabei immer drei technische Replikate für jede Primer-Paar/ cDNA-Kombination gemessen, und der Mittelwert daraus für die Auswertung verwendet.

3.2.3. Biotechnologische Methoden

3.2.3.1. Bakterien-Plasmidtransformationen (für pDNA-Präparationen)

Die Transformationen wurden unter semi-sterilen Bedingungen in der Nähe einer Brennerflamme und an einem zuvor mit 70 % Ethanol desinfizierten Arbeitsplatz durchgeführt. Die genutzten Bakterien waren chemokompetente *e.coli* vom Stamm XL-1 Blue, die bei -80°C in 50 µl Aliquots gelagert worden waren. Plasmidlösungen und Bakterienstammkulturen wurden bis zu ihrer Verwendung im Eisbad gekühlt.

Diese Aliquots wurden für die Transformation getaut, und 0,5 µl Plasmidlösung ($\approx 100 - 500$ ng pDNA entsprechend) wurden hinzugefügt. Diese Ansätze wurden daraufhin gemischt und für 20 – 30 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt, woraufhin sie in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurden, in denen je 800 µl von auf 37°C erwärmtem LB-Medium vorgelegt worden waren. Die verdünnten Ansätze wurden danach für eine halbe Stunde bei 37°C in einen Thermomixer mit 600 Umin^{-1} gemischt. Schließlich wurden davon 50 µl auf LB_{Amp}-Selektionsagarplatten pipettiert und mit Glasperlen verteilt. Nachdem das Medium getrocknet war, wurden die Platten über eine Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden ferner mittels Pipettenspitzen einzelne Transformanden in LB_{Amp}-Flüssigmedium inokuliert, und dienten so als Ausgangsmaterial für die folgenden pDNA-Präparationen (s. n. Abs.).

Für die Langzeitlagerung transformierter Plasmide wurden Einzelklone der Transformationen in 2 ml Selektionsmedium inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator gemischt. Die Suspensionskultur wurde dann am Folgetag 1:1 mit Glycerollösung (50 %) in 2 ml-Kryo-Gefäßen gemischt und schließlich bei -80°C im Tiefkühlschrank gelagert.

3.2.3.2. Plasmid-DNA-Präparationen aus Bakterien

Die Isolation von pDNA aus Bakterien-Transformanden erfolgte im Fall der Säuger-Expressionsplasmide im Kleinformat mit dem „GeneJET Plasmid Extraction Miniprep“-Kit. Dieses basiert prinzipiell auf DNA-Adsorption an Silikamembransäulen, die auf 1,5 und 2 ml-Reaktionsgefäße zugeschnitten sind, in denen die Säulen zentrifugiert werden können. Das erlaubt hohe Durchlaufgeschwindigkeiten von Lysaten, Puffern und Eluaten und verkürzt so den Zeitaufwand der pDNA-Isolierung.

Für diese Plasmidisolierungen wurden jeweils Suspensionskulturen der Transformanden in 3 ml LB_{Amp}-Flüssigmedium angesetzt die über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert wurden. Die Transformanden wurden

dabei entweder als einzelne Kolonie von einer Transformationsplatte übertragen, oder von der angetauten Oberfläche einer tiefgekühlten Transformandenkultur abgenommen (s. v. Abs.). Die Isolation erfolgte dann gemäß Herstellerprotokoll, wobei die Säulen stets mit 12000 Umin^{-1} zentrifugiert wurden. Die Elution wurde schließlich mit $40 \mu\text{l}$ Nuklease-freiem *Aqua bidest.* durchgeführt.

Die Hefe-Expressionsplasmide wurden andererseits im mittelgroßen Format mit Hilfe des „Nucleobond®-Xtra-Midi“-Kits extrahiert, das auf Anionenaustausch-Säulenchromatografie basiert. Dafür wurden wie oben beschrieben Übernachtskulturen angesetzt die hier jedoch entsprechend größer waren. So wurden die Transformandenklone in je 100 ml LB_{Amp} -Flüssigmedium inokuliert, und in Erlenmeyerkolben schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellsuspensionen daraufhin in je zwei 50 ml Zentrifugationsröhrchen abzentrifugiert ($6000\times g$, 10 min , 4°C) und die Zellpellets nach Resuspension vereint. Der komplette Ansatz wurde anschließend der pDNA-Isolation gemäß dem Herstellerprotokoll unterzogen. Schließlich wurde die DNA in $300 \mu\text{l}$ nukleasefreiem *Aqua bidest.* rekonstituiert. Alle pDNA-Präparationen wurden bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert.

3.2.4. Biochemische Methoden

3.2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (für Immunoblots)

Zur Auftrennung von Proteinen aus Lysaten von HeLa-Zellen wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet, die in vertikalen Mini-PROTEAN® Gelkammern durchgeführt wurde. Für die Elektrophorese der Einzel-Kd-Proben von CNOT6, CNOT6L, CNOT7 und CNOT8 wurden zunächst 12% Acrylamid enthaltende Trenngele gegossen, und diese nach ihrer Auspolymerisierung mit 5% Acrylamid-Sammelgelen überschichtet. Ferner wurde während der Gelpolymerisierung 5-fach Lämmli-Ladepuffer in den Proteinlysaten auf einfache Konzentration verdünnt und diese Verdünnungen zur Protein-Denaturierung für 5 min bei 95°C erhitzt. Dabei waren die Lysatvolumina in Abhängigkeit von ihrer Proteinkonzentration so gewählt, dass jede Probe äquivalente Proteinmengen von $25 \mu\text{g}$ Protein enthielt.

Die Gele wurden schließlich mit den Lämmli-puffer-Lysaten bzw. $5 \mu\text{l}$ einer Molekulargewichtsstandardlösung (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder) beladen, und die Gelkammern mit SDS-PAGE-Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese lief daraufhin zunächst bei einer Spannung von 80 V bis eine Anreicherung der Proben an der Trenngel/ Sammelgel-Grenze zu erkennen war. Danach wurde die Spannung je nach Gelkammer auf $120\text{-}180\text{V}$ erhöht. Die Stromstärke blieb dabei stets konstant.

3.2.4.2. Immunoblotting und ECL-Detektion

Zum Blotten der via SDS-PAGE aufgetrennten Proteinlysate von CNOT6, CNOT6L, CNOT7- und CNOT8-Kd-Ansätzen wurde hier eine „Trans-Blot® SD“-Blotkammer für halbtrockenes Blotting genutzt. Alle Arbeitsschritte wurden ferner, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Vorbereitung auf die Elektrophorese wurden zunächst, auf Gelgröße zugeschnittene Whatman-Papierstücke sowie die PVDF-Blotmembran in Immunoblot-Transferpuffer für mindestens eine halbe Stunde equilibriert, wobei die Membran zuvor für $10\text{--}20 \text{ s}$ in Methanol ($99,8 \%$) aktiviert worden war. Diese wurden im Anschluss an die SDS-PAGE zusammen mit dem Proteingel auf der Anode der Apparatur in folgender Reihenfolge gestapelt: 1) zwei Whatmanpapier-Zuschnitte, 2) PVDF-Membran, 3) das an den Rändern beschnittene Gel und 4) erneut zwei Whatman-Papiere. Darauf wurde der Apparaturdeckel (mit Kathode) gelegt und die vertikale Elektrophorese

gestartet, die eine Stunde dauerte, und bei einer Stromstärke von 0,15 A pro Blotstapel (ca. 8×9 cm Fläche) und mit einer Maximalspannung von 22 V ablief. Im Anschluss daran wurden die Blots über Nacht in Blockierpuffer bei 4°C geschwenkt, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren.

Am folgenden Tag wurden die Blots daraufhin mit Primärantikörper-Lösungen für 1 h in Antikörperpuffer und in Zentrifugationsröhrchen rollend inkubiert. Für die Validierung des Kd der CNOT-Proteine wurden dabei folgende Antikörper eingesetzt: rb- α -CNOT6, -CNOT6L, -CNOT8, -CNOT7 und m- α -GAPDH. Die Färbung des Haushaltsproteins GAPDH diente hier zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung des Gels (Ladekontrolle). Die Verdünnungsverhältnisse der dabei eingesetzten Antikörper können Tab. 3.7 entnommen werden. Daraufhin folgten drei Waschschrte mit TBST, wobei die Blotmembranen je 10 min im Puffer schwenkten. Anschließend wurden die Membranen mit Sekundärantikörper-Lösungen in Blot-Antikörperpuffer für eine weitere Stunde inkubiert, wobei die aus Ziegen gewonnenen, gegen Maus- bzw.- Kaninchen-IgG-gerichteten Sekundärantikörper an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt waren, was Bedingung für die abschließende Chemilumineszenz-Detektion war (s.u.). Nach dieser Inkubation wurden die Membranen erneut dreimal wie o. g. gewaschen. Anschließend wurden die adsorbierten Protein/Antikörperkomplexe mit Hilfe des „Western-Lightning[®]-Plus ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Substrate“-Reagenz detektiert. Die Grundlage dieses Detektionsverfahrens ist dabei die Emission von Licht ($\lambda = 425 \text{ nm}$), verursacht durch die enzymatische Reaktion der antikörpergekoppelten Peroxidase mit dem ECL-Substrat, die mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Zu diesem Zweck wurden die PVDF-Membranen deshalb mit einer 1:1 ECL-Substrat/ECL-Verstärkerreagenz-Mischung für 1 – 2 min inkubiert und daraufhin im Dunklen in Entwicklerkassetten unter einem Röntgenfilm platziert. Nach Inkubationszeiten von einer Minute bis mehreren Stunden wurden die Filme schließlich automatisiert entwickelt.

3.2.5. Zellbiologische Methoden

3.2.5.1. Kultivierung von Hefezellen

Alle Hefe-Arbeiten wurden an einer sterilen Sicherheitswerkbank und, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Zu Beginn der Arbeiten wurde der Arbeitsplatz zudem stets mit 70 % Ethanol desinfiziert. Alle genutzten Hefestämme waren für die Langzeitlagerung als 15 % Glycerol enthaltende Suspensionskulturen bei -80°C gekühlt worden. Diese wurden, falls benötigt, kurz angetaut und mit einer 10 μl Impfschlinge auf YPD/ Glc-Festmediumplatten ausgestrichen. Nach einer Wachstumsphase im Inkubator bei 30°C über 2 – 3 Nächte wurden die Agarplatten bei 4°C für maximal 12 Wochen gelagert, bzw. es wurden von ihnen bei Bedarf Einzelklone entnommen, um diese für folgende Experimente in Suspensionskultur zu überführen.

3.2.5.2. Hefezellysen (für Deletionsstamm-Validierung und MS)

Zur Lyse der Zellen für die Validierung der Euroscarf-Deletionsbankstämme (s. Abs. 3.2.2.2. – 3.2.2.4) wurde jeweils ein Hefeklon in 20 μl einer 20 mM NaOH-Lösung überführt und für 20 min bei 94°C erhitzt. Die Zelltrümmer wurden daraufhin für 5 min abzentrifugiert (1500 \times g, 4°C). Der Überstand wurde schließlich abgenommen und einer PCR-Reaktion zur Amplifikation von DNA-Sequenz-Tags unterzogen.

Für MS-Analysen wurden die Hefezellen in 8 M Harnstoff enthaltendem MS-Lysepuffer lysiert. Die Lyse wurde zudem auf Eis durchgeführt. Ausgangspunkt waren dabei stets Suspensionskulturen der zu untersuchenden

Hefestämme, die bis auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,6 – 0,8 angewachsen waren (s. Abs. 3.2.1.3.). Diese wurden zunächst bei 3800 Umin⁻¹ für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet zweimal mit 10 ml eiskaltem *Aqua bidest.* gewaschen jeweils gefolgt von einer Zentrifugation nach o. g. Bedingungen. Daraufhin wurde jedes Pellet in 500 µl MS-Lysepuffer resuspendiert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden ca. 200 – 250 µl säuregewaschene Glaskügelchen (d = 425 – 600 µm) gegeben und die Ansätze mittels FastPrep™-24 Zellhomogenisator aufgeschlossen. In diesem wurden die Ansätze fünfmal für je 30 s mit einer Geschwindigkeit von 5 m/s geschüttelt, wobei zwischen den Schüttelschritten für je 40 s pausiert wurde. Schließlich wurden die Ansätze bei 8000 Umin⁻¹ für 5 min zentrifugiert, die Proteinlysate-Überstände daraufhin in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und deren Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Test bestimmt (s. Abs. 3.2.1.2.)

3.2.5.3. Hefewachstumsanalysen (Tropftests)

Zunächst wurden für die Wachstumstests Suspensionskulturen von Einzelklonen der zu untersuchenden Transformanten in 2 ml auxotrophiemarker-kompatiblen, glucosehaltigen Hefe-Selektionsmedium angesetzt, und diese über Nacht bei 30°C geschüttelt. Am Folgetag wurden 100 µl dieser Suspensionen mit 900 µl *Aqua bidest.* in Plastikküvetten pipettiert um deren OD₆₀₀-Werte an einem Spektralphotometer zu bestimmen. Davon ausgehend wurden die Kulturen daraufhin in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen in einem Gesamtvolumen von 1 ml auf eine OD₆₀₀ von 0,6 eingestellt. Daraufhin wurden je 200 µl dieser Ausgangsverdünnungen in die oberste Reihe einer 96-Kammer-Mikrotiterplatte pipettiert, deren restlichen Reihen mit je 150 µl *Aqua bidest.* befüllt wurden. So konnten mittels Mehrkanalpipette durch sukzessives Übertragen und Mischen von je 50 µl Kultur von der ersten bis zur letzten Reihe 1:4 Verdünnungsreihen aller Proben einer Platte simultan erzeugt werden. Diese Platte diente anschließend als Matrize zum Austropfen der Ansätze auf Selektionsagarplatten, wobei via Mehrkanalpipette 5 µl jeder Probe reihenweise auf eine Glucose (Glc) und ein bis zwei Galaktose (Gal) enthaltende Selektionsagarplatten ausgetropft wurden. Die Tropfen wurden daraufhin trocknen gelassen und die Platten über 3 – 4 Nächte bei 30°C inkubiert. Die Galaktose diente dabei zur Expressionsinduktion der GAL1-Promotor gesteuerten, in die Hefezellen transformierten, rekombinanten Vektoren. Auf diese Weise konnte das Wachstum der Transformanten bei eingeschalteter (Gal-Agar) und ausgeschalteter (Glc-Agar) exogener Plasmidexpression direkt verglichen werden.

3.2.5.4. Kultivierung von Säugerzellen (Auftauen, Einfrieren, Passagieren und Aussaat)

Alle Arbeiten in Säugerzellkultur fanden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank statt, die vor Beginn der Arbeiten stets mit 70 % Ethanol gründlich desinfiziert worden war. Alle Arbeitsschritte wurden zudem, soweit nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die verwendeten Medien wurden bei 4°C gelagert und vor jeder Nutzung im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt

Um die als 2 ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren gelagerten HeLa-Zellen in Kultur zu bringen, wurden diese aufgetaut und daraufhin in 10 ml vorgelegtem DMEM-Vollmedium verdünnt. Dabei wurde auf Schnelligkeit geachtet, da das Einfrieremedium 10 % DMSO enthielt, dessen zytotoxische Wirkungen dadurch und durch den Verdünnungsschritt minimiert werden sollten. Die in 15 ml-Zentrifugationsröhrchen verdünnten Aliquots wurden dann bei 1000 Umin⁻¹ für 5 min zentrifugiert, und die Zellpellets nach Absaugen des Überstands in 3 ml DMEM-Vollmedium resuspendiert. Je 1 ml davon wurde danach auf eine von drei zuvor mit 19 ml DMEM-Vollmedium befüllten 75cm²-Zellkulturflaschen überführt. Nach kurzem Schwenken zur

gleichmäßigen Verteilung der Zellen in den Flaschen wurden diese schließlich zur Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt (Standardbedingungen) in einem Inkubator platziert. Am nächsten Tag fand dann ein Mediumwechsel zu frischem DMEM-Vollmedium statt, da zu diesem Zeitpunkt oft viele tote Zellen in Suspension vorzufinden waren, die sich nicht negativ auf das Wachstum der vitalen, adhären Zellen auswirken sollten.

Zum Passagieren der Zellen, das bei etwa 60 – 80 % konfluentem Wachstum geschah, wurde zunächst das alte DMEM-Vollmedium abgesaugt, und die Zellen mit PBS-Puffer unter Schwenken gespült. Der Puffer wurde anschließend wieder abgesaugt, und es wurde 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung zum Ablösen der Zellen auf diese pipettiert. Darauf folgte eine 3 – 5 minütige Inkubation bei 37°C, woraufhin die suspendierten Zellen je nach gewünschtem Aufspaltungsverhältnis mit 9 – 14 ml frischem DMEM-Vollmedium verdünnt wurden. Ein variabler Anteil dieser Suspension wurde schließlich in eine (oder mehrere) neue, zuvor mit frischem DMEM-Vollmedium (15 ml) präparierte, Zellkulturflasche(n) pipettiert, so dass Aufspaltungsverhältnisse von 1:25 – 1:50 erreicht wurden. Die Zellen wurden danach durch Schwenken verteilt und bis zur nächsten Passagierung (nach ca. 2 – 4 Tagen) im Brutschrank weiter inkubiert. Im Zuge dieses Prozesses wurden zudem bei Bedarf Zellen für diverse Versuche in 12- oder 24-Kammer-Zellkulturplatten passagiert bzw. ausgesät. Dafür wurde bei der Mediumzugabe zur Trypsin/EDTA-Zellsuspension eine 1:10 Verdünnung (s. o.) hergestellt und 10 µl davon in einer Neubauer-Zellzählkammer gezählt. Davon ausgehend wurde das Volumen der 1:10 Verdünnung, das die je nach Versuchsreihe variable, pro Ansatz benötigte Zellzahl enthielt, berechnet, welches daraufhin in die einzelnen Plattenkammern pipettiert wurde. (s. Abs. 3.2.2.).

Einige Zellen der dem Auftauen folgenden ersten Passage wurden außerdem bei Bedarf erneut eingefroren. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben trypsinisiert und mit DMEM-Vollmedium verdünnt. Daraufhin wurden sie abzentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml DMEM-Einfriermedium (20 % FBS und 10 % DMSO) pro Kryogefäß resuspendiert. Dabei wurde je konfluent bewachsener 75 cm²-Flasche ein Kryo-Ansatz hergestellt. Um die Zellen verlangsamt abkühlen zu lassen wurden sie zunächst für 1 – 3 Tage bei -80°C gelagert und erst daraufhin in flüssigen N₂ verlegt.

3.2.5.5. Lyse von HeLa-Zellen (für Immunoblot)

Zur Herstellung von Proteinlysaten für Immunoblots wurden die in 12-Kammer-Zellkulturplatten, bei -80°C eingefrorenen HeLa-Zellen (s. Abs. 3.2.2.6) zunächst mit 150 µl HeLa-Zellysepuffer bei 4°C schwenkend inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Lysate mit einer Pipette in gekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, wobei durch mehrmaliges auf- und abpipettieren versucht wurde noch unlysierte Zellen aufzuschließen. Die Zelltrümmer wurden daraufhin abzentrifugiert (1 min bei maximaler Geschwindigkeit) und das proteinhaltige Zellysate in ein neues Gefäß überführt. Die so gewonnenen Proteinlysate wurden ferner, falls nicht direkt weiter genutzt, bei -20°C gelagert.

3.2.6. Mikroskopische Analysen

3.2.6.1. Fluoreszenzmikroskopie galaktose-induzierbarer Fusionsproteine in Hefezellen

Die Vorbereitungen aller mikroskopischen Hefe-Analysen fanden, da sie an lebendigen Zellen vorgenommen wurden, unter sterilen Bedingungen und, soweit nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur statt.

Für die Untersuchungen zum Akkumulationsverhalten von Redstar-markierten Ataxin-2-Spaltprodukten und TDP-43-GFP sowie zur Kollokalisierung GFP-markierter Ataxin-2-Spaltprodukte mit Zellkompartiment-Markern wurden galaktose-induzierbare Vektoren benutzt. Daher wurden die zu analysierenden Hefeklonen, die zunächst in 2 ml glucosehaltigem Selektionsflüssigmedium über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert worden waren, danach in galaktosehaltiges Flüssigmedium überführt, was wie folgt verlief.

Die Übernachtskulturen wurden zunächst zentrifugiert (3200 Umin^{-1} , 8 min), das Zellpellet daraufhin in 10 ml *Aqua bidest.* gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Dem folgte ein identischer zweiter Waschschriff, um möglichst viel Glucose auszuwaschen. Daraufhin wurden die Zellpellets in 2 ml galaktosehaltigem Selektionsmedium resuspendiert und die OD_{600} der Suspensionen bestimmt. Anschließend wurden alle Kulturen mit Galaktosemedium auf eine OD_{600} von 0,4 eingestellt, und bei 30°C für 5 – 6 h schüttelnd inkubiert.

Dem folgte gegebenenfalls eine Stressbehandlung (s. Abs. 3.2.6.3). Unabhängig davon jedoch wurden alle Zellen nach der Inkubationszeit erneut wie o. g. zentrifugiert und einmal mit *Aqua bidest.* gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellpellets in 1 ml *Aqua bidest.* resuspendiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Dem folgte eine Zentrifugation bei 5000 Umin^{-1} für 5 min, woraufhin der Überstand bis auf einen Rest von 20-50 μl abgenommen wurde.

In diesem Restüberstand wurden daraufhin einige Zellen direkt am Mikroskop resuspendiert, und wenige Mikroliter davon auf einen Glas-Objektträger übertragen und ein Deckgläschen darauf gelegt. Zur Mikroskopie, wurden schließlich entweder das „Axio Imager Z1“- oder das „Lsm510Meta“-Mikroskop mit entsprechenden Fluoreszenzfiltersets genutzt. Die Bilder wurden schließlich bei 630-facher Vergrößerung unter Verwendung eines $63\times$ Objektivs ($NA=1,4$) aufgenommen.

3.2.6.2. Fluoreszenzmikroskopie nicht-induzierbarer Fusionsproteine in Hefezellen

Die mikroskopischen Untersuchungen der Hefestämme DHH1-GFP und PBPI-GFP sowie jene zur P-Body (PB)- und Stress-Granula (SG)-Bildung in Deletionsstämmen verliefen prinzipiell wie im vorigen Abschnitt beschrieben. Jedoch wurden dabei keine galaktose-induzierbaren Plasmide verwendet. Deshalb wurde in diesen Fällen das Waschen der Übernachtskulturen ausgespart, und sie nach Messung ihrer OD_{600} direkt in Glc-Selektionsmedium auf eine OD_{600} von 0,4 eingestellt. Alle weiteren Schritte entsprachen allerdings der o. g. Vorgehensweise (s. v. Abs.). Zur Stress- und Cycloheximid-Behandlung geben außerdem die folgenden beiden Abschnitte Auskunft.

3.2.6.3. Stressinduktion in Hefezellen

In den mikroskopischen Experimenten zur SG- und PB-Bildung sowie zum Akkumulationsverhalten von Redstar-markierten Ataxin-2-Spaltprodukten in Hefe wurden die Zellen entweder durch einen akuten Hitzeschock oder Natrium-Azid (NaN_3) gestresst.

Dazu wurden jeweils Teile von logarithmisch wachsenden Hefesuspensionskulturen (s. Abs. 3.2.6.1.) abgenommen und Stress ausgesetzt. Im Fall des Hitzeschocks wurden die Zellen dazu für 15 min bei 46°C geschüttelt. Um die Zellen oxidativem Stress auszusetzen wurde eine 30 % NaN_3 -Stammlösung direkt in der Zellsuspension auf eine Endkonzentration von 1 % verdünnt. Diese Suspension wurde anschließend für eine halbe Stunde bei 30°C geschüttelt. Der weitere Verlauf der Experimente ist in Abs. 3.2.6.1. nachzulesen.

3.2.6.4. Cycloheximid-Experimente in den Hefestämmen DHH1- und PBPI-GFP

Für diese Experimente wurden von logarithmisch wachsenden Hefezellsuspension (s. Abs. 3.2.6.1.) je untersuchter Stressbedingung (Hitze oder NaN_3) zwei Aliquots entnommen. Eines dieser Aliquots wurde dann als Kontrollansatz gewählt und mit dem Cycloheximid-Lösungsmittel DMSO versetzt, wobei dieses 1:100 verdünnt wurde. Dies entsprach gleichzeitig dem Verdünnungsverhältnis der 10 mg/ml CHX-Lösung, die im zweiten Aliquot verdünnt wurde, womit sich dafür eine CHX-Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ ergab. Diese Proben wurden ferner Stress ausgesetzt (s. v. Abs.) und wie in Abs. 3.2.6.1. beschrieben für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

3.2.6.5. Immunfluoreszenz-Mikroskopie von HeLa-Zellen

Zur mikroskopischen Analyse von HeLa-Zellen wurden diese wie erwähnt in 24-Kammer-Zellkulturplatten auf Deckgläschen ausgesät, transfiziert (s. Abs. 3.2.2.) und gegebenenfalls Stress ausgesetzt (s. Abs. 3.2.6.6.). Im Anschluss daran wurde zunächst das Medium von den Zellen abgesaugt und diese anschließend für 15 min bei Raumtemperatur in 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert. Darauf folgte eine zehnmünütige Permeabilisierung/Fixierung der Zellen in rund -20°C kaltem Methanol. Danach wurden die Zellen über Nacht bei 4°C in 5 % Immunfluoreszenz (IF)-Blockierpuffer geschwenkt, wodurch zum einen die Zellen zusätzlich permeabilisiert und zum anderen unspezifische Proteinbindungsstellen gesättigt werden sollten.

Daraufhin wurde der Blockierpuffer abgesaugt und die Zellen bei 4°C über Nacht mit Primärantikörper-Lösungen in 1 % BSA/PBS inkubiert. Bei Ko-IF-Analysen wurde an dieser Stelle eine entsprechende Lösung zweier Primärantikörper verwendet. Dabei wurden folgende Antikörper genutzt: m- α -Myc, rb- α -Myc, m- α -TIAR, rb- α -DDX6, m- α -DCP1, rb- α -TDP-43, m- α - β -Aktin, m- α - β -Tubulin, m- α -GRP94 (Verdünnungen s. Tab 3.7). Nach dieser Inkubation folgten drei Waschschrte, wobei die Zellen in 1 % BSA/PBS für je 10 min geschwenkt wurden. Daraufhin wurden Lösungen von einem oder bei Ko-IF-Studien zwei Sekundärantikörpern in 1 % BSA/PBS auf die Zellen gegeben und diese damit 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei handelte es sich um die fluoreszenzmarkierten und gegen Maus- oder Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper „Alexa Fluor[®]488 gt- α -m-IgG“ und „AlexaFluor[®]594 gt- α -rb-IgG“. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen für 5 min mit 1 % BSA/PBS gewaschen, gefolgt von 1 – 2 min Behandlung mit in 1 % BSA/PBS 1:1000 verdünntem Hoechst-Farbstoff zur Visualisierung der Zellnuklei. Daraufhin erfolgten erneut drei Waschschrte wie oben beschrieben. Nach dem letzten Waschen wurde der BSA-Puffer in den Platten belassen. Daraufhin wurden die Deckgläschen mit einer Spritzenkanüle angehoben, um sie mit einer Pinzette kopfüber auf Objektträgern zu positionieren, auf die zuvor 8 μl Mounting-Medium je Probe pipettiert worden waren.

Nach einer Trocknungsphase von mindestens 2 h wurden die Proben schließlich am konfokalen Laserscan Mikroskop „LSM700“ (Zeiss) untersucht. Die Aufnahmen wurde dabei in 400-facher Vergrößerung gemacht, wofür ein $40\times$ Objektiv (NA=1,3) genutzt wurde. Dabei wurden jeweils 8-10 Z-Stapel-Aufnahmen pro Mikroskopiebild zu einer Maximalintensitätsprojektionsabbildung zusammengefasst. Die Proben wurden außerdem wenn nötig bis zu mehreren Wochen bei 4°C im Dunklen gelagert.

3.2.6.6. Stressinduktion in HeLa-Zellen

Im Zuge der IF-Kolokalisationsanalysen verschiedener Ataxin-2-Formen mit TIAR in HeLa-Zellen, wurden diese Stress ausgesetzt, wofür der oxidative Stressor Natriumarsenit (NaAsO_2) verwendet wurde. Das Arsenit

wurde hierzu zunächst in DMEM-Vollmedium auf eine Konzentration von 0,5 mM verdünnt (Stammlösung: 100 mM). Daraufhin wurde das Medium der 24 h-Überexpressionsansätze (s. Abs. 3.2.2.5.) abgesaugt und auf einen Teil der Ansätze Arsenit-Medium pipettiert. Die restlichen Ansätze wurden hingegen mit frischem DMEM-Vollmedium bedeckt und dienten als Negativ-Kontrolle. Unabhängig davon jedoch wurden alle Zellkulturplatten daraufhin eine Stunde bei 37°C inkubiert und schließlich für die Mikroskopie vorbereitet (s. v. Abs.).

3.2.6.7. *Quantitative Analyse fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen*

Für die quantitativen Auswertungen der Untersuchungen zur Fokibildung von Ataxin-2-Spaltprodukten und zur PB- oder SG-Bildung wurden fluoreszenz-blind Mikroskopiebilder aufgenommen. Danach wurden mit Hilfe der ImageJ-Software für jede Probe je nach Möglichkeit zwischen 50 und 300 Zellen ausgezählt.²⁷⁴ Dabei wurde zwischen fokipositiven und -negativen Zellen unterschieden. Außerdem wurde in den fokipositiven Zellen die Anzahl der Foki bestimmt und die Zellen in entsprechende Gruppen eingeteilt. Schließlich wurde für jede Probe, als Maß für die Effizienz der Fokibildung, das Verhältnis aller gezählten Foki zur Gesamtzahl gezählter fokibildender Zellen ermittelt.

Auf diese Weise wurden im Fall der Fokibildungsanalysen der Ataxin-2-Spaltprodukte sechs biologische Replikate für jede Versuchsbedingung analysiert. Bezüglich der PB- und SG-Bildung wurden je Bedingung drei biologische Replikate analysiert. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurden dann arithmetische Mittelwerte gebildet, deren Standardfehler berechnet, und die Versuchsreihen schließlich mittels eines zweiseitigen t-Tests auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

3.2.7. Bioinformatische Methoden

3.2.7.1. *Protein-Netzwerke und -Anreicherungsanalysen*

Zur Auswertung der MS-Ergebnisse (s. Abs. 3.2.1.3) wurde die String-Protein-Protein-Interaktionsdatenbank (String-DB V. 10.0) genutzt, um Interaktionsnetzwerke zu erstellen.²⁷⁵ Diese beschränkten sich dabei auf Proteine, deren Interaktionen hohe Konfidenz aufwiesen, was durch Voreinstellung eines minimalen Konfidenzwertes gewährleistet wurde, der auf 0,7 festgelegt worden war.

Ferner wurden diesbezüglich Proteinanreicherungs-Analysen mittels der *GeneOntology*-Datenbank (GO, veröffentlicht: 07.07.2015) durchgeführt. Dabei wurde ein von der Panther (*Protein analysis through evolutionary relationship*)-Datenbank bereitgestelltes Werkzeug genutzt, das in der jeweiligen Anfrage signifikant überrepräsentierte Proteine identifiziert, die bestimmten GO-Termen bzgl. biologischer Prozesse, zellulärer Komponenten oder biomolekularer Funktionen zugeordnet werden können (Panther V.10.0, Überrepräsentationstest veröffentlicht: 30.04.2015).^{276,277}

3.2.7.2. *Prognose von Kernimportsequenzen im Ataxin-2-Protein*

Für die Voraussage nukleärer Lokalisationssignal (NLS)-Sequenzmotive in Ataxin-2 wurde das NLStradamus-Werkzeug genutzt, das zur NLS-Prognose Hidden-Markov-Modelle (HMM) nutzt. Dabei lässt die Software die Wahl zwischen einem statischen und einem dynamischen Zweizustands-HMM sowie einem statischen Vier-Zustands-HMM, wobei hier das statische Zwei-Zustands-HMM genutzt wurde. Um die Rate falsch-positiver

Treffer zu minimieren, konnte zudem ein posteriorer Wahrscheinlichkeits-Grenzwert eingestellt werden, der hier gemäß der Empfehlung der Software-Entwickler in seiner Grundeinstellung (Wert = 0,6) belassen wurde.²⁷⁸

3.2.7.3. Paarweise Sequenzalignments von Ataxin-2 & prionartigen Proteinen

Die Ataxin-2-Proteinsequenz wurde zwei unterschiedlichen Arten lokaler Sequenzalignments unterzogen. So wurde sie einerseits mit Sequenzen verschiedener, prionartiger Proteine paarweise align, wozu das WATER-Alignment-Werkzeug eingesetzt wurde, das vom EMBL (Europäisches molekularbiologisches Labor) zur Verfügung gestellt wird. Das Werkzeug nutzt dabei den Smith-Waterman-Algorithmus zur Identifikation derjenigen Abschnitte der jeweils alignen Sequenzen, die die größte Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Als Substitutions-Bewertungsmatrix (von engl. *substitution scoring matrix*) wurde in diesem Fall die BLOSUM62-Matrix genutzt, mit Hilfe derer für jedes Alignment ein Substitutionswert, d. h. eine Punktzahl berechnet wurde, die umso höher war, je genauer das Alignment gewesen ist. Existierten ferner Lücken in den alignen Sequenzen, wurden von dieser Punktzahl zudem pro Lückenstart 10 Punkte abgezogen (*gap penalty*), und für jede dem Lückenstart folgende Lückenposition wurden weitere 0,5 Punkte davon subtrahiert (*gap extend penalty*).²⁷⁹

Außerdem wurden die Sequenzen des Ataxin-2-C-Terminus und TDP-43 mit Hilfe der LALIGN-Software align, die ebenfalls vom EMBL bereitgestellt wurde, und die auf einem von Huang & Miller entwickelten Algorithmus basiert.²⁸⁰ Als Ergebnis liefert die Software dabei mehrere, nicht überlappende Sequenzalignments sowie dazu gehörige Zufallswahrscheinlichkeiten, was somit auch Aussagen über die Signifikanz der Ähnlichkeit der alignen Sequenzen zuließ. Für die Berechnung der Alignment-Punktzahl wurde hier die PAM120-Substitutionsmatrix genutzt, mit einem *Gap Penalty*-Wert von 10 und einem *Gap extend penalty*-Wert von 2.²⁷⁹

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen zur Expression physiologischer Spaltprodukte von Ataxin-2 in *S. cerevisiae*

Derzeit existieren bereits viele Hefemodelle zur Analyse diverser neurodegenerativ wirkender Gene bzw. Proteine. So konnten in *S. cerevisiae* bereits für pathogene Formen von APP, Htt, α -Synuclein, TDP-43 oder Ataxin-3 pathologische Merkmale wie zytotoxische Wirkung und intrinsische Aggregationsneigung simuliert werden. Dabei werden einige dieser Modelle auch als humanisiert bezeichnet, was darauf verweist, dass die dort untersuchten humanpathologischen Gene keine Hefe-Orthologe besitzen.^{232,281,258,282,283}

Für pathogenes Ataxin-2 mit 79 Q-Repeats in der PolyQ-Domäne bzw. 79 kontinuierlichen CAG-Wiederholungen im *ATXN2*-Gen konnte allerdings in ersten Untersuchungen keine Zytotoxizität in Hefewachstumsanalysen gezeigt werden.⁸⁶

Im Gegensatz zu diesen Experimenten, die sich auf vollständige Ataxin-2-Formen konzentrierten, wurde jedoch in einigen der o. g. Hefemodelle auch die Expression pathologisch bedeutsamer Protein-Teilbereiche analysiert. So wurde zur Modellierung krankheitsrelevanter Htt-Eigenschaften häufig dessen CAG-Repeat-tragender Exon1-Bereich in Hefezellen exprimiert.^{258,259,260,261} Ebenso wurden pathologische Eigenschaften von APP via Expression von Amyloid- β -Peptiden in Hefe simuliert, da besonders diese proteolytischen APP-Spaltprodukte als wichtig für die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit gelten.^{284,285,286} Analog dazu wurden schließlich auch für C-terminale Caspase-3-Abbauprodukte von TDP-43, die als ALS-Pathogene angesehen werden, bereits zytotoxische Effekte im *S. cerevisiae*-Modell gezeigt.²³²

Darüber ob derartige proteolytische Spaltprodukte von Ataxin-2 eine Rolle bei der SCA2-Pathogenese spielen, ist allerdings zurzeit nichts bekannt. Einige Beobachtungen lassen jedoch vermuten, dass dafür tatsächlich Ataxin-2-Spaltprodukte wichtig sein könnten. Es zeigte sich nämlich schon in frühen Sequenzanalysen von Ataxin-2, dass es eine einzelne Caspase-3-Konsensussequenz (DXXD) im Bereich der Aminosäurereste 397 bis 400 besitzt (s. Abb. 4.1A). Außerdem konnten in Cerebellum-Proben aus SCA2-Patienten und Hirnmaterial aus SCA2-Modellmäusen via Immunoblotanalysen spezifisch angereicherte Ataxin-2-Formen mit geringem Molekulargewicht identifiziert werden. Dabei handelte es sich um eine N-terminale 42 kDa-Isoform und eine C-terminale 70 kDa-Isoform, deren Massen damit denen zweier Spaltprodukte einer hypothetischen Caspase-Reaktion an o. g. Konsensussequenz entsprechen. Aus diesem Grund wird vermutet, dass diese Formen tatsächlich proteolytische SCA2-Abbauprodukte darstellen könnten.^{7,50,110}

Allerdings konnten entsprechenden rekombinanten N-terminalen Ataxin-2-Abschnitten mit oder ohne PolyQ-Repeatexpansion bei Experimenten in der Säugerzelllinie COS-1 keine zytotoxischen Effekte nachgewiesen werden. Daraufhin wurde erstmals die Hypothese postuliert, dass C-terminale, d. h. stromabwärts der Caspase-Konsensussequenz liegende Proteinbereiche Ataxin-2-Zytotoxizität vermitteln könnten. Eine Bestätigung dieser Hypothese blieb jedoch bislang aus.¹²¹

Deshalb sollte in dieser Arbeit zunächst überprüft werden, ob entsprechende physiologische Ataxin-2-Spaltprodukte, d. h. insbesondere der C-terminale Bereich, im *S. cerevisiae*-Modellsystem zytotoxisch wirken. Außerdem wurden parallel dazu fluoreszenzmikroskopische Analysen unternommen, um die subzelluläre Lokalisation und das Fokibildungsverhalten der Spaltprodukte zu analysieren.

4.1.1. Studien zum Einfluss der Expression physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte auf das Hefewachstum

Um nun zu klären, ob die in Abs. 4.1. vorgestellten physiologischen Ataxin-2-Proteinabschnitte zytotoxische Effekte ausüben können, wurden Wachstumsanalysen in Form sogenannter Tropftests (von engl. *spotting assay*) mit Hefezell-Suspensionskulturen durchgeführt.

Dafür wurde als erstes der Hefestamm BY4741 (WT) mit galaktose-induzierbaren, rekombinanten Hefe-Plasmiden transformiert. Diese kodierten zum einen für vollständiges, nicht pathogenes Ataxin-2 und zum anderen für dessen N- oder C-terminales Spaltprodukt. Außerdem wurden weitere Zellklone mit zwei zusätzlichen Plasmiden transformiert, die für fluoreszierende, Redstar-Fusionsproteinvarianten der beiden Spaltprodukte kodierten (s. Abb. 4.1A), wobei deren Analyse hier v. a. dazu diente ungewünschte Nebeneffekte auf das Verhalten der Ataxin-2-Spaltprodukte aufgrund des Redstar-Protein-Tags ausschließen zu können. Dies war wichtig, um die prinzipielle Eignung der Fusionsproteine für geplante Mikroskopieanalysen zu bewerten (s. v. Abs.). Diesbezüglich sollte der Protein-Tag nämlich idealerweise keine zusätzlichen Effekte vermitteln, um aus den Mikroskopiestudien aussagekräftige Schlussfolgerungen hinsichtlich der unmarkierten Spaltprodukte ziehen zu können. Abgesehen davon wurden zusätzlich Transformationen mit dem Leervektor p423Gal-L durchgeführt, deren Klone in den Tropftests als Referenz für unbeeinflusstes Hefewachstum genutzt werden sollten. Die Transformationsansätze wurden schließlich auf CSM/ Glc/ -H-Selektionsagar selektiert, und es wurden daraufhin Einzelklone für die Wachstumsanalysen in Übernachtskulturen (CSM/ Glc/ -H) angesetzt. Am Folgetag wurden dann zunächst die OD₆₀₀-Werte der Suspensionskulturen gemessen und diese auf einen gemeinsamen Wert von 0,6 eingestellt, woraufhin die so gewonnenen Verdünnungen in Mikrotiterplatten sukzessive im Verhältnis eins zu vier weiterverdünnt wurden. Schließlich wurden je 5 µl der Kulturen auf präparierte Selektionsagarplatten ausgetropft, luftgetrocknet und über drei bis vier Nächte bei 30°C inkubiert. Hierbei wurden die Kulturen zudem jeweils auf zwei unterschiedliche Agarplatten ausgetropft, die entweder Glucose (Glc) oder Galaktose (Gal) als Kohlenstoffquelle enthielten, wobei Galaktose die Expression der rekombinanten Ataxin-2-Proteine induzierte. Die Ansätze auf glucosehaltigem Medium dienten hingegen zur Kontrolle auf gleichmäßiges Wachstum der Klone im Grundzustand, d. h. bei nicht induzierter Plasmidexpression. Um die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zu gewährleisten, wurden ferner für jede Ataxin-2-Isoform mindestens sechs Klone aus drei unabhängigen Transformationen getestet. Repräsentative Aufnahmen dieser Tests sind in Abb. 4.1B zu sehen.

Darin erkennt man, dass die Zellen bei ausgeschalteter Plasmidexpression, d. h. auf glucosehaltigem Agar, alle gleichmäßig wuchsen, was eine Grundbedingung für diese Experimente war. Im Gegensatz dazu wurde das Hefewachstum bereits durch galaktosevermittelte Leervektorexpression negativ beeinflusst, wobei dieser Effekt sehr variabel war. Unabhängig davon jedoch zeigten Zellen, die vollständiges Ataxin-2 oder dessen N-Terminus mit oder ohne Redstar-Markierung exprimierten, ähnliches Wachstum wie die Leervektorkontrollproben. In diesen Fällen konnte also kein zytotoxischer Einfluss der Ataxin-2-Isoformen erkannt werden.

Besonders auffällig war jedoch andererseits, dass die Expression des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts im Vergleich zur Leervektorexpression zu deutlich gestörtem Hefewachstum führte. Dies galt zudem sowohl für fluoreszenzmarkiertes als auch unmarkiertes Spaltprodukt und konnte in beiden Fällen sehr konsistent nachgewiesen werden (s. Abb. 4B unten). Diese Analysen zeigten somit, dass das physiologische C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt zytotoxisch in Hefezellen wirken kann.

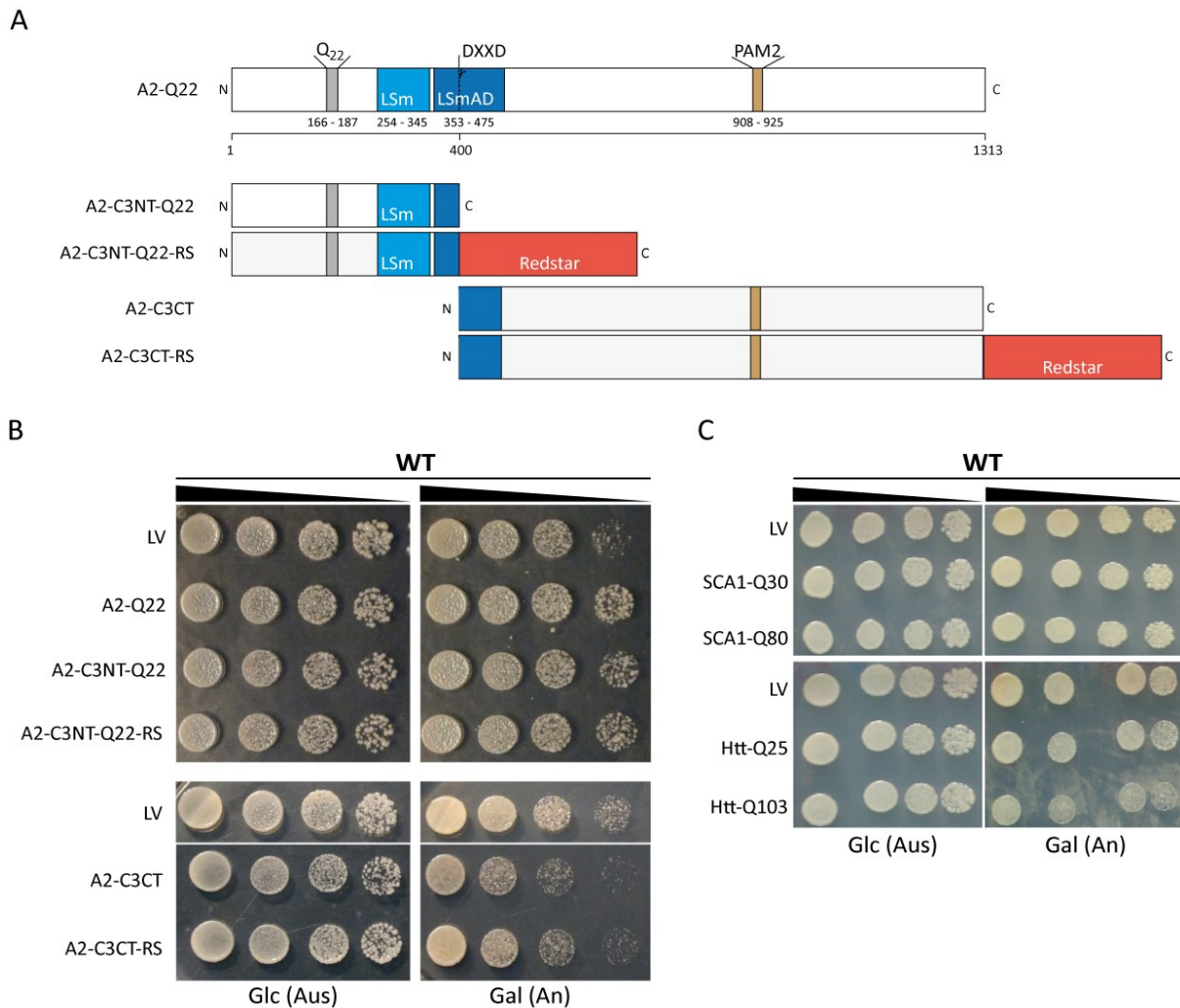


Abb. 4.1 Untersuchungen zu Effekten der Expression physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte auf das Wachstum von *S. cerevisiae* (A) Funktionelle Struktur der untersuchten rekombinanten Ataxin-2-Varianten. Diese waren vollständiges Ataxin-2 mit 22 Q-Repeats (A2-Q22), mutmaßlich Caspase-3-abhängiges N-terminales Ataxin-2-Spaltprodukt mit 22 Q-Repeats (A2-C3NT-Q22) & entsprechendes C-terminales Spaltprodukt (A2-C3CT) sowie Redstar-Fusionsproteine beider Ataxin-2-Spaltprodukte (A2-C3NT-Q22-RS & A2-C3CT-RS) (DXXD: Caspase-3-Spaltmotiv (DPND in Ataxin-2), für weitere Erläuterungen s. Abb. 1.1)). (B) Wachstumsanalysen mit WT-Hefezellklonen, die o. g. Ataxin-2-Formen bzw. den entsprechenden Leervektor p423Gal-L (LV) galaktose-abhängig exprimierten. Die Ausgangskulturen wurden schrittweise 1:4 verdünnt (s. schwarzes Dreieck) und auf Agarplatten getropft. Die Glucose (Glc)-Platten dienen zur Wachstumskontrolle bei ausgeschalteter Genexpression. Die Aufnahmen der Galaktose (Gal)-Platten hingegen zeigen das Zellwachstum bei induzierter Expression. (C) Wachstumsanalysen (wie in (B) beschrieben) mit weiteren PolyQ-Proteinen zur Kontrolle der Spezifität in (B) beobachteter Effekte (SCA1-Q30 = nicht pathogenes Ataxin-1 mit 30 Q-Repeats, SCA1-Q80 = pathogen expandiertes Ataxin-1 mit 80 Q-Repeats, HttQ25 = Exon1 des Huntingtin mit 25 Q-Repeats, HttQ103 = wie HttQ25 mit 103 Q-Repeats) (LV: p426Gal-L). Die Fotografien in (B) & (C) zeigen repräsentatives Zellwachstum, ausgehend von mind. sechs untersuchten biol. Replikaten.

In diesem Zusammenhang wurden ferner ähnliche Untersuchungen auch mit Hefeklonen durchgeführt, die pathogene und nicht pathogene Formen der PolyQ-Proteine SCA1 und Htt, galaktose-abhängig exprimierten. Dies diente dazu die Spezifität des für den C-terminalen Ataxin-2-Abschnitt beobachteten Effekts abzusichern und zu demonstrieren, dass er nicht allein auf galaktose-induzierter Expression beliebiger PolyQ-Krankheitsproteine beruht. Die Durchführung der entsprechenden Tropftests erfolgte dabei prinzipiell wie oben beschrieben, und Abb. 4.1C zeigt repräsentative Aufnahmen dieser Experimente.

Dort kann man erkennen, dass die induzierte Expression der nicht pathogenen Formen von SCA1 (mit 30 Q-Repeats) und Htt (mit 25 Q-Repeats) im Vergleich zur Leervektorexpression das Hefewachstum nicht inhibierte. Dies traf außerdem auf die Expression von pathogenem SCA1-Protein mit einer

auf 80 Q expandierten PolyQ-Domäne zu. Demgegenüber hatte die Expression der pathogenen Htt-Isoform mit 103 Q-Wiederholungen einen wachstumshemmenden Effekt auf die Hefezellen, der in den Leervektorproben nicht beobachtet werden konnte. Da letztgenannter Effekt zudem bereits zuvor als spezifisch für das verwendete Hefemodellsystem identifiziert worden war, ließ sich daraus schließen, dass auch die beobachtete zytotoxische Wirkung des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts spezifisch war.²⁶⁶

Die Wachstumsanalysen ergaben also insgesamt, dass die Expression des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts deutliche, reproduzierbare und spezifische zytotoxische Effekte im *S. cerevisiae*-Modell vermittelt. Im Gegensatz dazu zeigte die Expression der N-terminalen Ataxin-2-Bereiche jedoch keine konsistente zytotoxische Wirkung in den Wachstumstests. Die Ergebnisse sind somit einerseits konform mit o. g. Untersuchungen in COS-1-Zellen, die zeigten, dass der N-terminale Ataxin-2-Bereich dort keine zytotoxischen Effekte vermittelt. Andererseits bestätigen sie zudem, erstmals für eukaryontische Zellen, die ebenfalls auf Basis der COS-1-Experimente aufgestellte Hypothese von einem zytotoxisch wirkenden C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukt.¹²¹ Schließlich zeigte sich außerdem, dass die Fluoreszenzmarkierung das Verhalten der Spaltprodukte in den Wachstumstests kaum beeinflusste (s. Abb. 4.1B), was die Nutzbarkeit der markierten Proteine für die folgenden Fluoreszenzmikroskopie-Analysen bestätigte.

4.1.2. Lokalisationsstudien physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte in Hefezellen

Neben den Wachstumstests wurden, wie eingangs erwähnt, auch mikroskopische Untersuchungen mit den in Abs. 4.1.1. vorgestellten Redstar-markierten Ataxin-2-Spaltprodukten (s. Abb. 4.1A) durchgeführt. Auf diese Weise sollte prinzipiell geprüft werden, wie diese sich in Hefezellen verteilen, und ob sie an bestimmten Orten angereichert vorliegen. In Anbetracht der Ergebnisse o. g. Wachstumsanalysen (s. v. Abs.) bot sich dadurch jedoch zudem die Möglichkeit Hinweise auf Ursachen für die dabei beobachteten unterschiedlichen Effekte beider Spaltprodukte und v. a. den zytotoxischen Effekt des Ataxin-2-C-Terminus zu erlangen.

Dabei wurde auch für diese Analysen zunächst der WT-Hefestamm wie zuvor beschrieben (s. v. Abs.) transformiert, und Einzelklone dieser Transformation wurden in CSM/Glc/-H-Selektionsmedium über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Suspensionen dann zunächst zweimal mit CSM/Gal/-H-Selektionsmedium gewaschen und daraufhin in demselben Medium auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,4 eingestellt, um die Expression der Spaltprodukte zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen für 5 – 6 h bei 30°C inkubiert und nach erneutem Waschen in sterilem *Aqua bidest.* mikroskopiert. Die Einstellung der Fokusebene für die einzelnen Aufnahmen fand dabei manuell statt und basierte auf dem Transmissionskanalbild. Außerdem diente das RFP-Filterset des Mikroskops zur Detektion der Redstar-Fluoreszenz. Schließlich wurden die Zellen bei 630-facher Vergrößerung fotografiert und die Bilder qualitativ ausgewertet, wobei pro Spaltprodukt sechs Klone aus mindestens drei unabhängigen Transformationen untersucht wurden, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Dabei entstandene Aufnahmen eines repräsentativen Experiments sind in Abb. 4.2. dargestellt.

Diese lassen erkennen, dass das N-terminale Spaltprodukt in einem Großteil der Zellen, diffus über die komplette Zelle verteilt vorlag (s. Abb. 4.2 links). In durchschnittlich etwa einem Fünftel dieser Zellen bildeten sich jedoch zudem kleine, diskrete Fluoreszenzfoki heraus, wobei meist einer, gelegentlich aber auch zwei Foki beobachtet wurden. Dennoch war die Neigung des N-terminalen Ataxin-2-Abschnitts zur Fokibildung in den Hefezellen insgesamt eher schwach.

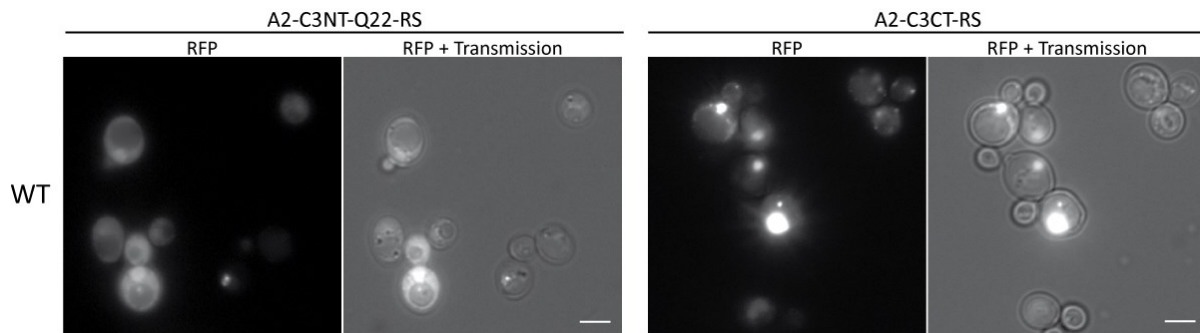


Abb. 4.2 Lokalisations- und Fokibildungsanalysen fluoreszenzmarkierter Ataxin-2-Spaltprodukte in *S. cerevisiae* (WT). Die exogene Expression der mit dem Redstar-Tag markierten Spaltprodukte (s. a. Abb.4.1A) wurde durch Galaktose induziert, und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Bilder zeigen typisches Lokalisations- und Fokibildungsverhalten der Spaltprodukte im WT-Hefestamm, d. h. die Anteile an fokipositiven und -negativen Zellen in den Abbildungen sind repräsentativ für Beobachtungen aus mind. sechs unabhängigen Experimenten. Links: Ataxin-2-N-Terminus (meist diffus verteilt). Rechts: Ataxin-2-C-Terminus (häufige Fokibildung). Die Aufnahmen entstanden bei 630-facher Vergrößerung (Maßstabsbalken: 5 µm, RFP: RFP-Fluoreszenzkanal d. Mikroskops).

Demgegenüber zeigte, das C-terminale Ataxin-2-Redstar-Fusionsprotein sehr häufig Lokalisation in diskreten Foki. So waren je Test zwischen 80 und 90 % der Spaltprodukt exprimierenden Zellen fokipositiv, wobei die Zahl und Größe der Foki in den einzelnen Zellen stark variierte (s. Abb. 4.2 rechts).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass der in o. g. Hefewachstumstests als zytotoxisch identifizierte, Redstar-markierte Ataxin-2-C-Terminus eine äußerst starke Fokibildung zeigte (s. Abs. 4.1.1.). Andererseits war das N-terminale, fluoreszenzmarkierte Ataxin-2-Fusionsprotein, das dabei nicht zytotoxisch gewirkt hatte, fast ausschließlich diffus in den Hefezellen verteilt. Daraus ließ sich schließen, dass die beobachtete Zytotoxizität des C-terminalen Ataxin-2-Abschnitts in Hefezellen, mit dessen zellulären Anreicherungen zusammengehangen haben könnte. Unklar war jedoch, ob diese Anreicherungen an spezifischen Orten in der Zelle lokalisiert waren. Deshalb wurden als nächstes Kolokalisationsanalysen mit Hefestämmen durchgeführt, die RFP-Markerproteine zellulärer Kompartimente chromosomal exprimierten, um mehr über die subzelluläre Verteilung der Spaltprodukte zu erfahren.

4.1.3. Untersuchungen zur Kolokalisation physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte mit verschiedenen zellulären Markern

Die bisher vorgestellten Experimente zeigten, dass insbesondere das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt zytotoxisch in Hefezellen wirkte (s. Abs. 4.1.1.), wobei es gleichzeitig eine starke Fokibildungsneigung demonstriert hatte (s. v. Abs.). Daraus ergab sich die Frage, warum grade der Teil des Ataxin-2-Proteins ohne PolyQ-Domäne derart effizient in den Zellen angereichert war, und ob die Anreicherungen möglicherweise an spezifischen Zellorten stattfanden. Deshalb wurden, um dies zu klären, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, in denen v. a. die Fluoreszenzfoki des Ataxin-2-C-Terminus näher charakterisiert werden sollten. Dabei wurde deren Kolokalisation mit RFP-Markerproteinen für verschiedene Zellkompartimente analysiert, um so zu überprüfen, ob sich das C-terminale Spaltprodukt dort anreichern kann, und eventuell dadurch toxisch in den Hefezellen gewirkt haben könnte.

Die für diese Experimente verwendeten Markerprotein-Hefestämme stammten dabei aus der AG O'Shea, in der sie unter Nutzung homologer Rekombinationstechniken auch hergestellt worden waren. Dafür war jeweils die kodierende Sequenz des Gens für das rot fluoreszierende Protein (RFP) in die Hefegenome integriert worden, wobei diese an die 3'-Enden der kodierenden Sequenzen der spezifischen Zellkompartiment-Marker-Gene

angefügt wurde. Dadurch waren die so erzeugten Klone im Stande C-terminal RFP-markierte Fusionsproteine konstitutiv zu exprimieren, die als mikroskopische Zellkompartiment-Marker verwendet werden können.²⁶³

In den hier durchgeführten Kolokalisationsanalysen wurden nun folgende neun RFP-Markerstämme eingesetzt: NOP56 (nukleoläres Protein von 56 kDa; alias SIK1; Nukleolus), SPC42 (*spindle pole component* 42; Teilungs-Spindel-Polkörper), ERG6 (Ergosterol-Biosynthese 6; Liposomen, Mitochondrien-Außenmembran), PEX3 (Peroxin 3; Peroxisomen), SNF7 (Saccharose nicht fermentierend 7; Endosomen), ANP1 (Amino-Nitrophenylsensitiv 1; Golgi-Apparat), NIC96 (*nucleoporin-interacting component* of 96 kDa; Nukleus) SAC6 (*suppressor of actin* 6; Aktin) und schließlich SEC13 (*secretory protein* 13; COPII-Vesikel für Transport von ER zu GA).

Diese Stämme wurden für die Kolokalisationsstudien zunächst, ähnlich wie in Abs. 4.1.1. erläutert, mit galaktose-induzierbaren, rekombinanten Plasmidvektoren transformiert. Da jedoch die zellulären Markerproteine bereits rote Fluoreszenz emittierten, waren diesbezüglich o. g. Vektoren, die für Redstar-markierte Ataxin-2-Spaltprodukte kodierte, ungeeignet (s. Abb. 4.1A). Stattdessen wurden für diese Analysen Plasmide genutzt, die für Ataxin-2-Spaltprodukt-Fusionsproteine kodierte, die C-terminal mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) markiert waren (s. Abb. 4.4A). Ansonsten entsprach die Durchführung der Experimente jedoch der zuvor erläuterten Vorgehensweise (s. v. Abs.), d. h. auch hier wurde die Plasmidexpression durch Inkubation der Zellen in galaktosehaltigem Medium für 5 – 6 h bei 30°C induziert, woraufhin die Zellen direkt mikroskopiert wurden.

Parallel zu jedem Kolokalisationsexperiment wurden außerdem Kontrollversuche durchgeführt, die zeigen sollten, ob die Expression des Leervektors p423Gal-L Einfluss auf die RFP-Markerproteine hatte. Dafür wurde die bei Leervektorexpression festgestellte, zelluläre Lokalisation der Marker mit Daten der „*yeast GFP fusion localization database*“ (yeastgfp.yeastgenome.org) abgeglichen, die auf Grundlage der Analysen der O’Shea-Gruppe erstellt wurde.²⁶³ Bilder dieser Kontrollexperimente, die typische dabei beobachtete Lokalisationsmuster der RFP-Markerproteine zeigen, sind in Abb. 4.3 zusammengefasst.

Diese Analysen demonstrierten, dass die galaktosevermittelte Leervektorexpression keinen Einfluss auf die bekannten Lokalisationsmuster der RFP-Markerproteine hatte, wie der Datenbankabgleich der Mikroskopiebilder ergab. Das bedeutet z. B. für den Spindelpolmarker SPC42, dass er meist in einem bis gelegentlich auch zwei relativ kleinen Foki pro Zelle konzentriert war (s. Abb. 4.3 oben). Ebenso zeigte NOP56 eine den Datenbankbildern entsprechende Lokalisation in nur einem großen Fluoreszenzfokus in jeder Zelle, der demzufolge den Nukleolus markierte (s. Abb. 4.3 oben). Ferner konnte auch für NIC96 eine herkömmliche, zelluläre Verteilung beobachtet werden. So war dieses im Querschnitt oft in Form offener oder geschlossener, ringförmiger Fluoreszenzsignale zu erkennen, die seiner Lokalisation an der nukleären Peripherie entsprachen (s. Abb. 4.3 oben). Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Datenbankeinträgen, war die beobachtete Lokalisation des Peroxisomenmarkers PEX3 und des Aktinmarkers SAC6 in vielen relativ kleinen Foki pro Zelle, die sich häufig in der Zellperipherie befanden (s. Abb. 4.3 zentral & unten). Außerdem entsprach die zelluläre Lokalisation des Golgi-Apparat-Markers ANP1 in mehreren zellperipheren Foki moderater Größe ebenfalls dessen bekanntem Lokalisationsmuster (s. Abb. 4.3 zentral). Gleiches trifft ferner auf den Liposomen- und Mitochondrienmarker ERG6 und den Endosomenmarker SNF7 zu, die ebenfalls in vielen mittelgroßen bis großen Foki in den einzelnen Zellen angereichert waren. Diese traten dort jedoch meist eher zentral auf (s. Abb. 4.3 zentral & unten). Schließlich zeigte auch das COPII-Vesikel- sowie ER-assoziierte Protein SEC13 eine seinem dokumentierten Lokalisationsmuster entsprechende Anreicherung in vielen kleinen Foki einerseits sowie langgezogenen Strukturen andererseits (s. Abb. 4.3 unten).²⁶³

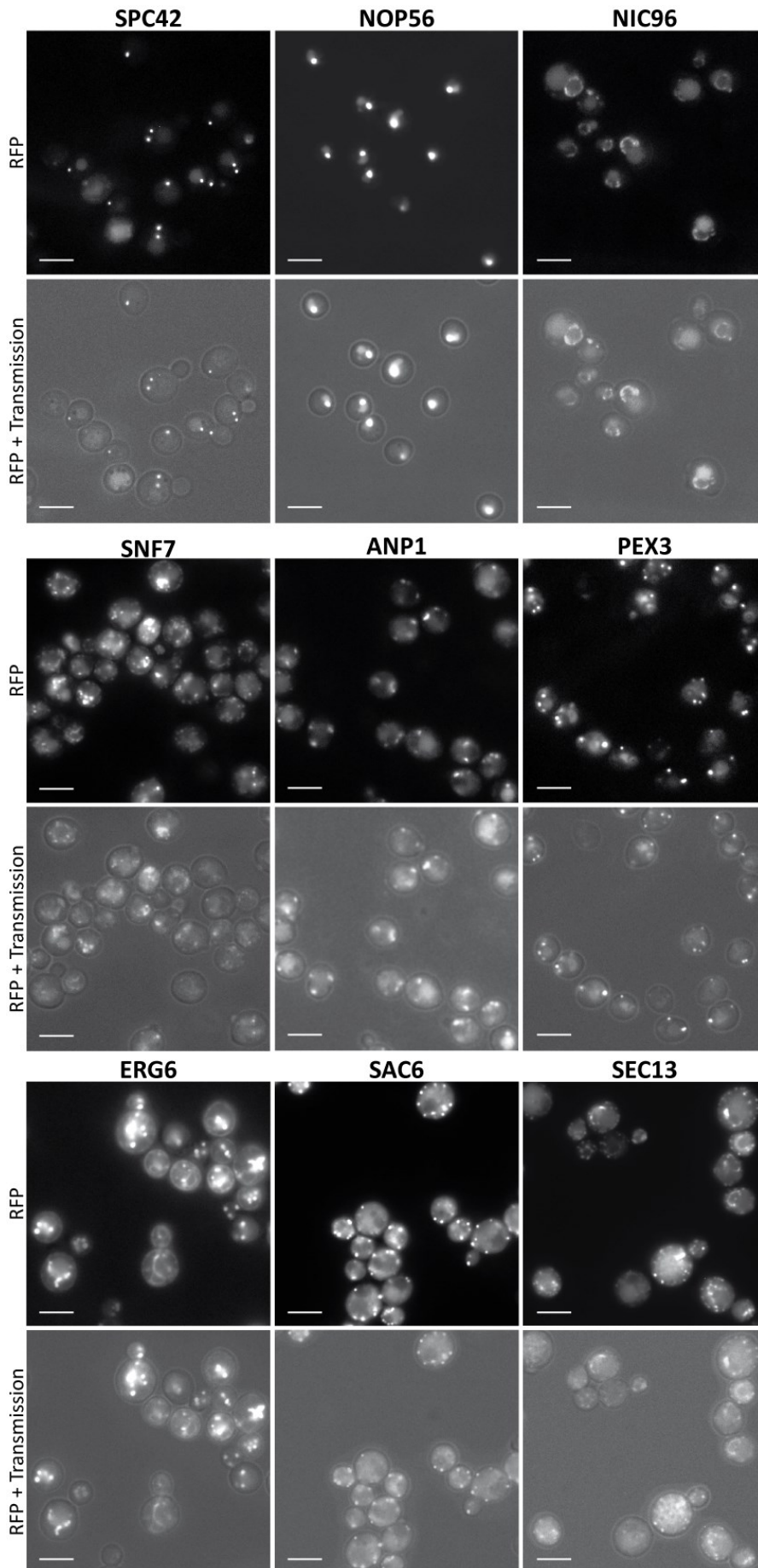


Abb. 4.3 Analyse der Lokalisation und Fokibildung chromosomal exprimierter, RFP-Fusionsproteine diverser Zellkompartiment-Marker in *S. cerevisiae* bei galaktose-induzierter Leervektorexpression (Kontrollexperiment). Die einzelnen rekombinanten Hefestämme exprimierten RFP-Markerproteine für folgende Zellkompartimente: Spindelpolkkörper (SPC42), Nukleolus (NOP56), Nukleus bzw. nukleäre Hülle (NIC96), Endosomen (SNF7), den Golgi-Apparat (ANP1), Peroxisomen (PEX3), Liposomen & Mitochondrien-Außenmembran (ERG6), Aktin (SAC6) sowie COPII-Vesikel des anterograden ER-Transports (SEC13). Die Leervektorexpression (p423Gal-L) wurde für 5 – 6 h induziert. Die bekannte Markerproteinlokalisierung war davon jedoch nicht beeinflusst, was anhand des Vergleichs mit Bildern der „*yeast GFP fusion localization database*“ erkannt werden konnte (s. Text). Die Abbildungen zeigen repräsentative Lokalisation/ Fokibildung der Markerproteine bezogen auf sechs untersuchte biol. Replikate pro Stamm. (Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 µm, RFP: RFP-Kanal)

Für die Kolokalisationsanalysen wurde die Expression der GFP-markierten Ataxin-2-Spaltprodukte (s. o.) in den RFP-Markerstämmen, analog zur Leervektorexpression in den Kontrolleexperimenten, durch Inkubation der Hefekulturen in Galaktosemedium induziert. Die Hefezellen wurden dann mittels entsprechender Fluoreszenzfiltersets mikroskopiert, und es wurden Überlagerungsbilder des RFP-, GFP- und Transmissionskanals erstellt. Dabei wurden wieder sechs Klone aus mindestens zwei unabhängigen Transformationen untersucht. Entsprechende Mikroskopieaufnahmen einiger repräsentativer Experimente sind in Abb. 4.4 dargestellt.

Daran lässt sich erkennen, dass die beobachtete zelluläre Lokalisation der GFP-markierten Spaltprodukte der o. g. Redstar-Fusionsproteine (s. Abs. 4.1.2.) grundsätzlich ähnlich war (vgl. Abb.4.2 und 4.4B & C). Bezüglich des GFP-markierten N-terminalen Spaltprodukts bedeutet dies konkret, dass es häufig ausschließlich als diffuses, über die ganze Zelle verteiltes Signal detektiert wurde (s. Abb. 4.4C). Analog zu den o. g. Untersuchungen konnte aber auch hierbei in wenigen Zellen die Bildung eines kleinen GFP-Fokus beobachtet werden (s. Abb. 4.4C). Insgesamt war der Anteil dieser Zellen allerdings im Vergleich zu den Analysen mit Redstar-markiertem Ataxin-2-N-Terminus noch zusätzlich reduziert.

Ebenso in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abs. 4.1.2. konnte zudem für das C-terminale Ataxin-2-GFP-Fusionsprotein sehr konsistent in ca. 80 – 90 % der fluoreszierenden Zellen Fokibildung festgestellt werden. Die GFP-Foki waren dabei wie die des Redstar-Ataxin-2-C-Terminus oft groß und meist zirkulär aber gelegentlich auch oval (s. Abb. 4.4B).

Diese sehr ähnlichen Lokalisationsmuster der GFP- und Redstar-markierten Ataxin-2-Abschnitte weisen insgesamt erneut darauf hin (s. Abs. 4.1.1.), dass die Fluoreszenzlabel das Spaltproduktverhalten nur wenig beeinflussten.

Weiterhin stellte sich heraus, dass der C-terminale Ataxin-2-Abschnitt mit einigen RFP-Markerproteinen kolokalisierte, was im Gegensatz dazu für den N-terminalen Bereich in keinem Experiment beobachtet wurde.

Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass die Ataxin-2-N-Terminus-Expression zu einer apparenten Abnahme der durchschnittlichen Zahl an SNF7-RFP-Foki (d. h. Endosomen) pro Zelle führte (s. Abb. 4.4C), ohne dabei jedoch die RFP-Gesamtfluoreszenz deutlich zu mindern. Dies könnte somit auf eine mögliche inhibitorische Wirkung des Ataxin-2-N-Terminus auf die Endosomenbildung bzw. die SNF7-Rekrutierung zu den Endosomen hindeuten.

Der GFP-markierte Ataxin-2-C-Terminus andererseits zeigte Kolokalisation mit NIC96-, SPC42-, PEX3-, und ANP1-RFP (s. Abb. 4.4B). Das bedeutet also, dass zumindest dieses Fusionsprotein mit spezifischen Bestandteilen der Spindelpolkörper, des Nukleus, der Peroxisomen und des Golgi-Apparat assoziieren kann, was dementsprechend auch für vollständiges Ataxin-2 gelten könnte.

Für die Spezifität der beobachteten Kolokalisation des C-terminalen Spaltprodukts mit dem Golgi-Apparat sprechen dabei auch frühere Studien. Dort konnte nämlich in Kofraktionierungs- sowie Kolokalisationsanalysen festgestellt werden, dass vollständiges nicht pathogenes Ataxin-2 mit dem Golgi-Apparat assoziiert ist. Allerdings zeigten die o. g. Kofraktionierungsexperimente keine Anreicherung von Ataxin-2 in der Peroxisomenfraktion, was jedoch auf artspezifische Unterschiede zurückzuführen sein könnte, da diese Experimente mit murinen Zellen durchgeführt worden waren.^{118,119}

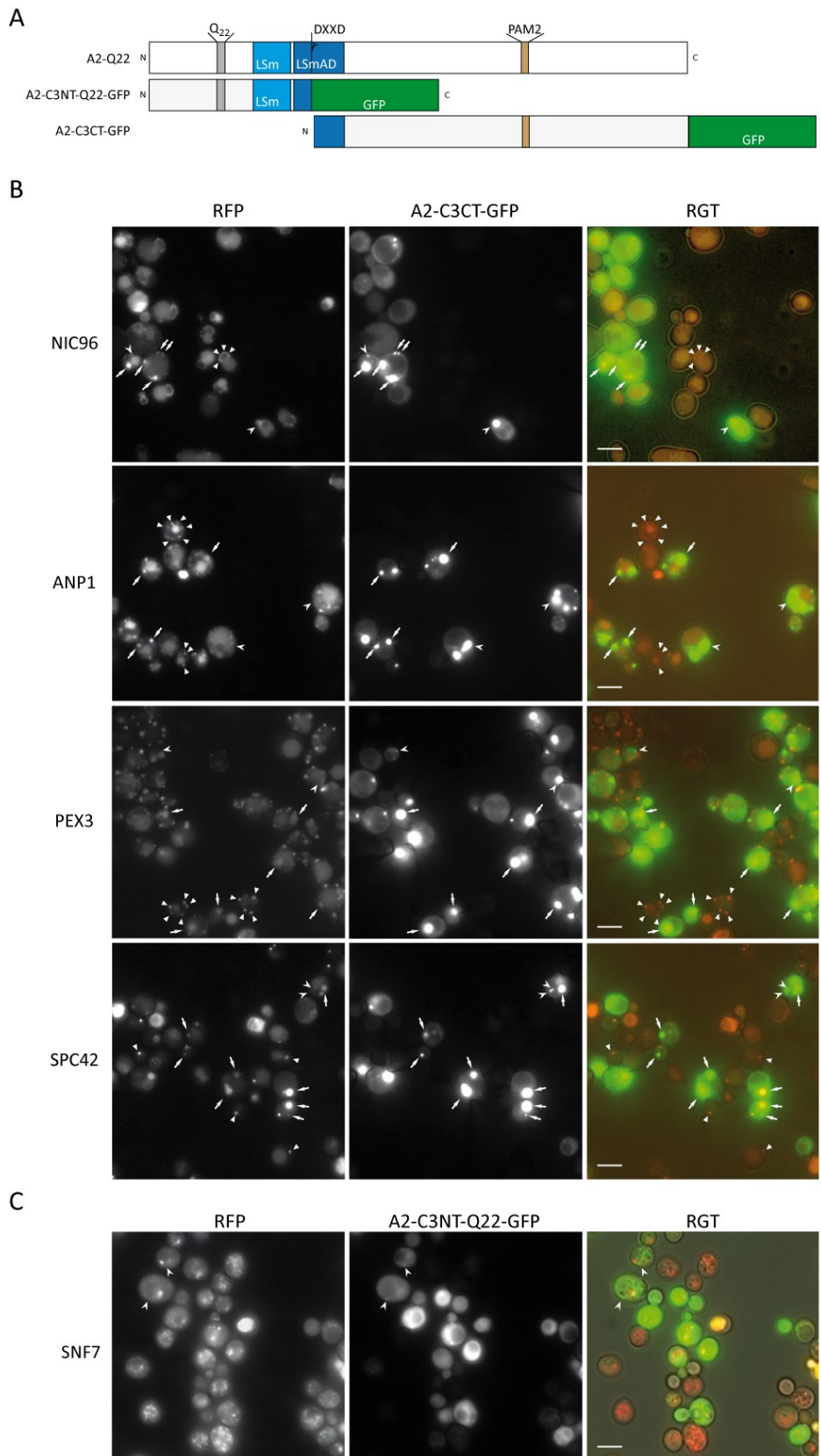


Abb. 4.4 Untersuchungen zur Kolokalisation GFP-markierter Ataxin-2-Spaltprodukte & chromosomal exprimierter RFP-Markerproteine in *S. cerevisiae*. (A) Funktionelle Struktur der analysierten Spaltprodukt-Fusionsproteine und des vollständigen Ataxin-2 (zum Vergleich). (B) Mikroskopiebilder der RFP-Markerprotein-Hefestämme deren Zellen Kolokalisation des Ataxin-2-C-Terminus mit dem Markerprotein zeigten (C) Mikroskopie-Aufnahmen von Zellen des SNF7-RFP-Stamms, in denen bei Ataxin-2-N-Terminus-Expression reduzierte SNF7-RFP-Fokibildung beobachtet wurde. Kolokalisation zwischen dem Spaltprodukt und SNF7 wurde jedoch nicht festgestellt. (Pfeile: kolokalisierende GFP- und RFP-Foki, dreieckige Pfeilspitzen: nicht kolokalisierende RFP-Foki, viereckige Pfeilspitzen: nicht kolokalisierende GFP-Foki, Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 μ m, RGT: Überlagerung der Mikroskopbilder des RFP-, GFP- und Transmissionskanals).

Von einer Assoziation des Ataxin-2-Hefe-Orthologs PBP1 mit den hefespezifischen Spindelpolkörpern wurde jedoch bisher nicht berichtet, und auch von einer Verbindung zwischen Ataxin-2 und den zu den Spindelpolkörpern funktionell äquivalenten Zentrosomen, die sich evolutionär in Metazoen entwickelt haben, ist bislang nichts bekannt.

Ebenso konnte bisher noch keine direkte Interaktion von Ataxin-2 und Komponenten des nukleären Porenkomplexes wie NIC96 bzw. dessen Säugerorthologen festgestellt werden. Für eine spezifische Kolokalisation sprechen in diesem Fall jedoch diverse Experimente in Säugerzellen, in denen gezeigt wurde, dass Ataxin-2 auch an der Kernperipherie angereichert sein kann.^{69,89,118,119}

Eine Schätzung der diesbezüglichen Anteile der mit RFP kolocalisierenden GFP-Ataxin-2-C-Terminus-Foki an der Gesamtmenge der GFP-Foki, unter Einbeziehung aller Experimente, ergab ferner, dass Ataxin-2 besonders zur Kolokalisation mit PEX3-RFP neigte. In diesem Fall zeigten nämlich durchschnittlich ca. zwei Drittel der GFP-Foki mit RFP überlagerte Signale, wohingegen die Kolokalisationsanalysen mit NIC96, SPC42- und ANP1-RFP diesbezüglich lediglich Anteile von 50 – 60 % ergaben.

Weiterhin fiel hinsichtlich ANP1-RFP auf, dass der C-terminale Ataxin-2-Bereich nicht nur mit diesem kolocalisierte, sondern seine Expression bzw. Fokibildung häufig auch mit einer Reduzierung der ANP1-Foki-Anzahl pro Zelle einherging. Ein Effekt der in keinem der anderen Stämme offensichtlich war, was für seine Spezifität spricht. Somit könnte v. a. eine durch den Ataxin-2-C-Terminus vermittelte Störung der ANP1-Funktion oder der Funktion des Golgi-Apparates allgemein, eine Ursache für dessen starke zytotoxische Wirkung im *S. cerevisiae*-Modell gewesen sein (s. Abs. 4.1.1.).

Alles in allem zeigten die GFP-markierten Ataxin-2-Spaltprodukte somit im Vergleich miteinander ähnlich unterschiedliche Lokalisationsmuster in den RFP-Markerstämmen, wie sie zuvor bereits für Redstar-markierte Ataxin-2-Spaltprodukte im WT-Hefestamm beobachtet werden konnten (s. Abs. 4.1.2.). Das heißt der nicht toxische N-terminale Proteinabschnitt war erneut hauptsächlich diffus in den Zellen verteilt, und das zytotoxische C-terminale Spaltprodukt akkumulierte in nahezu allen transformierten Zellen.

Außerdem konnte für den Ataxin-2-N-Terminus keine Kolokalisation mit einem der RFP-Marker nachgewiesen werden. Dennoch hatte dessen Expression offenbar einen negativen Effekt auf die zelluläre SNF7-Fokibildung, was auf einen regulatorische Einfluss von Ataxin-2 auf die Endosomenbildung hinweisen könnte.

Demgegenüber kolocalisierten die Foki des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts mit vier der neun untersuchten Markerproteine. Dies waren der Peroxisomenmarker PEX3, der Golgi-Apparat-Marker ANP1, der Spindelpolkörper-Marker SPC42 sowie NIC96, ein Marker für die nukleären Porenkomplexe an der Kernperipherie. Dabei wird insbesondere die Spezifität der Kolokalisation des Ataxin-2-C-Terminus mit dem Golgi-Apparat durch frühere Studien unterstützt (s. o.). Hinzu kommt, dass exklusiv im ANP1-Stamm die Expression des Ataxin-2-C-Terminus bzw. dessen Fokibildung zu einer apparenten Abnahme der ANP1-RFP-Foki in den betroffenen Zellen führte. Dies ließ insgesamt vermuten, dass das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt seine zytotoxische Wirkung in o. g. Wachstumsanalysen zumindest teilweise durch eine Störung der Funktion des Golgi-Apparates vermittelt haben könnte (s. Abs. 4.1.1.).

Abgesehen davon könnte jedoch eine weitere Ursache für die zytotoxischen Effekte des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts auch eine Störung der zellulären Stress-Granula- oder P-Body-Bildung gewesen sein. Das sollte in den nachfolgend beschriebenen Mikroskopiestudien näher untersucht wurde.

4.1.4. Untersuchungen zu Effekten physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte auf die Bildung von Stress-Granula und P-Bodies

Es ist bekannt, dass Ataxin-2 eine Komponente von Stress-Granula (SG) in Säugerzellen ist, und es dort deren Bildung sowie die von P-Bodies (PB) dosisabhängig reguliert. Dasselbe gilt außerdem für das Ataxin-2-Hefe-Ortholog PBP1, das ein Bestandteil von Hefe-SG ist, und dessen Gendeletion zu Defiziten in der zellulären SG-Bildung infolge von Glc-Mangel führt.^{60,65,99,101}

Deshalb sollte geklärt werden, ob es sich bei den in o. g. Experimenten (s. Abs. 4.1.2. & 4.1.3.) detektierten Fluoreszenzfoki des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts oder bei den selten beobachteten N-Terminus-Foki um Hefe-SG gehandelt haben könnte. Ferner sollte dabei auch geprüft werden, ob die Foki mit PB kolokalisieren können, da diese besonders in Hefe in enger Beziehung zu SG stehen, und schließlich dienten die Experimente zudem dazu herauszufinden, ob die Expression des Ataxin-2-C-Terminus durch Beeinflussung der SG- oder PB-Bildung zytotoxisch in o. g. Wachstumstests gewirkt haben könnte (s. Abs. 4.1.1.).

Zu diesem Zweck wurden Fluoreszenzmikroskopie-Analysen mit zwei Hefestämmen (Invitrogen) durchgeführt, die GFP-Fusionsproteine von DHH1 und PBP1 exprimierten. Diese wurden, ähnlich wie o. g. RFP-Markerstämme (s. Abs. 4.1.3), via homologer Rekombination konstruiert, wobei die kodierende Sequenz des GFP-Gens in die chromosomale DNA der Hefezellen integriert worden war. Sie exprimierten damit ebenfalls konstitutiv Fusionsproteine, die C-terminal mit GFP gekoppelt waren. Der DHH1-GFP-Stamm sollte dabei zur Visualisierung der PB dienen. Der PBP1-GFP-Stamm hingegen sollte als SG-Markerstamm fungieren. In diesen Zusammenhang wurden auch Untersuchungen mit Cycloheximid (CHX) durchgeführt, das durch Blockierung von translatierender mRNA in Polysomen die SG-Bildung spezifisch inhibiert. Dies sollte helfen zu eindeutigen Aussagen darüber zu gelangen, ob die zellulären Anreicherungen des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts Hefe-SG sind oder nicht.^{99,208,263}

Für die Kolokalisationsanalysen mit o. g. Stämmen wurden allerdings in diesem Fall, aufgrund der GFP-Markierung der Proteinmarker wieder Redstar-markierte Ataxin-2-Spaltprodukte genutzt. Diese waren identisch mit den in Abb. 4.1A dargestellten Fusionsproteinen, jedoch wurde für ihre exogene Expression das p416GPD-Plasmid verwendet. Das bedeutet, dass sie nicht wie in den vorherigen Experimenten galaktose-induzierbar sondern konstitutiv exprimiert wurden, da sie in diesem Fall durch den GPD (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)-Promotor reguliert worden waren. Auf diese Weise sollte die Nutzung von Galaktose bzw. der Entzug von Glucose als Kohlenstoffquelle für die Hefezellen vermieden werden, da dadurch die Gefahr unerwünschter artifizieller zellulärer Stressreaktionen bestand.

Zunächst wurde jedoch in Kontrollexperimenten die Eignung der Markerstämme für die Analysen überprüft, d. h. es wurde deren PB- und SG-Bildungsfähigkeit, unter Standard- und unter Stressbedingungen, in nicht transformierten Zellen untersucht.

4.1.4.1. Analyse der Fokibildung in den Hefestämmen DHH1-GFP und PBP1-GFP unter Standard- und Stressbedingungen

Um die Lokalisation von DHH1- und PBP1-GFP zu untersuchen wurden als erstes auf Festmedium wachsende Einzelklone der entsprechenden Stämme in Selektionsmedium (CSM/Glc/-U) über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden daraufhin am Folgetag in frischem Selektionsmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,4 eingestellt und 5 – 6 h Stunden bei 30°C schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurde einem Aliquot dieser Suspensionen Natriumazid NaN_3 bis zu einer Endkonzentration von 1 % (w/v) zugegeben, und dieses für eine halbe Stunde weiter bei 30°C inkubiert, um so oxidativen Stress zu induzieren. Ein zweites Aliquot wurde hingegen für weitere 15 min bei 46°C inkubiert, was der Induktion von Hitzestress dienen sollte. Schließlich wurde zudem ein drittes Aliquot, das keinem Stressor ausgesetzt worden war, wie die NaN_3 -Probe für weitere 30 min bei 30°C im Inkubator geschüttelt. Daraufhin wurden die Proben wie in Abs. 4.1.2. beschrieben einmal gewaschen und mikroskopiert. Dabei entstandene Mikroskopieaufnahmen die repräsentative zelluläre Verteilung der GFP-Markerproteine zeigen, sind in Abb. 4.5. zu sehen.

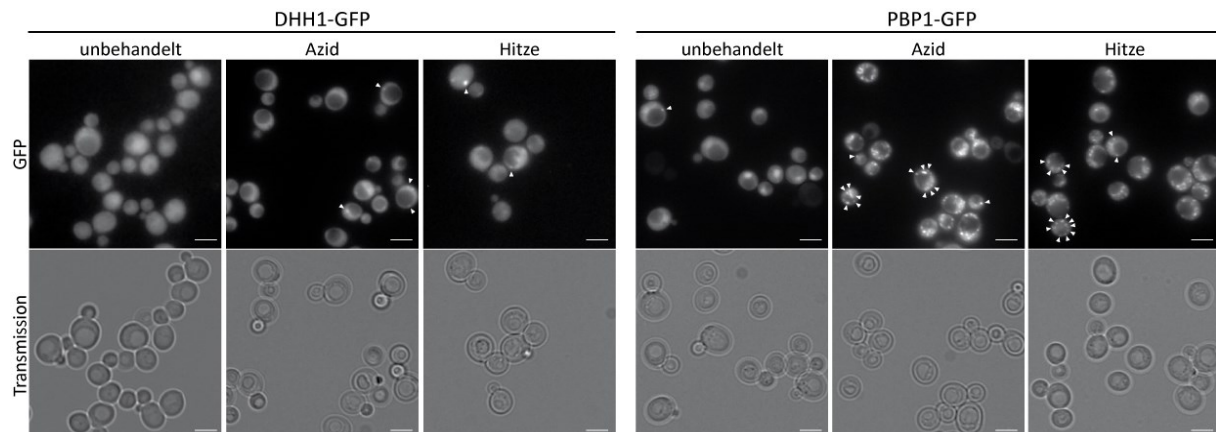


Abb. 4.5 Mikroskopische Analyse der Lokalisation und Fokibildung chromosomal exprimierter GFP-Fusionsproteine von PBP1 und DHH1 in *S. cerevisiae* (Kontrollversuche zur PB- oder SG-Bildung). Die Bilder zeigen Zellen der rekombinanten Hefestämme DHH1-GFP (links) und PBP1-GFP (rechts) unter Standardbedingungen (Spalte 1 & 4) oder unter Stress, induziert durch Behandlung mit 1 % (w/v) NaN_3 für 30 min (Spalte 2 & 5) oder durch akuten Hitzeschock für 15 min bei 46°C (Spalte 3 & 6). Die endogen exprimierten GFP-Fusionsproteine zeigten in unbehandelten Zellen eine typische, zelluläre Verteilung, die der in der „*yeast GFP fusion localization database*“ annotierten entsprach. Im Fall von PBP1-GFP konnte SG-Bildung beobachtet werden (Pfeilspitzen: GFP-Foki, Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 μm).

An diesen lässt sich erkennen, dass PBP1-GFP erwartungsgemäß in nicht gestressten Zellen nur sporadisch, d. h. in ca. 1 – 5 % der Zellen, Foki bildete (s. Abb. 4.5 rechts). Demgegenüber bewirkte die Applikation von sowohl NaN_3 als auch Hitze eine drastische Erhöhung der Anzahl an PBP1-Foki, wobei der Anteil fokipositiver fluoreszierender Zellen auf 80 – 90 % anstieg. Das weist darauf hin, dass es sich bei diesen Foki tatsächlich um Hefe-SG handelte. Diese Beobachtungen sind damit auch in Übereinstimmung mit o. g. Berichten, in denen PBP1 als SG-Komponente identifiziert wurde.⁹⁹ Der PBP1-GFP-Stamm konnte somit in den Kolokalisationsanalysen als SG-Markerstamm eingesetzt werden.

Andererseits konnten in DHH1-GFP exprimierenden, unbehandelten Zellen keine DHH1-GFP-Foki sondern ausschließlich diffus verteiltes Fusionsprotein detektiert werden (s. Abb. 4.5 links). Zudem war diesbezüglich die Fokibildung auch in stressbehandelten Zellen nur äußerst schwach ausgeprägt, was für beide Stressarten gleichermaßen galt. Dies war zunächst unerwartet, da DHH1 bereits als spezifische PB-Komponente identifiziert worden war.^{101,159,160,162,173,179,183,191} Allerdings wurden erstens in vielen dieser Experimente überexprimierte DHH1-GFP Fusionsproteine untersucht, deren Verhalten von konstitutiv exprimiertem DHH1-GFP abweichen könnte. Zudem wurde in jenen der o. g. Analysen, die auch mit dem hier genutzten DHH1-GFP-Stamm durchgeführt wurden, oft lediglich die DHH1-Kolokalisation mit PB-Markern in stressbehandelten Zellen untersucht bzw. dargestellt. Deshalb muss das hier beobachtete Ausbleiben von DHH1-Fokibildung (s. Abb. 4.5 links) zumindest im Fall nicht gestresster Zellen nicht notwendigerweise artifiziell gewesen sein. Dafür spricht zudem, dass im entsprechenden Eintrag der bereits zuvor erwähnten GFP-Protein-Lokalisationsdatenbank (s. Abs. 4.1.3.), der sich auf ungestresste Zellen des auch hier genutzten DHH1-Stamms

bezieht, ebenfalls keine DHH1-GFP-Fokibildung beschrieben ist. Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass DHH1 zwar spezifisch PB markiert allerdings nicht essentiell für deren Bildung ist, und schließlich hatte sich zudem ergeben, dass die Rekrutierung von DHH1 zu PB von diversen Faktoren, wie z. B. der Hefe-Wachstumsphase, beeinflusst werden kann.^{159,173,179} Alles in allem konnte also trotz der nur schwachen DHH1-GFP-Fokibildung, die zudem ausschließlich in gestressten Zellen beobachtet wurde (s. Abb. 4.5 links), davon ausgegangen werden, dass der untersuchte Stamm tatsächlich DHH1-GFP exprimiert. Wofür auch spricht, dass dessen GFP-Insertion an das 3'-Ende der kodierenden Region von DHH1 mittels DNA-Sequenzierung validiert werden konnte. Als PB-Marker war der Stamm jedoch aufgrund dieser Ergebnisse eher ungeeignet. Da allerdings bereits bekannt war, dass Ataxin-2 und das humane DHH1-Homolog DDX6 interagieren, wurde der DHH1-GFP-Stamm dennoch in den folgenden Analysen eingesetzt, um mögliche Interaktionen zwischen den Spaltprodukten und DHH1 zu erkennen.⁶⁵

4.1.4.2. Untersuchungen zur Kolokalisation physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte mit DHH1-GFP und PBP1-GFP unter Standardbedingungen

Auf Grundlage o. g. Kontrolleexperimente konnten somit erste Untersuchungen zur Kolokalisation der durch die Ataxin-2-Spaltprodukte gebildeten Foki (s. Abs. 4.1.2. & 4.1.3.) mit PBP1- oder DHH1-GFP unter Standardbedingungen durchgeführt werden.

Dazu wurden beide GFP-Markerstämme zunächst mit o. g. Plasmiden transformiert, die Redstar-markierte Ataxin-2-Spaltprodukte via GPD-Promotor konstitutiv exprimierten (s. Abs. 4.1.4.). Auf CSM/Glc/-U-Festmedium selektierte Einzelklone dieser Transformationen wurden daraufhin, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, in Suspensionskulturen über Nacht herangezogen. Am Folgetag wurde die OD₆₀₀ der Kulturen auf 0,4 eingestellt, woraufhin die verdünnten Kulturen bei 30°C für 5 – 6 h inkubiert und anschließend wie o. g. mikroskopiert (s. Abs. 4.1.2.) wurden. Repräsentative Mikroskopiebilder dieser Experimente sind in Abb. 4.6 dargestellt.

Außerdem wurden im Zuge dieser Untersuchungen zusätzlich Zellklone beider GFP-Stämme untersucht, die mit dem Leervektor (p416GDP) transformiert worden waren, um zu kontrollieren ob dessen Expression die Bildung von SG oder DHH1-Foki beeinflusst. Dies konnte jedoch nicht festgestellt werden, so dass ein artifizieller Einfluss der Vektorexpression *per se* für die Kolokalisationsanalysen ausgeschlossen werden konnte (nicht gezeigt, da den Aufnahmen aus Abb. 4.5 in Abs. 4.1.4.1 entsprechend).

In den Kolokalisationsstudien konnte allerdings bereits unter Standardbedingungen, bezüglich der zellulären Verteilung des N-terminalen Spaltprodukts, ein auffälliger Unterschied zu dessen GAL1-Promotor regulierten Varianten festgestellt werden (s. Abs. 4.1.2 & 4.1.3.). Anders als diese Fusionsproteine, die fast immer diffus in den Hefezellen verteilt waren, bildete der GPD-Promotor-regulierte Redstar-Ataxin-2-N-Terminus nämlich diskrete Foki in der Mehrheit (ca. 80 – 90 %) der fluoreszierenden Zellen (vgl. Abb. 4.2 & 4.3 mit 4.6 obere Bildreihen). Diese waren im Querschnitt meist zirkulär bis oval und selten auch langgezogen. Außerdem waren sie sehr häufig an der Zellperipherie zu beobachten. Darüber hinaus kolokalisierten sie in einigen Zellen mit DHH1-GFP-Foki, wobei sich diese DHH1-Foki jedoch oft nur schwach von der Hintergrundfluoreszenz abhoben, was für eine eher geringe DHH1-Anreicherung in den N-Terminus-Foki spricht (s. Abb. 4.6A oben).

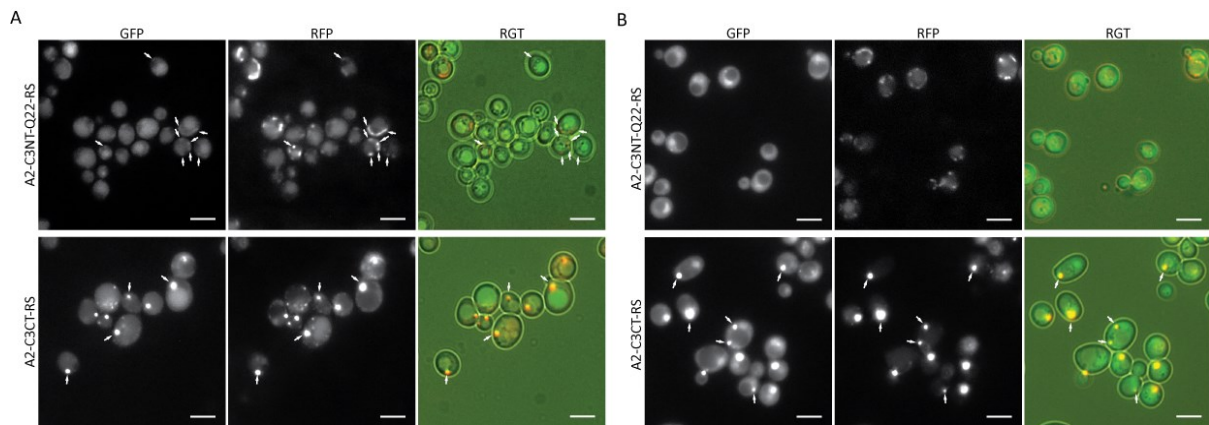


Abb. 4.6 Mikroskopiestudien zu Lokalisation und Fokibildung konstitutiv exprimierter, fluoreszenzmarkierter Ataxin-2-Spaltprodukte in unbehandelten Zellen der Hefestämme DHH1-GFP (A) und PBP1-GFP (B) (Kontrollexperiment). Das N-terminale Redstar-markierte Ataxin-2-Spaltprodukt (oben in (A) & (B)) zeigte unter diesen Bedingungen (konstitutive, Glc-regulierte Expression) Fokibildung, wobei N-Terminus-Foki mit DHH1-GFP aber nicht PBP1-GFP kolokalisierten. Der Redstar-markierte Ataxin-2-C-Terminus (unten in (A) & (B)) bildete häufig Foki, die zudem häufig mit DHH1-GFP und PBP1-GFP kolokalisierten. Die Aufnahmen stehen repräsentativ für die Ergebnisse aus sechs unabhängigen Experimenten. (Pfeile: kolocalisierende Redstar-/ GFP-Foki, Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 μ m, RGT: Überlagerungsbild des RFP-, GFP- und Transmissionskanals)

Andererseits konnte für das N-terminale Redstar-markierte Spaltprodukt im PBP1-GFP-Stamm keine Kolokalisation mit dem SG-Marker beobachtet werden (s. Abb. 4.6B). Dies kann allerdings wiederum als Indiz für die Spezifität der o. g. N-Terminus-Kolokalisation mit DHH1-GFP angesehen werden.

Der konstitutiv exprimierte, Redstar-markierte Ataxin-2-C-Terminus zeigte hingegen im DHH1- und PBP1-GFP-Stamm ähnliche zelluläre Verteilungsmuster wie seine GAL1-Promotor-abhängig exprimierten Formen im WT-Hefestamm (s. Abs. 4.1.2 & 4.1.3). So konnte auch in diesem Fall in einem Großteil (ca. 80 – 90 %) der Zellen, die das C-terminale Spaltprodukt exprimierten, beobachtet werden, dass es in Foki verschiedener Größen (s. Abb. 4.6 unter Bilderreihe) angereichert war. Diese kolokalisierten zudem nahezu immer mit den GFP-Signalen des DHH1- oder PBP1-Fusionsproteins, die dementsprechend ebenfalls als diskrete GFP-Signale zu erkennen waren. Das bedeutet somit, dass in diesen Experimenten, anders als in jenen mit untransformierten (s. v. Abs.) oder Leervektor (s. o.) exprimierenden GFP-Stämmen (s. Abb. 4.5), bereits ohne Applikation eines exogenen Stresses sowohl PBP1- als auch DHH1-GFP-Foki gebildet wurden. Dabei handelte es sich jedoch hauptsächlich um mit dem C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukt kolokalisierte Foki, die oft auch großflächiger waren als die PBP1-GFP-positiven SG aus o. g. Kontrollversuchen (s. v. Abs.).

Dies könnte einerseits bedeuten, dass die Expression des C-terminalen Spaltprodukts zu einer zellulären Stressreaktion geführt hatte, aufgrund derer anormal große PBP1- und DHH1-positive SG gebildet wurden, die den Ataxin-2-C-Terminus zu sich rekrutierten. Andererseits könnte es sich bei den beobachteten, kolokalisierten Foki jedoch auch um proteinreiche, aggresomenartige Strukturen gehandelt haben, die im Gegensatz zu SG auch unabhängig von nicht translatierender mRNA entstehen können. Um diese Frage zu beantworten sollte im Folgenden überprüft werden, ob für die Bildung der Ataxin-2-Spaltprodukt- sowie der DHH1- und PBP1-Foki nicht translatierende mRNA benötigt wird, wozu der Translationsinhibitor Cycloheximid eingesetzt wurde.

4.1.4.3. Untersuchungen zur Fokibildung von Ataxin-2-Spaltprodukten, DHH1 und PBP1 bei zellulärem Stress und unter Einfluss von Cycloheximid

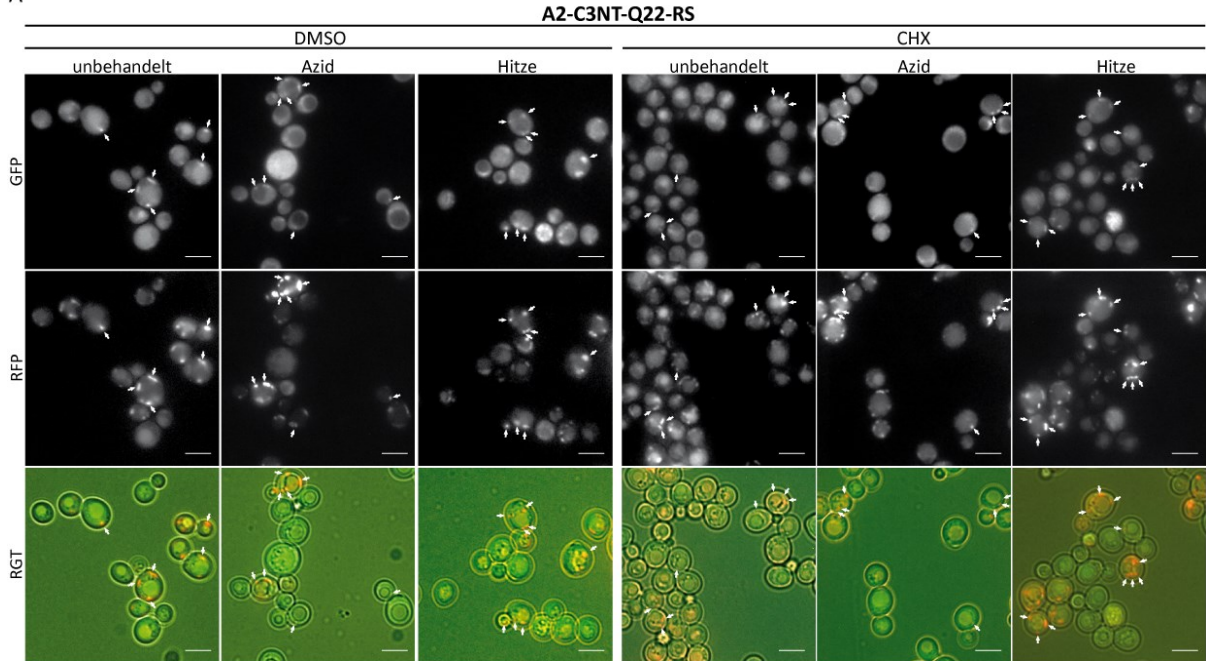
Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, bildete sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Redstarmarkierte Ataxin-2-Spaltprodukt bei konstitutiver Expression diskrete Fluoreszenzfoki in nicht stressbehandelten Hefezellen. Dabei waren die Foki des Ataxin-2-N-Terminus gelegentlich mit DHH1-GFP, und die des C-Terminus in nahezu allen Fällen mit DHH1- und PBP1-GFP kolokalisiert. Die Spaltproduktexpression führte demnach bereits unter optimalen Wachstumsbedingungen zur DHH1- und PBP1-Fokibildung. Dabei waren die PBP1-GFP-Foki sehr häufig mit dem Ataxin-2-C-Terminus kolokalisiert, und sie fluoreszierten meist sehr viel stärker als die PBP1-GFP-positiven *bona fide* SG aus o. g. Kontrollversuchen (s. Abs. 4.1.4.1.). Dies ließ vermuten, dass die mit den Ataxin-2-Spaltprodukten kolokalisierenden PBP1- oder DHH1-Foki möglicherweise keine herkömmlichen Hefe-SG oder PB gewesen sein könnten. Aus diesem Grund sollte als nächstes überprüft werden, ob die Bildung dieser Foki analog zur SG oder PB-Bildung durch Cycloheximid (CHX) beeinflusst wird, wozu stressbehandelte mit unbehandelten Zellen verglichen wurden.

Die Durchführung der Experimente erfolgte dabei prinzipiell wie zuvor beschrieben (s. v. Abs.). Allerdings wurden die zu untersuchenden Suspensionskulturen der transformierten Zellen hierbei vor den mikroskopischen Analysen ähnlich wie in Abs. 4.1.4.1. erläutert in Aliquots aufgeteilt und mit Stress behandelt. In diesem Fall wurden jedoch sechs Aliquots hergestellt. Zwei von diesen Ansätzen wurden daraufhin für eine halbe Stunde bei 30°C mit NaN₃ inkubiert und zwei weitere für 15 min einem Hitzeschock bei 46°C ausgesetzt. Die übrigen zwei Aliquots dienten ferner als Kontrollproben, die keinem Stress ausgesetzt wurden. Weiterhin wurde in je ein Aliquot dieser drei Paare CHX bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugefügt. In das jeweils andere Aliquot wurde hingegen DMSO gegeben, und zwar im gleichen Verdünnungsverhältnis wie die CHX-Stammlösung. Die DMSO-Proben wurden dabei als Lösungsmittelkontrollen angesetzt, d. h. als Referenzproben mit der potentiell vorstellbare, unspezifische Einflüsse des CHX-Lösungsmittels DMSO auf die Fokibildung erkannt werden sollten. Die Ergebnisse dieser Analysen sind für den DHH1-GFP-Stamm in Abb. 4.7 und für den PBP1-GFP-Stamm in Abb. 4.8. in Form repräsentativer Mikroskopieaufnahmen dargestellt.

Diesbezüglich sei zunächst erwähnt, dass der DMSO-Einsatz in den Lösungsmittelkontrollen die Fokibildung der Ataxin-2-Spaltprodukte in unbehandelten Zellen nicht beeinflusste (s. Abb. 4.7 & 4.8 jeweils 1. Spalte), wie ein Vergleich mit den Ergebnissen aus o. g. Mikroskopieanalysen ergab (s. Abb. 4.6). Auch in den DMSO-Kontrollproben wurde also durchschnittlich in ca. 80 – 90 % der Zellen, die das N- oder C-terminale Spaltprodukt exprimierten, deren Fokibildung beobachtet. Ebenso war zudem das Ausmaß der Kolokalisation der Spaltprodukt-Foki mit den GFP-Fusionsproteinen von DMSO unbeeinflusst. So waren die N-Terminus-Foki wieder teilweise mit DHH1-GFP und die C-Terminus-Foki annähernd immer mit sowohl DHH1- als auch PBP1-GFP-Foki kolokalisiert.

Ferner führte die Anwendung von Azid oder Hitze in den DMSO-Kontrollansätzen des DHH1-GFP-Stamms zu keiner veränderten, zellulären Fluoreszenzfokibildung (s. Abb. 4.7 linke Hälfte). Entsprechend konnten auch hier ausschließlich DHH1-GFP-Foki detektiert werden, die mit Redstar-Spaltprodukt-Foki (N- und C-Terminus) kolokalisierten. Außerdem waren die Anteile der Zellen die Spaltprodukt-Foki bildeten relativ zur Gesamtmenge der Zellen mit Redstar-Fluoreszenz sehr ähnlich zu denen der ungestressten Proben, und lagen für beide Spaltprodukte entsprechend bei etwa 80 – 90 % (s. o.).

A



B

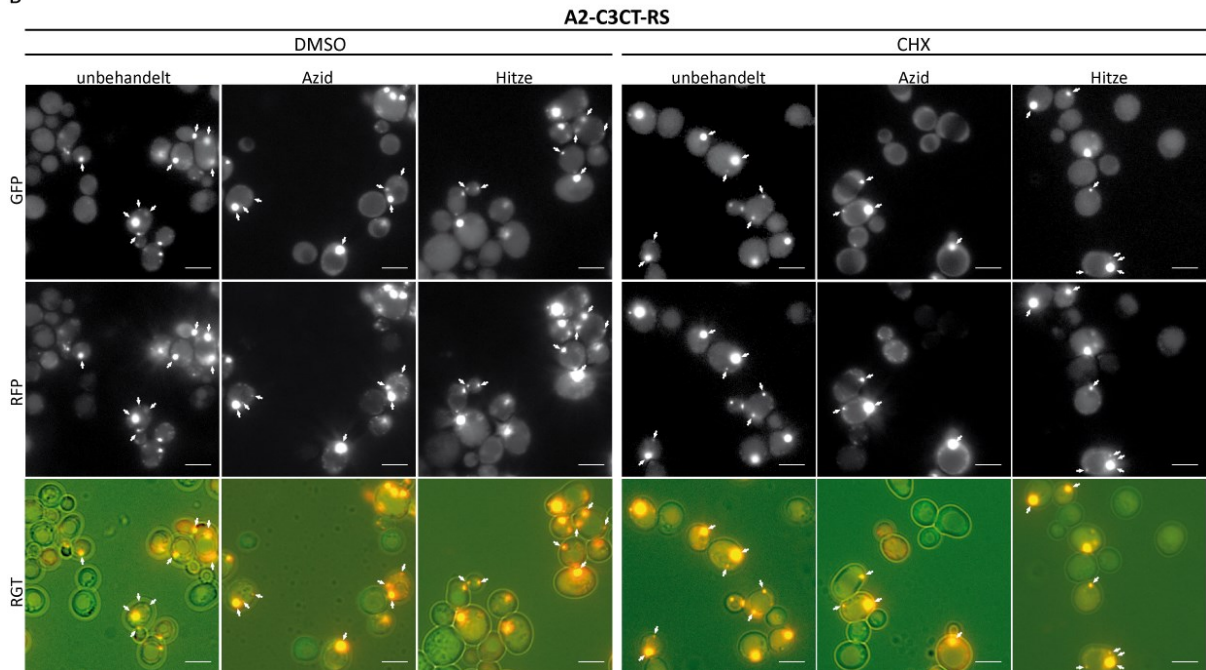
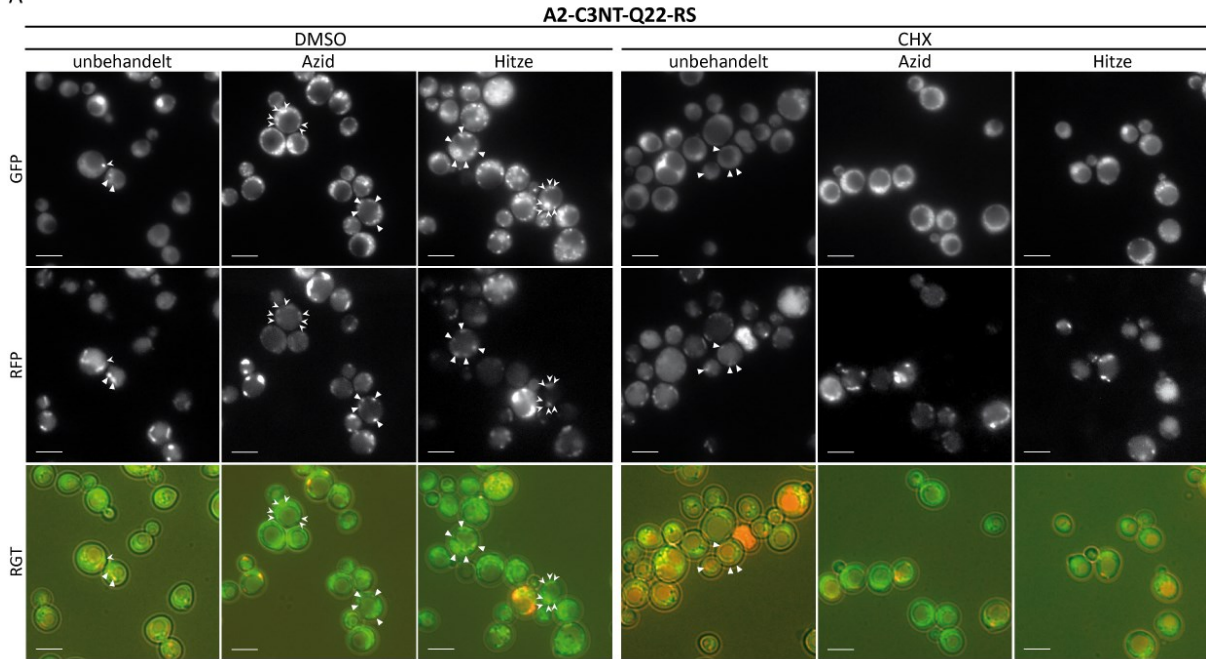


Abb. 4.7 Mikroskopische Untersuchungen zum Einfluss von Cycloheximid (CHX) auf die Fokibildung konstitutiv exprimierter, fluoreszenzmarkierter Ataxin-2-Spaltprodukte im Hefestamm DHH1-GFP. (A) Aufnahmen von Zellen die Redstar-markierten Ataxin-2-N-Terminus exprimierten. (B) Aufnahmen von Zellen die Redstar-markierten Ataxin-2-C-Terminus exprimierten. Die Abbildungen zeigen repräsentative zelluläre Lokalisation & Fokibildung der Spaltprodukte und des DHH1-GFP ausgehend von jeweils sechs unabhängig untersuchten Proben. Die drei linken Spalten in (A) & (B) zeigen Ergebnisse aus Kontrollexperimenten, in denen die Zellen mit DMSO anstatt CHX behandelt wurden, um potentielle Lösungsmittelleffekte auszuschließen. Die Aufnahmen der 3 rechten Spalten in (A) & (B) hingegen zeigen CHX-behandelte Zellen. Zusätzlich wurden die Zellen dabei für 30 min in 1 % (w/v) NaN₃ inkubiert (Spalte 2 & 5) oder für 15 min Hitzestress bei 46°C (Spalte 3 & 6) ausgesetzt. Kontrollzellen (Spalte 1 & 4) wurden währenddessen für 30 min unter Standardbedingungen kultiviert. Beide Spaltprodukte bildeten Foki, die stets mit DHH1-GFP-Foki kolokalisierten. Abgesehen von diesen kolokalysierenden Foki bildeten die Zellen des DHH1-GFP-Stamms keine bzw. äußerst selten weitere GFP-Foki. Die Fokibildung der Spaltprodukte entsprach ansonsten der in o. g. Kontrollversuchen (s. Abb. 4.6.), d. h. weder DMSO oder CHX noch jegliche Stressbehandlung beeinflusste die Entstehung der Spaltprodukt-Foki. (Pfeile: kolokalysierende Redstar-/ GFP-Foki, Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 µm RGT: Überlagerungsbild des RFP-, GFP- und Transmissionskanals)

A



B

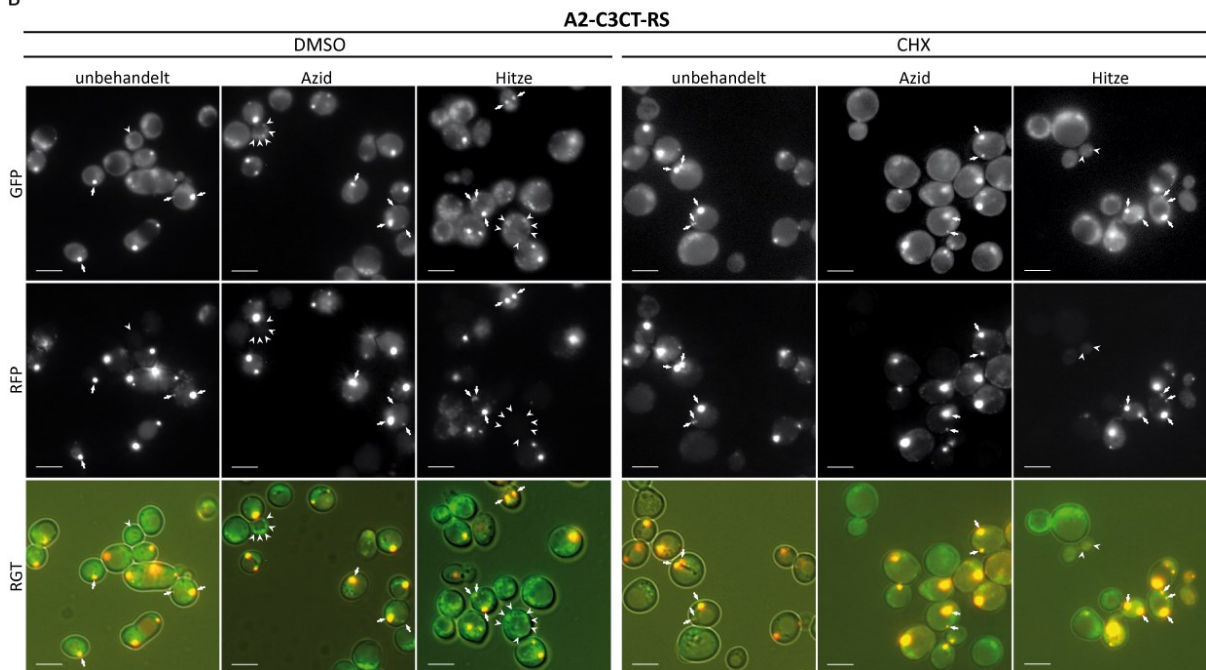


Abb. 4.8 Mikroskopische Untersuchungen zum Einfluss von Cycloheximid (CHX) auf die Fokibildung konstitutiv exprimierter, fluoreszenzmarkierter Ataxin-2-Spaltprodukte im Hefestamm PBP1-GFP. (A) Aufnahmen von Zellen die Redstar-markierten Ataxin-2-N-Terminus exprimierten. **(B)** Aufnahmen von Zellen die Redstar-markierten Ataxin-2-C-Terminus exprimierten. Die Abbildungen zeigen repräsentative zelluläre Lokalisation & Fokibildung der Spaltprodukte und des PBP1-GFP ausgehend von jeweils sechs unabhängig untersuchten Proben. Die drei linken Spalten in (A) & (B) zeigen Ergebnisse aus DMSO-Kontrollexperimenten, die drei rechten Spalten zeigen CHX-behandelte Zellen. Um SG-Bildung zu induzieren wurden die Zellen für 30 min in 1% (w/v) NaN_3 (Spalte 2 & 5) oder für 15 min bei 46°C (Spalte 3 & 6) inkubiert. Kontrollzellen (Spalte 1 & 4) wurden für 30 min unter Standardbedingungen kultiviert. Beide Spaltprodukte bildeten Foki, wobei nur die des C-terminalen Spaltprodukts mit PBP1-GFP kolokalisierte. Dabei war die Bildung der Spaltprodukt-Foki unabhängig von DMSO oder CHX sowie von Stressbehandlung. Der Anteil an nicht mit dem C-Terminus kolokalysierenden PBP1-GFP-Foki (s. Zellen aus (A) oder C-Terminus-Foki-negative Zellen aus (B)) stieg jedoch durch Stressbehandlung an und konnte durch CHX inhibiert werden. (Pfeile: kolokalysierende Redstar-/ GFP-Foki, dreieckige Pfeilspitze: nicht kolokalysierende Redstar-Foki, viereckige Pfeilspitze: nicht kolokalysierende GFP-Foki, Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 μm RGT: Überlagerungsbild des RFP-, GFP- und Transmissionskanals)

Andererseits konnte durch Stressbehandlung der DMSO-Kontrollproben des PBP1-GFP-Stamms eine Induktion der PBP1-GFP-Fokibildung im Vergleich zu unbehandelten Proben beobachtet werden (s. Abb. 4.8 linke Hälfte). Dennoch stieg in diesen Fällen weder die Anzahl der Foki des N-terminalen noch des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts, d. h. die stressabhängig gebildeten GFP-Foki waren meist nicht mit den Spaltprodukt-Foki kolokalisiert.

Dabei fiel außerdem auf, dass in Zellen die N-Terminus-Foki bildeten, diese häufig zusammen mit stressabhängig entstandenen, jedoch nicht mit dem N-Terminus kolokalisierenden PBP1-GFP-Foki auftraten (s. Abb. 4.8A links). Dagegen zeigten C-Terminus-Foki bildende Zellen sehr selten simultan auftretende, nicht mit dem C-Terminus kolokalisierende PBP1-GFP-Foki bei Azid- oder Hitzestress-Anwendung (s. Abb. 4.8B links). In diesem Fall beschränkte sich dementsprechend die stressvermittelte Zunahme PBP1-GFP-positiver Foki auf Zellen die das C-terminale Spaltprodukt nicht bzw. nicht detektierbar exprimierten.

Die annähernd absolute Kolokalisation der PBP1-Foki mit den C-Terminus-Foki führte ferner dazu, dass die durchschnittlich festgestellte PBP1-Foki-Anzahl pro Zelle in den C-Terminus exprimierenden Zellen beim Vergleich gestresster und ungestresster Zellen relativ konstant war. In dieser Hinsicht unterschieden sich somit die C-Terminus exprimierenden PBP1-GFP-Zellen von untransformierten und N-Terminus exprimierenden Zellen, in denen die mittlere PBP1-GFP-Foki-Anzahl pro Zelle durch Stressapplikation zunahm (vgl. Abb. 4.5 rechts & 4.8A links mit Abb. 4.8B links).

Insgesamt konnte also durch Stressbehandlung in den DMSO-Kontrollproben lediglich eine Erhöhung von nicht mit den Spaltprodukten kolokalisierten PBP1-GFP-Foki beobachtet werden, die zudem in C-Terminus exprimierenden Zellen relativ schwach war (s. o.). Im Vergleich dazu war diese relative Zunahme an PBP1-GFP-Foki unter Stressbedingungen in den unter CHX-Einwirkung mit Hitze oder Azid gestressten Zellen nicht mehr festzustellen, was sich aus o. g. Gründen besonders gut an den Ataxin-2-N-Terminus exprimierenden Zellen erkennen ließ (s. Abb. 4.8A, vgl. DMSO & CHX).

Der Translationsinhibitor beeinflusste allerdings weder die Fokibildung des N-terminalen noch die des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts in beiden GFP-Stämmen (s. Abb. 4.7 & 4.8). Gleichfalls hatte er zudem keinen Effekt auf die Kolokalisation der GFP-Proteine mit den Redstar-Spaltprodukt-Foki. So konnte in den CHX- ebenso wie in den DMSO-Ansätzen unabhängig von exogenem Stress für DHH1-GFP gelegentlich Kolokalisation mit Ataxin-2-N-Terminus-Foki und häufig Kolokalisation mit den C-Terminus-Foki festgestellt werden (s. Abb. 4.7). Entsprechend war auch PBP1-GFP unter CHX-Einfluss genau wie in den DMSO-Kontrollproben in Foki konzentriert, die nahezu immer mit dem C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukt kolokalisierten (s. Abb. 4.8). Man kann somit insgesamt davon ausgehen, dass die Ataxin-2-Spaltprodukt-Foki sowie die damit kolokalisierenden PBP1-GFP- oder DHH1-GFP-Foki aufgrund ihrer CHX-Resistenz keine SG bzw. PB gewesen sind. Ihre dementsprechende Unabhängigkeit von freien mRNA-Transkripten weist zudem darauf hin, dass es sich bei ihnen um aggregationsartige Proteinansammlungen gehandelt haben könnte.

Ferner war die Bildung CHX-regulierbarer PBP1-Foki in den C-Terminus exprimierenden Zellen im Vergleich zu N-Terminus exprimierenden oder untransformierten Zellen sehr schwach (s. o.). Dies lässt somit vermuten, dass die C-Terminus-Foki die SG-Bildung gestört haben könnten. Da PBP1-GFP zudem mit den C-Terminus-Foki kolokalisierte, könnte diese Störung entsprechend durch das Zurückhalten des für die SG-Entstehung wichtigen PBP1 in den beobachteten CHX-resistenten C-Terminus-Foki verursacht worden sein. Ähnliche Sequestrierungsmechanismen könnten demnach ebenso auf alle in den bisherigen Versuchen entdeckten, mit dem Ataxin-2-C-Terminus kolokalisierenden Hefeproteine wirken (s. Abs. 4.1.3. & 4.1.4.). Da dies für den

C-Terminus im Vergleich zum N-Terminus relativ viele Proteine waren, könnte dementsprechend multiple Proteinsequestrierung durch die C-Terminus-Foki eine Vielzahl mehr oder weniger spezifische zellschädigende Einflüsse ausüben, was schließlich auch ein Grund für die starke Zytotoxizität dieses Spaltprodukts in o. g. Wachstumsanalysen gewesen sein könnte (s. Abs. 4.1.1.).

Insgesamt konnte also festgestellt werden, dass der C-terminale Ataxin-2-Bereich nicht nur stark zytotoxisch in Hefe wirkt, sondern zudem mit PBP1 interagiert. Dieses wurde wiederum kürzlich als Modifikator der Toxizität von TDP-43 in einem Proteinopathie-Hefemodell identifiziert.^{153,265} Deshalb sollte als nächstes überprüft werden, ob die Ataxin-2-Spaltprodukte ebenfalls modifizierend auf die TDP-43-Toxizität in diesem Modell wirken. Zudem sollten TDP-43 und die Spaltprodukte mittels Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich ihrer Lokalisation und eventuellen Koloalokalisation untersucht werden, um Hinweise auf mögliche direkte Interaktionen zwischen ihnen zu erhalten.

4.1.5. Studien zu Effekten der Expression physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte in einem TDP-43-Proteinopathie-Hefemodell

4.1.5.1. Wachstumsanalysen in TDP-43 exprimierenden Hefezellen

Anders als für vollständiges Ataxin-2 konnte, wie in Abs. 4.1.1. beschrieben, für das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt eine starke zytotoxische Wirkung bei Überexpression in Wachstumsanalysen nachgewiesen werden. Dieser Ataxin-2-Abschnitt koloalisierte zudem mit PBP1 (s. Abs. 4.1.4.), welches zuvor bereits als dosisabhängiger Regulator der Zytotoxizität von TDP-43 erkannt worden war.¹⁵³ Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch die Ataxin-2-Spaltprodukte einen Einfluss auf die TDP-43-Toxizität ausüben können.

Dazu wurde ein kürzlich etabliertes humanisiertes TDP-43-Proteinopathie-Hefemodell genutzt mit dem zytotoxische Effekte durch galaktose-induzierte TDP-43-Expression simuliert werden können. Die dafür benötigten TDP-43-Vektoren wurden freundlicherweise von Hr. Dr. A. Gitler zur Verfügung gestellt, in dessen Arbeitsgruppe das ALS-Hefemodell entwickelt worden war.²⁶⁵

Die Durchführung der Experimente ähnelte dabei der in Abs. 4.1.1. beschriebenen Vorgehensweise. So wurden auch hier zunächst Zellen des WT-Stamms mit galaktose-induzierbaren rekombinanten Plasmiden transformiert. Dabei wurden jedoch anders als in o. g. Experimenten Kotransformationen mit je zwei Plasmiden pro Ansatz durchgeführt, da in diesem Fall wie erwähnt die Interaktion zweier exogen exprimierter Proteine bzw. Proteinisoformen untersucht werden sollte. Eines der Plasmide enthielt dabei die kodierende Sequenz des TDP-43-Proteins. Das jeweils andere Plasmid hingegen kodierte für eine von fünf Ataxin-2-Isoformen, deren Einfluss auf die TDP-43-Zytotoxizität in diesem Modell untersucht werden sollte (s. Abb. 4.9A). Bei diesen fünf Isoformen handelte es sich zum einen um die in Abs. 4.1.1. vorgestellten nicht markierten Ataxin-2-Spaltprodukte sowie vollständiges, nicht pathogenes Ataxin-2. Zum anderen gehörte in diesem Fall eine auf 79 Q-Repeats expandierte, d. h. pathogene Variante des kompletten Ataxin-2 sowie ein entsprechendes N-terminales Ataxin-2-Spaltprodukt zu den analysierten Isoformen (s. Abb. 4.9 oben).

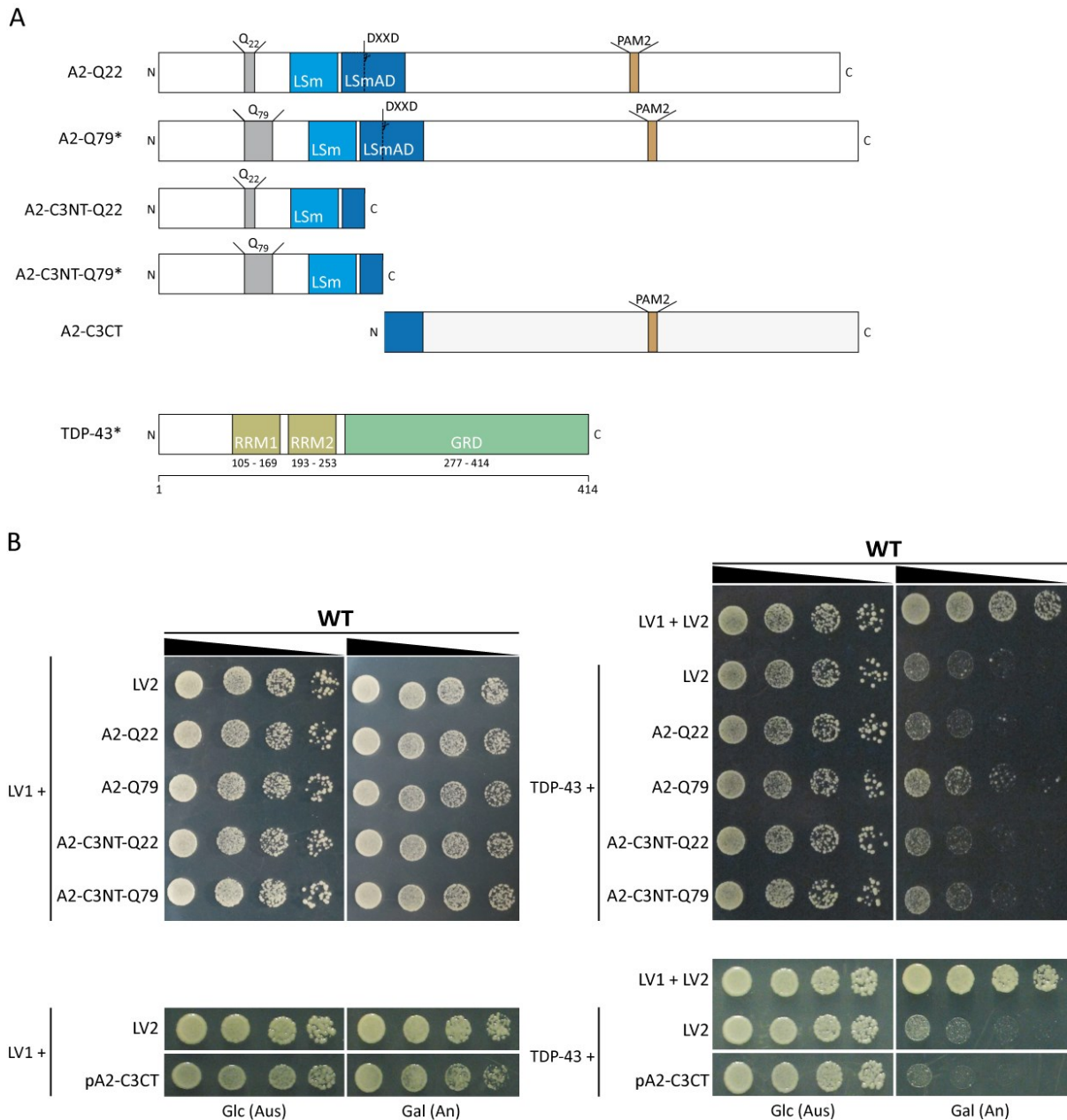


Abb. 4.9 Untersuchungen zu modifizierenden Einflüssen der Expression von Ataxin-2 und seiner physiologischen Spaltprodukte auf die TDP-43-Zytotoxizität in *S. cerevisiae* (A) Funktionelle Struktur der untersuchten rekombinanten Ataxin-2-Isoformen (s. a. Abb. 4.1A). Zuvor in dieser Arbeit noch nicht untersuchte Fusionsproteine (Asterisk) waren vollständiges Ataxin-2 mit 79 Q-Repeats (A2-Q79), das entsprechende N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt (A2-C3NT-Q79) & TDP-43 (RRM: *RNA recognition motif*, GRD: glycinreiche Domäne) (B) Fotografien von Wachstumsanalysen mit WT-Hefezellen (repräsentativ für 6 biol. Replikate). Die Klone ko-exprimierten galaktose-induziert die in (A) gezeigten Ataxin-2-Formen bzw. deren entsprechenden Leervektor p423Gal-L (LV2) zusammen mit TDP-43 (rechte Seite) oder dessen entsprechenden Leervektor p426Gal-L (LV1) (linke Seite). Die Aufnahmen der Glc-Platten zeigen Wachstum bei ausgeschalteter und die der Gal-Platten bei induzierter Genexpression. Ko-Expression von Ataxin-2-C-Terminus zusammen mit TDP-43 verstärkte die TDP-43-Toxizität im Vergleich zur Leervektorkontrolle (rechts unterer Teil). Ko-Expression von SCA2-pathogen expandiertem Ataxin-2 oder dessen entsprechendem N-Terminus mit TDP-43 wirkte hingegen mitigierend auf die zytotoxischen Effekte von TDP-43 (rechts oberer Teil)

Zu Kontrollzwecken wurden zudem Kotransformationen mit dem TDP-43-kodierenden Plasmid und dem Leervektor der rekombinanten Ataxin-2-Plasmide (s. Abb.4.9B rechter Teil jeweils 2. Zeile) durchgeführt. Aus demselben Grund wurden ferner Kotransformationen mit dem Leervektor des TDP-43-Plasmids und den Ataxin-2-Plasmiden (s. Abb. 4.9B linker Teil) sowie mit beiden Leervektoren unternommen (s. Abb. 4.9B jeweils oberste Zeile). Die Transformationsansätze wurden schließlich auf CSM/Glc/-H/-U-Festmedium

selektiert. Einzelklone dieser Transformationen wurden daraufhin in entsprechendem Selektionsmedium resuspendiert und über Nacht bei 30°C für die Wachstumsanalysen vorinkubiert. Am Folgetag wurden wie in Abs. 4.1.1. beschrieben die OD₆₀₀-Werte der Kulturen eingestellt, und Verdünnungsreihen der so gewonnenen Ausgangskulturen auf je zwei Selektionsagarplatten ausgetropft. Dabei enthielt wieder eine der Platten Glucose als Kohlenstoffquelle, und diente somit zur Kontrolle des Hefewachstums bei ausgeschalteter Plasmidexpression. Die zweite Platte dagegen enthielt Galaktose, die zur Induktion der Plasmidexpression diente. Schließlich wurden die Hefezellen bei 30°C über drei bis vier Nächte inkubiert. Auf diese Weise wurden je Plasmidkombination mindestens sechs Klone aus mindestens drei unabhängigen Ko-Transformationen getestet um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Aufnahmen eines repräsentativen Experimentes dieser Analysen sind in Abb. 4.9B abgebildet. Dort kann man erkennen, dass alle Stämme bei ausgeschalteter Expression (Glc-Platten) wie erwartet gleichmäßig wuchsen, was eine Grundbedingung dieser Experimente war.

Ferner zeigte ein Vergleich der Zellen die Ataxin-2-Isoformen und den Leervektor des TDP-43-Plasmids (LV1) simultan exprimierten mit Zellen die beide Leervektoren exprimierten, dass deren Wachstum nur bei Ko-Expression des Leervektors mit dem C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts inhibiert wurde (s. Abb. 4.9B links). Für die bereits zuvor untersuchten Ataxin-2-Isoformen, zu denen auch der Ataxin-2-C-Terminus zählt (s. Abs. 4.1.1.), bedeutet dies, dass die zusätzliche Leervektorexpression deren Einfluss auf das Hefewachstum nicht modifizierte.

Zudem wirkte die Ko-Expression des TDP-43-Proteins mit dem Leervektor der Ataxin-2-Plasmide im Vergleich zur Expression beider Leervektoren wachstumshemmend auf die Hefezellen (s. Abb. 4.9B rechts). Dies entsprach damit ebenfalls den schon zuvor beobachteten, zytotoxischen Effekten die auch durch alleinige TDP43-Expression ausgelöst werden.²⁶⁵

Insgesamt wurden also bereits zuvor beobachtete Auswirkungen der alleinigen Expression von Ataxin-2-Isoformen oder TDP-43 auf das Hefewachstum (s. o.) durch zusätzliche Leervektorexpression in den hier untersuchten Kontrollansätzen nicht beeinflusst. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass mögliche durch Expression der Ataxin-2-Isoformen vermittelte TDP43-toxizitätsmodifizierende Effekte, falls solche festgestellt werden sollten, spezifisch sein würden.

Derartige spezifische Effekte konnten letztendlich auch tatsächlich nachgewiesen werden. Diese betrafen zum einen das C-terminale physiologische Ataxin-2-Spaltprodukt und zum anderen das auf 79 Q-Repeats expandierte, vollständige Ataxin-2-Protein sowie dessen entsprechendes N-terminales Spaltprodukt (s. Abb. 4.9B rechts). So führte die Ko-Expression des Ataxin-2-C-Terminus und des TDP-43-Proteins in allen Experimenten zu einer stärkeren Hemmung des Hefewachstums als für die TDP-43 und den Leervektor LV2 Kontrollen beobachtet werden konnte. Das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt hatte also einen fördernden Effekt auf die TDP-43-Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu wuchsen Zellen, die TDP-43 und vollständiges Ataxin-2 mit 79 Q-Repeats in der PolyQ-Region exprimierten, stets besser als TDP-43 und Leervektor exprimierende Kontrollzellen (s. o.). Dasselbe galt zudem für die entsprechende expandierte Variante des N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts, wobei dessen TDP-43-toxizitätsmildernder Einfluss jedoch schwächer war als der des vollständigen Ataxin-2-Proteins mit 79 Q-Repeats. Allerdings war er dennoch sehr konsistent in neun von elf untersuchten biologischen Replikaten festgestellt worden und somit gut reproduzierbar.

Darüber hinaus konnte jedoch kein Effekt auf die Zytotoxizität von TDP-43 bei dessen Ko-Expression mit nicht pathogenem Ataxin-2 mit 22 Q-Repeats oder dem davon abgeleiteten N-terminalen Spaltprodukt beobachtet

werden. Dies spricht zusätzlich dafür, dass die beobachteten modifizierenden Effekte auf die TDP-43-Toxizität spezifisch durch den Ataxin-2-C-Terminus einerseits bzw. die pathogene PolyQ-Expansion in Ataxin-2 oder dessen N-Terminus andererseits vermittelt worden waren.

Die Ergebnisse bestätigten also prinzipiell, dass Ataxin-2 ebenso wie sein Hefe-Ortholog PBP1 im Hefemodell die TDP-43-Zytotoxizität modifizieren kann. Es war jedoch in diesem Fall nicht die Expression von vollständigem Ataxin-2 sondern die seines C-terminalen Spaltprodukts, die analog zur PBP1-Expression in früheren Untersuchungen die toxische Wirkung von TDP-43 verstärkte.¹⁵³ Dies spricht dafür, dass dieses Spaltprodukt auch für den modifizierenden Effekt von Ataxin-2 auf die ALS-Pathogenese wichtig sein könnte. Dies würde allerdings dennoch nicht erklären, warum intermediär expandierte Ataxin-2-PolyQ-Regionen zu einem erhöhten ALS-Erkrankungsrisiko führen, was ebenfalls in o. g. Studie beobachtet werden konnte.¹⁵³ Diesbezüglich konnte allerdings in den Wachstumsanalysen zudem ein spezifischer mitigierender Einfluss einer SCA2-pathogenen Ataxin-2-PolyQ-Repeatexpansion auf die Zytotoxizität von TDP-43 festgestellt werden (s. o.). Das bedeutet also, dass auch im verwendeten Hefemodell, in Analogie zu ALS-Patienten mit intermediär expandiertem Ataxin-2, prinzipiell ein Zusammenhang zwischen der Länge der Ataxin-2-PolyQ-Region und zellpathogenen Auswirkungen von TDP-43 bestand (s. o.). Es sei jedoch betont, dass hier ausschließlich eine SCA2-pathogene Ataxin-2-PolyQ-Repeatexpansion untersucht wurde, die per Definition größer ist als intermediäre PolyQ-Expansionen. Dennoch zeigten diese Ergebnisse insgesamt, dass das genutzte humanisierte TDP-43-Proteinopathiemodell durchaus geeignet sein kann, um modifikatorische Einflüsse der Ataxin-2-Expression auf die zelluläre TDP-43-Pathogenese zu simulieren.

4.1.5.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von ko-exprimiertem TDP-43-GFP und Redstar-markierten Ataxin-2-Spaltprodukten in Hefezellen

Die im letzten Abschnitt beschriebenen Wachstumsanalysen hatten gezeigt, dass beide Ataxin-2-Spaltprodukte die TDP-43-Toxizität in einem humanisierten Hefemodell beeinflussen können. In den folgenden Mikroskopieanalysen sollten die Spaltprodukte deshalb hinsichtlich Kollokalisation mit TDP-43 sowie Effekten auf die Fokibildung des TDP43 untersucht werden, das bekanntermaßen in diesem Modellsystem zytoplasmatische, amorphe und zytotoxische Akkumulationen bildet.²⁶⁵ Dies diente v. a. dazu aufzuklären, ob der beobachtete durch den Ataxin-2-C-Terminus vermittelte Verstärkereffekt auf die Toxizität von TDP-43 (s. v. Abs.) auf Veränderungen der TDP-43-Fokibildung beruhen könnte.

Dafür wurden wie zuvor beschrieben (s. Abs. 4.1.5.1.) Kotransformationen von Zellen des WT-Hefestamms mit je zwei rekombinanten, galaktose-induzierbaren Plasmiden vorgenommen. Dabei wurde je ein Plasmid genutzt, das prinzipiell dem o. g. TDP-43-kodierenden Vektor entsprach, der jedoch in diesem Fall die Sequenz einer C-terminal GFP-markierten TDP-43-Version enthielt. Das andere Plasmid entsprach dabei je einem der in Abs. 4.1.1. bereits vorgestellten Vektoren, die für C-terminal Redstar-markierte Ataxin-2-Spaltprodukte kodierten. Außerdem wurden analog zu o. g. Experimenten (s. v. Abs.) Kontrollproben angesetzt, für die die Hefezellen mit jeweils einem der Spaltprodukt-Plasmide oder dem TDP-43-Plasmid zusammen mit dem Leervektor des entsprechenden anderen Plasmids transformiert wurden.

Einzelklone dieser Transformationen wurden daraufhin zunächst über Nacht in glucosehaltigem Selektionsmedium herangezogen, und aus den entsprechenden Suspensionen wurden am folgenden Tag Hauptkulturen ($OD_{600} = 0,4$) in galaktosehaltigem Selektionsmedium hergestellt, die bei 30°C für 5 – 6 h inkubiert wurden. Die Vorbereitung der Proben auf die Mikroskopie sowie die Mikroskopie selbst erfolgte

darauhin wie zuvor erläutert (s. Abs. 4.1.3.). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 4.10 dargestellt.

Darin lässt sich zunächst erkennen, dass das bereits aus o. g. Experimenten (s. Abs. 4.1.2.) bekannte Fokibildungsverhalten der Ataxin-2-Spaltprodukte sich auch bei zusätzlicher Leervektorexpression nicht veränderte (vgl. Abb. 4.2. & 4.10A). So bildete auch hier das C-terminale Spaltprodukt in einem Großteil der Zellen Foki, während der N-terminale Abschnitt unter diesen Bedingungen nur in wenigen Zellen Fokibildung zeigte (s. Abb. 4.10A).

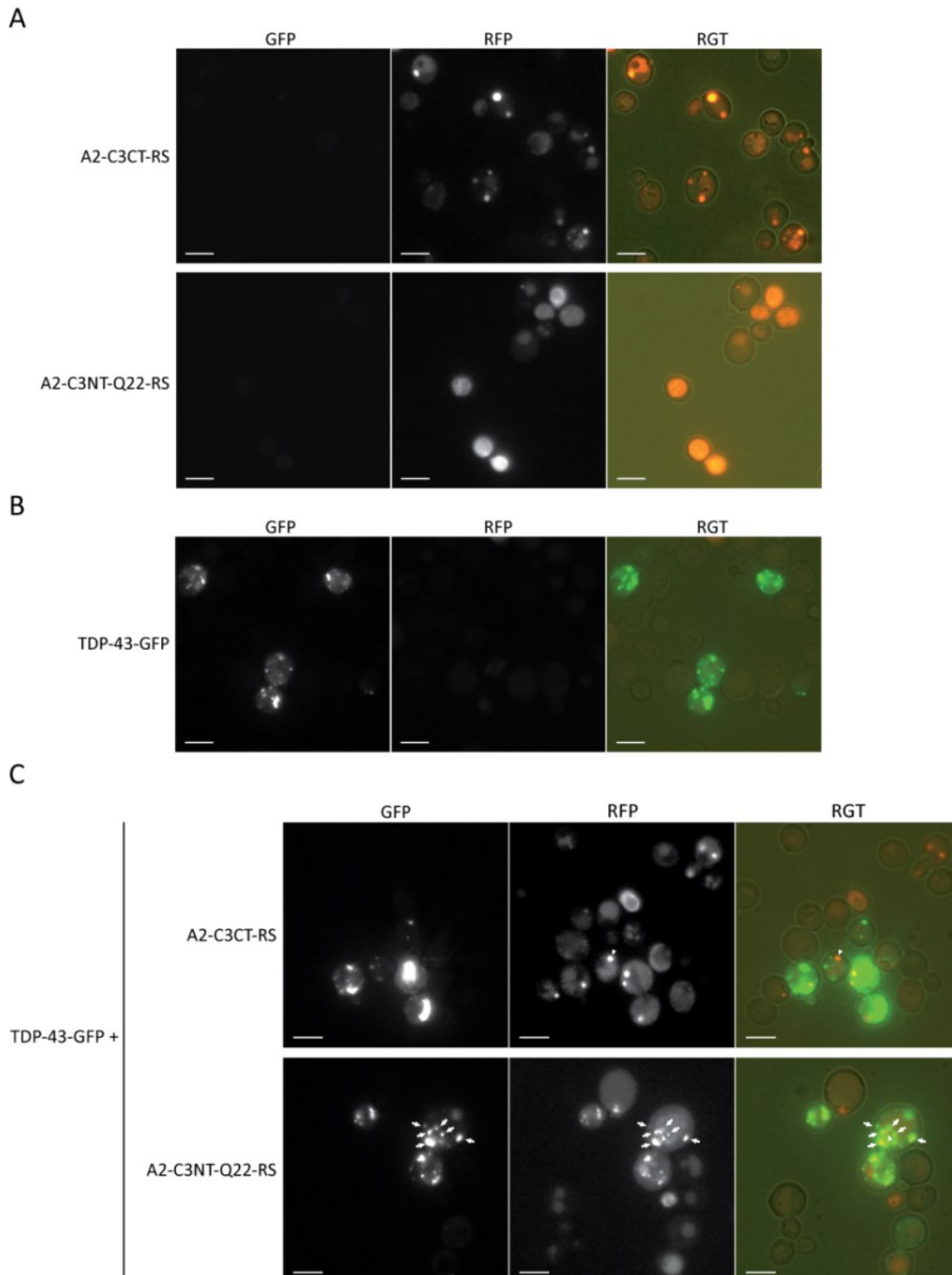


Abb. 4.10 Mikroskopiestudien zu Lokalisation und Kolokalisation von Ataxin-2-Spaltprodukten und TDP-43 (A) Aufnahmen von Zellen die Redstar-markierten Ataxin-2-C-Terminus (oben) oder -N-Terminus (unten) zusammen mit dem Leervektor des TDP-43-Plasmids (p426Gal-L) galaktose-induziert ko-exprimierten (Kontrollexperiment 1). Lokalisation und Fokibildung der Spaltprodukte entsprachen dabei den Beobachtungen aus o. g. Experimenten (s. Abb. 4.2). **(B)** Mikroskopiebilder von Zellen die TDP-43 und den Leervektor der Ataxin-2-Spaltprodukte (p423Gal-L) ko-exprimierten (Kontrollexperiment 2). Die TDP-43-Fokibildung entsprach dabei den Ergebnissen früherer Studien.²⁶⁵ **(C)** Aufnahmen aus Kolokalisationsstudien von Zellen die Ataxin-2-Spaltprodukte und TDP-43-GFP ko-exprimierten. Der Ataxin-2-N-Terminus (unten) kolokalisierte mit TDP-43-GFP-Foki, was auf dessen C-Terminus (oben) nicht zutraf. (Pfeile: kolokalisierende Redstar-/ GFP-Foki, dreieckige Pfeil-spitze: nicht kolokalisierender Redstar-Fokus, Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 µm RGT: Überlagerungsbild des RFP-, GFP- und Transmissionskanals)

Ebenso konnte auch für die TDP-43-Fokibildung keine Beeinflussung durch Leervektorexpression festgestellt werden, was ein Vergleich mit Ergebnissen zuvor veröffentlichter Untersuchungen ergab (s. Abb. 4.10B).^{265,287}

In Zellen, die TDP-43-GFP und das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt ko-exprimierten, konnte letztlich allerdings keine Kolokalisation der beiden Fusionsproteine beobachtet werden (s. Abb. 4.10C), weshalb es eher unwahrscheinlich ist, dass dieses Spaltprodukt seinen zuvor festgestellten TDP-43-Toxizitätsverstärkereffekt (s. v. Abs.) durch direkte TDP-43-Interaktion vermittelt hatte. Ferner konnte zudem kein Effekt der C-Terminus-Expression auf die TDP-43-Fokibildung erkannt werden, so dass der durch den C-Terminus vermittelte Effekt auf die TDP-43-Toxizität offenbar ebenso wenig auf verstärkter TDP-43-Akkumulierung beruhte.

Andererseits konnte für das N-terminale Redstar-Spaltprodukt bei gemeinsamer Expression mit TDP-43-GFP tatsächlich Kolokalisation mit den GFP-Foki festgestellt werden. Dabei wurde es zudem offenbar zu den TDP-43-Foki rekrutiert, da in den Leervektorkontrollansätzen nur sehr selten N-Terminus-Fokibildung zu beobachten war (vgl. Abb. 4.10A & C jeweils untere Bilderreihen), was darauf hinweist, dass die TDP-43-Fokibildung Bedingung für die Entstehung der N-Terminus-Foki war. Allerdings hat dies offenbar, wie o. g. Wachstumsanalysen (s. Abs. 4.1.5.1) zeigten, keinen Einfluss auf die TDP-43-Zytotoxizität in Hefezellen. Dennoch weist dieses Resultat darauf hin, dass möglicherweise auch vollständiges Ataxin-2 via seines N-terminalen Abschnitts direkt oder indirekt mit TDP-43 interagieren und so seine modifizierende Wirkung auf TDP-43 bzw. die ALS-Pathogenese vermitteln könnte.¹⁵³

Zusammenfassend bleibt somit festzuhalten, dass durch die in Abschnitt 4.1. vorgestellten Hefe-Experimente zur Expression von Ataxin-2-Spaltprodukten sowohl für den N- als auch den C-terminalen Proteinabschnitt spezifische Einflüsse auf die Hefezellen dargestellt werden konnten. Dabei hatte allerdings die Expression des Ataxin-2-N-Terminus weitaus weniger Auswirkungen auf die Zellen als die des C-Terminus. Zudem konnte ausschließlich durch C-Terminus-Expression ein zytotoxischer Effekt in WT-Hefezellen induziert werden, der für vollständiges Ataxin-2 oder dessen N-Terminus nicht beobachtet wurde. Hinzu kommt, dass auch in einem TDP-43-Proteinopathiemodel die Expression des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts die TDP-43-Zytotoxizität spezifisch steigerte.

Diese relativ weitreichenden Effekte der Expression des Ataxin-2-C-Terminus in Hefezellen ließen somit darauf schließen, dass insbesondere dieser Ataxin-2-Abschnitt auch für neuropathologische Prozesse in humanen Zellen wichtig sein könnte. Damit untermauerten die Ergebnisse zudem die eingangs erwähnte Hypothese, nach der Regionen, die in der Ataxin-2-Sequenz stromabwärts der PolyQ-Region sowie des Caspase-Spaltmotivs liegen, wichtig in der SCA2-Pathogenese sein könnten.¹²¹ Auf dieser Grundlage sollten deshalb als nächstes HeLa-Zellen mikroskopisch untersucht werden, um mehr über Lokalisation und Fokibildung der Ataxin-2-Spaltprodukte im humanen Zellsystem zu erfahren. Dazu wurden auch in diesem Fall Kolokalisationsanalysen mit Zellkompartiment-Markerproteinen bzw. TDP-43 sowie verschiedenen Ataxin-2-Isoformen unternommen.

4.2. Immunfluoreszenz-Mikroskopieanalysen verschiedener Ataxin-2-Isoformen in stressbehandelten und unbehandelten HeLa-Zellen

4.2.1. Studien zur Kolokalisation physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte mit Zellkompartiment-Markerproteinen in unbehandelten Zellen

Wie in den letzten Abschnitten beschrieben, zeigte das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt einer hypothetischen Caspase-3-Reaktion im *S. cerevisiae*-Modellsystem in allen mikroskopischen Experimenten eine hohe Neigung zur Fokibildung (s. Abs. 4.1.2.-4.1.4). Zusätzlich hatte die Expression dieser Ataxin-2-Region einen stark inhibitorischen Einfluss auf das Hefezellwachstum (s. Abs. 4.1.1). Andererseits wurde für den entsprechenden, N-terminalen Ataxin-2-Abschnitt kein eindeutiger zytotoxischer Effekt erkannt (s. Abs. 4.1.1.). Zudem zeigte sich in Mikroskopiestudien von Hefezellen, die den N-Terminus, ähnlich wie in den Wachstumsanalysen, galaktose-induziert exprimierten, dass dieser zumindest unter diesen experimentellen Bedingungen nur sehr selten Foki bildet (s. Abs. 4.1.2.). Das ließ insgesamt vermuten, dass die Bildung o. g. CHX-resistenter, zellulärer Anreicherungen des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts (s. Abs. 4.1.4) für dessen hohe Zytotoxizität in Hefe verantwortlich gewesen sein könnten. Damit hätten die entsprechenden C-Terminus-Foki folglich zudem Ähnlichkeit mit pathogenen, amyloiden Akkumulationen anderer humaner, neurodegenerativer Krankheitsproteine bzw. Proteinabschnitte (z. B. TDP-43, α -Synuclein, Htt-Exon1-Peptid, Amyloid- β -Peptide etc.).

Aus diesem Grund wurde in folgenden Experimenten die zelluläre Lokalisation der Ataxin-2-Spaltprodukte, deren Fähigkeit zur Fokibildung sowie deren Kolokalisation mit zellulären Markerproteinen auch in HeLa-Zellen analysiert. So sollte u. a. geprüft werden, ob die Spaltprodukte hinsichtlich dieser Eigenschaften im humanen Zellsystem ihren fluoreszenzmarkierten Versionen aus o. g. Hefe-Analysen ähneln, um so optimalerweise Rückschlüsse auf ihr toxisches Potential in humanen Zellen ziehen zu können.

Dazu wurden grundsätzlich in den HeLa-Zellen überexprimierte Ataxin-2-Spaltprodukte mittels Immunfluoreszenz (IF)-Mikroskopie analysiert, wobei zunächst Zellen untersucht wurden die keinem externen Stress ausgesetzt worden waren. Außerdem wurden die Spaltprodukte im Zuge dessen sowohl auf Fokibildung als auch auf ihre Kolokalisation mit endogenen Proteinmarkern verschiedener Zellkompartimente hin untersucht, um ihre zelluläre Lokalisation genauer zu charakterisieren.

Bei diesen Markern handelte es sich um die Proteine DDX6, GRP94 (*glucose-related protein of 94 kDa*), β -Aktin und β -Tubulin, die ebenfalls mittels IF-Methoden angefärbt worden waren. Diesbezüglich diente DDX6 einerseits als PB-Marker, es wurde aber auch v. a. deshalb in die Analysen mit einbezogen, da seine Interaktion und Kolokalisation mit vollständigem Ataxin-2 bereits nachgewiesen werden konnte.⁶⁵ Andere Untersuchungen zeigten zudem eine Assoziation von Ataxin-2 mit dem ER, was der Hauptgrund für die Kolokalisationsstudien mit GRP94 war, das hier als ER-Marker diente.⁶⁹ Die Proteine β -Aktin und β -Tubulin ihrerseits wurden schließlich zur Markierung der entsprechenden Zytoskelettbestandteile angefärbt, d. h. Aktin-Filamente bzw. Mikrotubuli.

Um nun die Ataxin-2-Spaltprodukte zu analysieren wurden als erstes HeLa-Zellen mit rekombinanten Plasmiden transfiziert. Diese kodierten entweder für das C- oder für das N-terminale Spaltprodukt, die in beiden Fällen vom humanen CMV-Promotor reguliert wurden, der für ihre starke, konstitutive Expression sorgen sollte. Die so exprimierten Ataxin-2-Abschnitte waren zudem mit einem C-terminalen c-Myc-Epitop-Tag versehen, der zur

antikörpervermittelten Fluoreszenzmarkierung der Spaltprodukte genutzt wurde. Bis auf die unterschiedliche Markierung glichen die rekombinanten Fusionsproteine jedoch den auch in den Hefe-Experimenten untersuchten Proteinbereichen (s. Abb. 4.1)

Für die Transfektionen wurde dabei das Reagenz „Attractene“ (Qiagen) nach Herstellerangaben angewendet, wobei ca. 6 h nach dessen Zugabe zu den Zellen ein Mediumwechsel erfolgte, um dieses wieder zu entfernen. Dies sollte ungewollten, möglicherweise schädigenden Einflüssen des Transfektionsreagenz auf die Zellen vorbeugen. Im Anschluss an den Mediumwechsel wurden die Zellen dann weitere 18 h, wie auch in den 6 h bis zum Mediumwechsel, bei Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert (d. h. bei 37°C & 5 % CO₂-Gehalt), so dass die Gesamtdauer der transienten Spaltproduktexpression 24 h betrug.

Nach dieser Inkubationszeit folgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen durch deren Behandlung mit 4% Formaldehydlösung für 15 min bei Raumtemperatur und anschließender Inkubation in tiefgekühltem Methanol für weitere 10 min bei -20°C. Daraufhin wurden die Zellen in IF-Blockierpuffer über Nacht bei ca. 4°C inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu sättigen. Im Anschluss daran wurden die Proben mit Antikörperlösungen behandelt, die jeweils Paare primärer Antikörper enthielten. Diese Paare bestanden dabei aus je einem gegen das c-Myc-Epitop gerichteten und einem variablen Antikörper, der eines der o. g. Markerproteine detektieren sollte. Die Inkubation der Zellen mit den Primärantikörpern erfolgte daraufhin ebenfalls über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Zellen gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper-Lösungen behandelt. Dabei enthielten diese Lösungen wieder paarweise Antikörper, die in diesem Fall gegen die konstanten Regionen der o. g. Primärantikörper gerichtet waren und zudem fluoreszierende Markierungen trugen, die schließlich am Mikroskop detektiert werden konnten. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen ferner für 1 – 2 Minuten mit zellkernfärbendem Hoechst-Reagenz behandelt, nochmals gewaschen und schließlich auf mit Mounting-Medium betroffene Objektträger überführt.

Die so erstellten Präparate wurden daraufhin mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht, und Bilder der Zellen bei 400-facher Vergrößerung erstellt. Diese entsprachen dabei Maximalintensitätsprojektionen mehrerer Z-Stapelaufnahmen der jeweiligen Probenregion (s. Abb. 4.11). Zur Kontrolle der Standardlokalisation o. g. zellulärer Markerproteine dienten hierbei nicht transfizierte Zellen, die auf den Mikroskopieaufnahmen ebenfalls abgebildet sind. An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, dass bei Einhaltung des hier etablierten o. g. Standardprotokolls zur Immunfärbung keine β -Aktin-Immunfluoreszenz detektiert werden konnte, so dass davon keine Aufnahmen gezeigt sind. Die restlichen Experimente verliefen allerdings erfolgreich, und es zeigte sich dabei, dass beide Ataxin-2-Spaltprodukte unterschiedlich in den HeLa-Zellen verteilt vorlagen.

In diesem Zusammenhang war besonders auffällig, dass der N-terminale Proteinabschnitt drei generelle Verteilungsmuster zeigte (s. Abb. 4.11A & 4.13). So war er erstens in durchschnittlich etwa 20 % der ihn exprimierenden Zellen exklusiv im Nukleus lokalisiert, wo er stets diffus verteilt vorlag. Zweitens konnte er ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert sein, wobei der Anteil der Zellen die diese Verteilung zeigten etwa die Hälfte aller Ataxin-2-N-Terminus exprimierenden Zellen ausmachte. In den restlichen ca. 30 % dieser Zellen war das Spaltprodukt schließlich sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus detektierbar. Diese Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass in HeLa-Zellen vermutlich ein nukleo-zytoplasmatischer Transport des N-terminalen Ataxin-2-Abschnitts stattfindet.

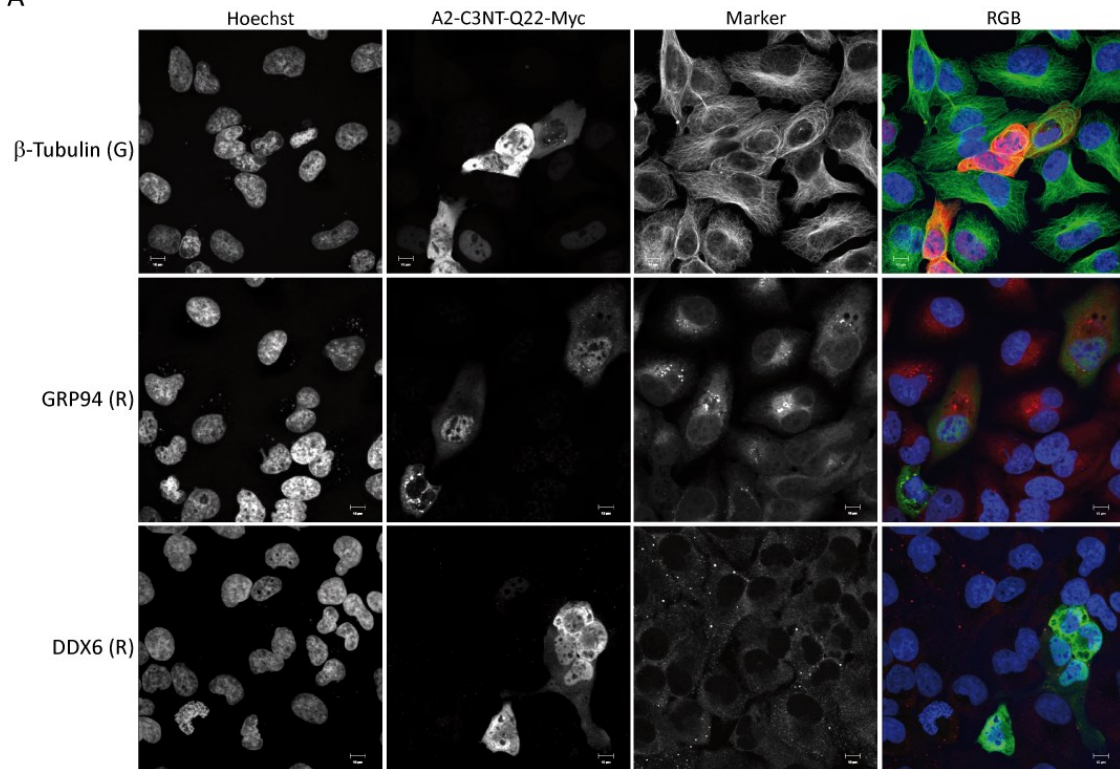
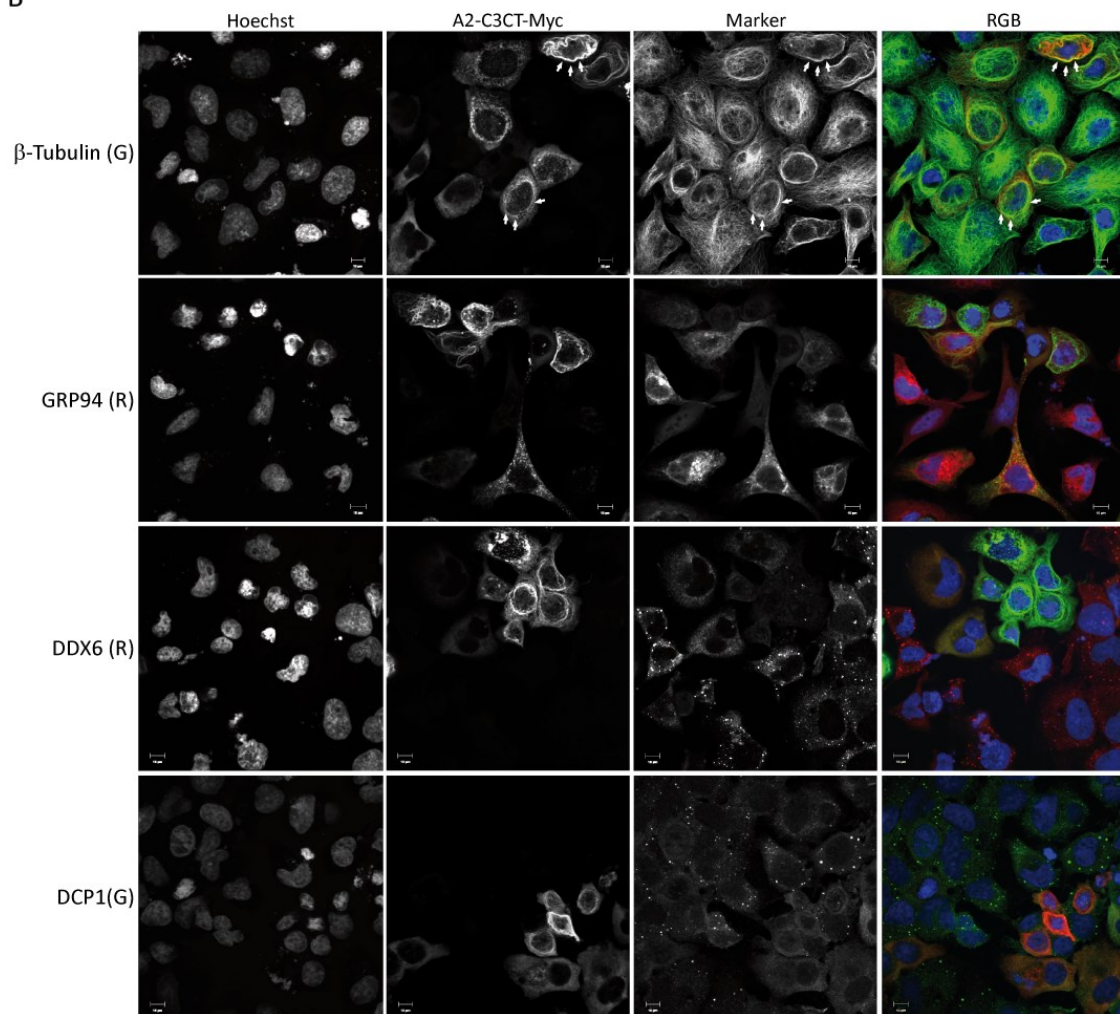
A**B**

Abb. 4.11 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte in HeLa-Zellen. (A) Mikroskopieaufnahmen fixierter Zellen die Myc-markierten Ataxin-2-N-Terminus (A2-C3NT-Q22-Myc) für 24 h transient exprimiert hatten. (B) wie (A) nur wurde der Ataxin-2-C-Terminus (A2-C3CT-Myc) exprimiert. (A) & (B) Die Zellen wurden Ko-Immunfärbungen unterzogen, wobei sie stets mit einem primären Antikörper gegen das Myc-Epitop (m- oder rb- α -Myc) und mit je einem der folgenden Antikörper gegen endogene Zellkompartiment-Markerproteine simultan inkubiert wurden: m- α - β -Tubulin (Mikrotubulinmarker), m- α -DCP1 (PB-Marker), rb- α -DDX6 PB/ SG-Marker), rb- α -GRP94 (ER-Marker). Als fluoreszenzmarkierte, sekundäre Antikörper wurden AlexaFluor488[®] gt- α -m-IgG & Alexa Fluor594[®] gt- α -rb-IgG verwendet. Die Zellnuklei wurden mit Hoechst-Farbstoff gefärbt. Der N-Terminus war nukleär & zytoplasmatisch lokalisiert und kolokalisierte mit keinem Markerprotein. Der C-Terminus bildete sowohl granuläre als auch filamentöse Foki, wobei letztere mit β -Tubulin kolokalisierten. Zudem wirkte C-Terminus-Expression hemmend auf die PB-Bildung (für Bilder mit repräsentativen Anteilen fokibildender Zellen s. Abb. 4.13.). (Pfeile: kolocalisierende C-Terminus-Filamente, R: rote Fluoreszenz, G: grüne Fluoreszenz B: blaue Fluoreszenz (Hoechst), RGB: Überlagerungsbild der detektierten Fluoreszenzen, Vergrößerung: 430-fach, Maßstabsbalken: 10 μ m)

Weiterhin zeigte überexprimiertes N-terminales Ataxin-2-Spaltprodukt zudem Fokibildung in den HeLa-Zellen, die sich jedoch auf zytoplasmatische Foki beschränkte und somit nicht in Zellen auftrat, die exklusiv nukleäres N-Terminus-Signal aufwiesen (s. Abb. 4.11A & 4.13). Alle anderen Zellen konnten hingegen prinzipiell N-Terminus-Foki bilden, die dabei häufig in der nukleären Peripherie lokalisiert waren. Diesbezüglich lag der durchschnittliche Anteil fokibildender Zellen an der Gesamtmenge N-Terminus exprimierender Zellen bei ungefähr einem Drittel.

Im Hinblick auf die Hefe-Experimente bedeutet dies, dass die Fokibildung des N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts in HeLa-Zellen eher der des in Hefe konstitutiv exprimiertem als des galaktose-induziert exprimiertem Ataxin-2-N-Terminus glich (s. Abs. 4.1.2. – 4.1.4.). Diesbezüglich sei hier daran erinnert, dass insbesondere das konstitutiv exprimierte Spaltprodukt zytoplasmatische Foki in Hefezellen bildete, während das induzierte Spaltprodukt nur sehr selten in Foki erkennbar war. Unabhängig davon bleibt jedoch festzuhalten, dass der N-Terminus prinzipiell sowohl in Säugerzellen als auch in Hefezellen mikroskopisch sichtbare Foki bilden konnte.

Darüber hinaus zeigten die Ko-IF-Färbungen des N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts und o. g. zellulärer Markerproteine, dass weder β -Tubulin noch GRP94 oder DDX6 mit dem Spaltprodukt kolokalisierten (s. Abb. 4.11A). Daraus lässt sich folgern, dass der Ataxin-2-N-Terminus vermutlich nichts oder nur wenig zu den bereits beschriebenen Assoziationen von Ataxin-2 mit dem ER oder DDX6 beiträgt.^{65,69}

Andererseits konnte für das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt im Gegensatz zum N-Terminus ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation in den HeLa-Zellen beobachtet werden (s. Abb. 4.11B & 4.13). Dabei zeigten ca. 60 % der transfizierten Zellen eine diffuse C-Terminus-Verteilung. Ferner konnte zudem in etwa 15 % dieser Zellen die Bildung granulärer bis amorpher Foki festgestellt werden, und schließlich war in etwa einem Viertel der Transfektanden die Bildung filamentöser C-Terminus-Strukturen zu beobachten.

Diesbezüglich waren besonders die filamentbildenden Zellen auffällig, da sie nahezu immer Apoptosemerkmale zeigten. Genauer gesagt bedeutet das, dass sie zum einen kondensiertes Chromatin aufwiesen, was aus ihrer Höchst-Kernfärbung geschlossen wurde, die, verglichen mit der nicht transfizierter Kontrollzellen, kompakter und intensiver war. Zusätzlich ließen die filamentpositiven Zellen häufig Kernfragmentation erkennen, was ein weiteres Apoptosemerkmal darstellt. Darüber hinaus waren schließlich ihre Zellkörper im Vergleich zu jenen nicht transfizierter Zellen im Querschnitt eher rund und zeigten durchschnittlich weniger und kürzere Filopodien. Dies deutete darauf hin, dass sie zum Zeitpunkt der Fixierung vermutlich dabei waren sich vom Zellkulturplattenboden abzulösen, ein Verhalten das ebenso von apoptotischen Zellen bekannt ist.²⁸⁸ Insgesamt konnte somit geschlussfolgert werden, dass die Bildung der Ataxin-2-C-Terminus-Filamente mit dem zellulären Apoptose-Eintritt assoziiert ist. Dafür, dass die Filamentbildung dabei vermutlich eher eine Ursache als eine

Folge apoptotischer Prozesse sein könnte, spricht zudem, dass selten auch filamentbildende Zellen mit vital aussehenden Nuklei beobachtet wurden, was darauf hinwies, dass es sich dabei um (noch) prä-apoptische Zellen gehandelt haben könnte. Letztendlich blieben die kausalen Zusammenhänge zwischen Filamentbildung und Apoptose-Eintritt jedoch ungeklärt.

Die Ko-IF-Färbungen zeigten davon abgesehen bezüglich der C-Terminus-Filamente außerdem, dass diese in den HeLa-Zellen teilweise mit β -Tubulin kolokalisierten (s. Abb. 4.11B). Im Hinblick auf die Kolokalisationsanalysen in Hefezellen (s. Abs. 4.1.3.) heißt das, dass in beiden Modellsystemen eine Assoziation des C-Terminus mit Proteinen des Mikrotubulinetzwerks gezeigt werden konnte. Dies bezieht sich darauf, dass im Hefemodell wie beschrieben eine Kolokalisation des C-terminalen Spaltprodukts mit SPC42 festgestellt wurde (s. Abb. 4.4), das Bestandteil der Spindelpolkörper ist, die in Hefe die einzigen Mikrotubuli-Organisationszentren (MTOZ) darstellen. Daraus folgt, dass der C-Terminus auch dort zumindest indirekt über die Spindelpole mit dem Mikrotubuli-Netzwerk in Beziehung steht.

Demgegenüber ergaben die übrigen Doppelimmunfärbungen des Ataxin-2-C-Terminus mit DDX6 und GRP94, dass er mit diesen Proteinen nicht kolokalisierte. Unabhängig davon fiel jedoch auf, dass C-Terminus exprimierende Zellen durchschnittlich schwächere DDX6-Signale zeigten als nicht transfizierte Zellen. Zusätzlich konnte in diesen Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen seltener DDX6-Fokibildung beobachtet werden, wobei die unter C-Terminus-Expression gebildeten wenigen DDX6-Foki zudem meist geringere Durchmesser besaßen als jene der nicht transfizierten Zellen (s. Abb. 4.11B). Für die Spezifität dieses Effekts auf die DDX6-Fokibildung und die zellulären DDX6-Level spricht dabei, dass er nicht bei Expression des Ataxin-2-N-Terminus beobachtet werden konnte (s. Abb. 4.11A). Dieses letzte Ergebnis weist somit darauf hin, dass die starke Expression des Ataxin-2-C-Terminus in HeLa-Zellen sehr wahrscheinlich die DDX6-vermittelte zelluläre PB-Bildung stört.

Allerdings ist von DDX6 zudem bekannt, dass es nicht nur PB-Komponente ist, sondern auch mit SG kolokalisieren kann, weshalb nicht auszuschließen war, dass auch mögliche artifizielle oder physiologische SG durch die Immunfärbung detektiert worden waren.⁶⁵ Deshalb wurde zusätzlich ein weiteres Experiment nach o. g. Vorgehensweise durchgeführt, bei dem exogen exprimierter Myc-markierter Ataxin-2-C-Terminus zusammen mit dem sehr spezifischen PB-Marker DCP1 angefärbt wurde. Die entsprechenden Mikroskopieaufnahmen sind in Abb. 4.11B dargestellt. Diese Analysen zeigten zum einen, dass in Zellen die das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt exogen exprimierten, die DCP1-Signalstärken verglichen mit denen nicht transfizierter Zellen relativ konstant waren. Dennoch konnte auch für DCP1 ebenso wie für DDX6 eine durch die Spaltproduktexpression vermittelte reduzierte Fokibildung (d. h. PB-Bildung) in den HeLa-Zellen festgestellt werden. Zusammengenommen lässt sich daraus schlussfolgern, dass hohe Mengen des Ataxin-2-C-Terminus in HeLa-Zellen spezifisch deren PB-Bildung stören. Gleichzeitig war dieser Effekt jedoch nicht von einer Kolokalisation des C-Terminus mit DCP1 oder DDX6 abhängig, was auf einen indirekten Einfluss des C-Terminus auf die PB-Bildung in humanen Zellen hinweist.

Insgesamt konnte in den Experimenten bezüglich der Lokalisation der Ataxin-2-Spaltprodukte also festgestellt werden, dass der Ataxin-2-N-Terminus nukleär lokalisiert sein kann, wohingegen der C-Terminus ausschließlich zytoplasmatisch auftrat. Dies bestätigte zudem Ergebnisse aus unabhängigen, initialen Analysen zur Spaltproduktlokalisierung die von Fr. A. Günther während ihrer Masterarbeit in der AG Krobtsch erzielt worden waren, und im Zuge derer sie auch die hier genutzten rekombinanten Plasmide design und kloniert hatte.²⁶²

Bezogen auf die Hefe-Untersuchungen aus Abs. 4.1. lässt sich außerdem festhalten, dass dort in Kolokalisationsstudien mit Zellkompartiment-Markern kein nukleär lokalisierter N-Terminus detektiert wurde. Die in den HeLa-Zellen beobachtete Fähigkeit des N-terminalen Ataxin-2-Bereichs zur nukleären Lokalisation ist somit evolutionär nicht in *S. cerevisiae* konserviert. Andererseits konnte jedoch zudem in beiden Modellsystemen eine Anreicherung des Ataxin-2-N-Terminus in zytoplasmatischen Foki beobachtet werden (s. Abs. 4.1.4.).

Ebenso konnte darüber hinaus auch der C-terminale Ataxin-2-Abschnitt sowohl in Hefe- als auch in HeLa-Zellen in zytoplasmatischen Foki detektiert werden. Dabei unterschieden sich jedoch die Foki des fluoreszenzmarkierten C-Terminus in Hefezellen von denen des Myc-markierten C-Terminus in HeLa-Zellen. Das heißt sie waren entweder granulär und damit relativ zum Gesamzellvolumen kleiner als die C-Terminus-Foki in Hefe oder sie waren filamentös, was für die Foki in Hefezellen ebenfalls nicht beobachtet wurde. Andererseits fiel speziell im Fall der C-Terminus-Filamente außerdem auf, dass sie teilweise mit Mikrotubuli assoziiert waren. Nachdem also bereits in Hefe C-Terminus-Kolokalisation mit SPC42, einem Bestandteil hefespezifischer MTOZ, beobachtet wurde (s. Abs. 4.1.3.), war nun auch für humane Zellen eine Assoziation des C-Terminus mit dem Mikrotubuli-Netzwerk bestätigt worden. Zusammen spricht dies somit für eine spezifische sowie evolutionär konservierte Interaktion des Ataxin-2-C-Terminus mit dem Mikrotubuli-Netzwerk, die folglich möglicherweise auch durch vollständiges Ataxin-2 vermittelt werden könnte.

Unabhängig davon konnte zudem ein inhibitorischer Einfluss von überexprimiertem C-terminalem Ataxin-2-Spaltprodukt auf die PB-Bildung gezeigt werden, was anhand der DDX6- und DCP1-Fokibildung beurteilt wurde. In dieser Eigenschaft gleicht das C-terminale Spaltprodukt damit vollständigem Ataxin-2, dessen Überexpression in früheren Studien ebenfalls die PB-Bildung hemmte.⁶⁵ Zuzüglich konnte hinsichtlich DDX6 jedoch auch festgestellt werden, dass HeLa-Zellen die den Ataxin-2-C-Terminus exprimieren im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen schwächere diffuse DDX6-Fluoreszenzsignale aufwiesen. Dies könnte demnach auf eine Ataxin-2-abhängige Regulation der DDX6-Expression hinweisen. Es sei jedoch erwähnt, dass in o. g. früherer Studie zur Ataxin-2-DDX6-Interaktion keine Reduktion der diffusen DDX6-Fluoreszenz durch Expression von vollständigem Ataxin-2 vermittelte wurde, was somit für einen spaltproduktspezifischen Effekt sprechen könnte.⁶⁵

Insgesamt hatte also insbesondere der C-terminale Ataxin-2-Abschnitt bezüglich seiner Lokalisation und seiner Effekte auf PB und DDX6 Ähnlichkeit mit vollständigem Ataxin-2-Protein. Es war daher denkbar, dass dieses Spaltprodukt unter Stressbedingungen ebenso analog zu vollständigem Ataxin-2 in SG lokalisiert sein könnte, was zudem auch für das N-terminale Spaltprodukt nicht ausgeschlossen werden konnte. Deshalb sollte, in den im folgenden Abschnitt beschriebenen IF-Experimenten, geklärt werden, ob die Spaltprodukte mit dem SG-Marker TIAR kolokalisieren und wie sich Stress auf deren Lokalisation und eventuelle TIAR-Kolokalisation auswirkt.

4.2.2. Untersuchungen zur Lokalisation und SG-Kolokalisation verschiedener Ataxin-2-Isoformen in oxidativ gestressten und unbehandelten Zellen

Wie in Abs. 4.1.4. beschrieben, hatte sich in fluoreszenzmikroskopischen Hefe-Experimenten zur SG-Bildung herausgestellt, dass weder das N- noch das C-terminale Spaltprodukt des Ataxin-2 mit Hefe-SG kolokalisierte. Dies war insofern unerwartet, als dass vollständiges Ataxin-2 zuvor bereits als Säuger-SG-Komponente und sein Hefe-Ortholog PBP1 als Bestandteil von Hefe-SG identifiziert worden waren.^{60,65,101}

Andererseits zeigten die IF-Mikroskopieanalysen nicht gestresster HeLa-Zellen (s. Abs. 4.2.1.), dass der C-terminale Ataxin-2-Abschnitt in diesem Modellsystem zumindest hinsichtlich seines Einflusses auf die PB-Bildung vollständigem Ataxin-2 ähnelte. Somit bestand die Möglichkeit, dass im Unterschied zum Hefemodell das C-terminale oder eventuell auch das N-terminale Spaltprodukt im Zuge der integrierten Stressantwort in humanen Zellen mit SG assoziieren könnten. Deshalb sollte nun in IF-Untersuchungen geklärt werden, ob o. g. Myc-markierte Ataxin-2-Spaltprodukte (s. Abs. 4.2.1.) in SG lokalisiert sein können. Zudem sollte so festgestellt werden, ob Expression eines der Spaltprodukte die SG-Bildung in HeLa-Zellen beeinflusst, was angenommen werden konnte, da der Ataxin-2-C-Terminus in mikroskopischen Hefe-Analysen bereits einen Einfluss auf die Hefe-SG-Bildung gezeigt hatte (s. Abs. 4.1.4.).

Zu diesem Zweck wurden zunächst wie in Abs. 4.2.1. beschrieben HeLa-Zellen mit rekombinanten Vektoren transfiziert, die für C-terminal Myc-markierte Fusionsproteine der Ataxin-2-Spaltprodukte kodierten, deren Expression durch den CMV-Promotor gesteuert wurde. Zusätzlich wurden in diesem Fall jedoch noch weitere Transfektionen mit zwei Plasmiden durchgeführt, die für auf 79 Q-Repeats expandierte Varianten des vollständigen Ataxin-2-Proteins oder des Ataxin-2-N-Terminus kodierten. Dabei sollte die Analyse dieser Isoformen v. a. Aufschluss über hypothetische Einflüsse der Spaltprodukte im Kontext der SCA2-Pathogenese geben. Darüber hinaus wurden zudem Transfektionen mit einem für vollständiges, nicht pathogenes Ataxin-2 (mit 22Q-Repeats) kodierenden Plasmid unternommen. Dies diente zum einen dazu Lokalisation und Fokibildungsverhalten des exogen exprimierten, nicht pathogenen Ataxin-2 mit dem der o. g. anderen Isoformen in gestressten oder ungestressten HeLa-Zellen zu vergleichen. Zum anderen sollte damit außerdem kontrolliert werden, ob die bereits beschriebene Ataxin-2-Lokalisation in SG sich auch unter den hier gewählten Bedingungen beobachten lässt.^{60,65,262}

Die Dauer der transienten Expression der Ataxin-2-Isoformen im Anschluss an die Transfektion betrug dabei analog zu o. g. Experimenten (s. Abs. 4.2.1.) ebenfalls 24 h. Daraufhin wurde in diesem Fall jedoch jeweils die Hälfte der Ansätze mit 0,5 mM Natriumarsenit (NaAsO_2)-enthaltendem Medium behandelt, worin die Zellen eine weitere Stunde bei 37°C inkubierten, was der Induktion von oxidativem zellulärem Stress dienen sollte. Die restlichen Proben hingegen, die als unbehandelte Kontrollansätze fungieren sollten, wurden nach der transienten Expression zunächst wie die Arsenit-Proben einem Mediumwechsel unterzogen und auch anschließend wie diese inkubiert. Jedoch enthielt das frische Medium in diesem Fall kein Arsenit.

Daraufhin wurden die Zellen wie in Abs. 4.2.1. beschrieben einer Ko-IF-Färbung unterzogen. Dabei wurde in diesem Fall neben den Myc-markierten Ataxin-2-Isoformen jeweils auch endogenes TIAR-Protein angefärbt, das hier als spezifischer SG-Marker dienen sollte. Schließlich wurden die Proben ebenfalls wie o. g. mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Dabei entstandene Aufnahmen, die repräsentatives Lokalisations- und Fokibildungsverhalten der Ataxin-2-Isoformen und des TIAR-Proteins zeigen, sind in Abb. 4.13 dargestellt.

In Abb. 4.12 sind darüber hinaus Aufnahmen von Kontrollexperimenten zu sehen, die wie oben beschrieben durchgeführt wurden, bei denen jedoch lediglich der Leervektor der Ataxin-2-Plasmide (pCMV-Myc) transfiziert und exprimiert worden war. So sollte überprüft werden, ob die bloße Leervektorexpression die SG-Bildung bzw. die TIAR-Lokalisation in den HeLa-Zellen beeinflusst.

Diesbezüglich lässt sich in Abb. 4.12 erkennen, dass das TIAR-Signal in nicht mit Stress behandelten, Leervektor exprimierenden Zellen hauptsächlich diffus verteilt im Nukleus detektiert werden konnte. In arsenitbehandelten Zellen war es hingegen v. a. in zytoplasmatischen Fluoreszenzfoki, d. h. SG konzentriert.

Dabei stieg der Anteil SG-positiver Zellen von unter einem Prozent in unbehandelten auf 80 – 90 % in arsenitbehandelten Proben. Damit war bestätigt, dass die Expression des Leervektors weder zu auffälliger Induktion von SG in ungestressten Zellen führt noch die TIAR-SG-Bildung unter Stress wesentlich beeinflusst.

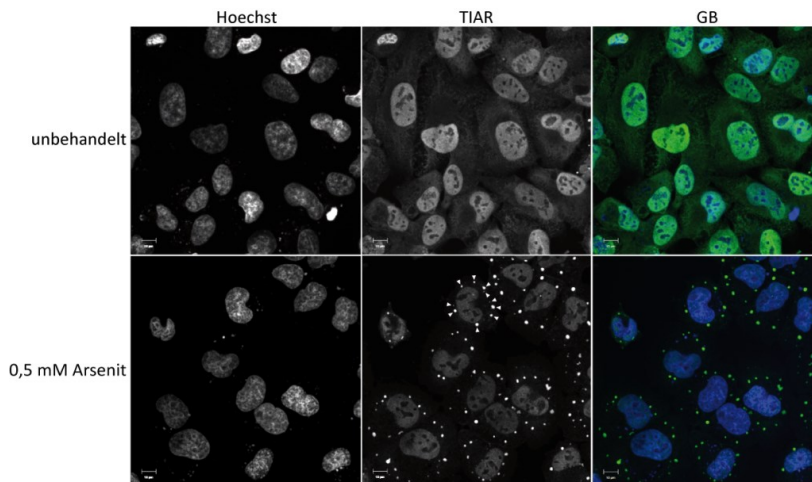


Abb. 4.12 Analyse der SG-Bildung in HeLa-Zellen bei Expression des Leervektors pCMV-Myc (Kontroll-experiment). Das Plasmid wurde 24 h exprimiert und die Zellen daraufhin für 1 h mit Natriumarsenit behandelt, um oxidativen Stress zu induzieren. Darauf folgte eine Ko-IF-Färbung mit einem rb- α -Myc-Antikörper und einem m- α -TIAR-Antikörper sowie fluoreszierenden Sekundärantikörpern. (Pfeilspitzen: TIAR-SG, GB: Überlagerungsbild der detektierten grünen (TIAR) und blauen (Hoechst) Fluoreszenzsignale, Vergrößerung: 430-fach, Maßstabsbalken: 10 μ m)

Bezüglich Lokalisation und Fokibildung der exogen exprimierten Ataxin-2-Isoformen sei zunächst erwähnt, dass nicht pathogenes, vollständiges Ataxin-2 in unbehandelten Zellen ausschließlich im Zytoplasma, als zumeist diffus verteiltes Signal detektiert wurde (s. Abb. 4.13A). Allerdings war es in durchschnittlich ca. 20 % der exprimierenden Zellen auch in größeren, zusammenhängenden Strukturen an der Kernperipherie lokalisiert, und zeigte selten auch granuläre, zytoplasmatische Fokibildung. Diesbezüglich konnte zudem beobachtet werden, dass die zytoplasmatischen Foki unabhängig von ihrer Morphologie mit TIAR kolokalisierten.

Demgegenüber war nicht pathogenes Ataxin-2 in arsenitbehandelten HeLa-Zellen nahezu immer in sich stark von der Hintergrundfluoreszenz abhebenden, zytoplasmatischen Fluoreszenzfoki lokalisiert (s. Abb. 4.13B). Gleichzeitig war sein diffuses Fluoreszenzsignal in diesen Zellen bezogen auf unbehandelte Zellen stark reduziert. Zudem überlagerten die Signale der zytoplasmatischen Ataxin-2-Foki dabei sehr häufig mit denen der von TIAR-gebildeten SG. Dies zeigte bereits, dass nicht pathogenes Ataxin-2, entsprechend den Ergebnissen früherer Untersuchungen in anderen humanen Zelllinien sowie auch in HeLa-Zellen, durch Arsenitbehandlung zu SG rekrutiert wird.⁶⁵ Es fiel jedoch außerdem auf, dass die mit Ataxin-2 kolocalisierenden TIAR-Signale verglichen mit den TIAR-Signalen aus o. g. Kontrollversuchen (s. Abb. 4.12) in einigen Zellen im Querschnitt sehr viel großflächiger waren und weniger isometrisch aussahen. Dabei könnte es sich natürlich zum einen schlicht um anormal große SG gehandelt haben, die unter Arseniteinwirkung als Folge der starken exogenen Ataxin-2-Expression entstanden sind. Zum anderen könnten diese kolocalisierten Foki jedoch auch proteinreiche amyloidartige Akkumulationen gewesen sein, was aufgrund der o.g. Hefe-Experimente (s. Abs. 4.1.4.) angenommen werden konnte. Diese Frage blieb allerdings letztlich ungeklärt.

Ferner konnte für die Myc-markierte, pathogene Q79-Ataxin-2-Isoform im Vergleich zu nicht pathogenem Ataxin-2 nahezu identisches Lokalisations- und Fokibildungsverhalten festgestellt werden (s. Abb. 4.13A). So zeigte auch die pathogene Form exklusiv zytoplasmatische Lokalisation und war hauptsächlich diffus in den Zellen verteilt. Zudem lokalisierte sie ähnlich nicht pathogenem Ataxin-2 in zytoplasmatischen oder kernperipheren Foki, wobei der Anteil fokibildender Zellen in beiden Fällen etwa gleich hoch war. Darüber hinaus konnte auch für die pathogene Ataxin-2-Isoform Kolokalisation mit TIAR in o. g. perinukleären oder zytoplasmatischen Foki unbehandelter Zellen festgestellt werden (s. Abb. 4.13A).

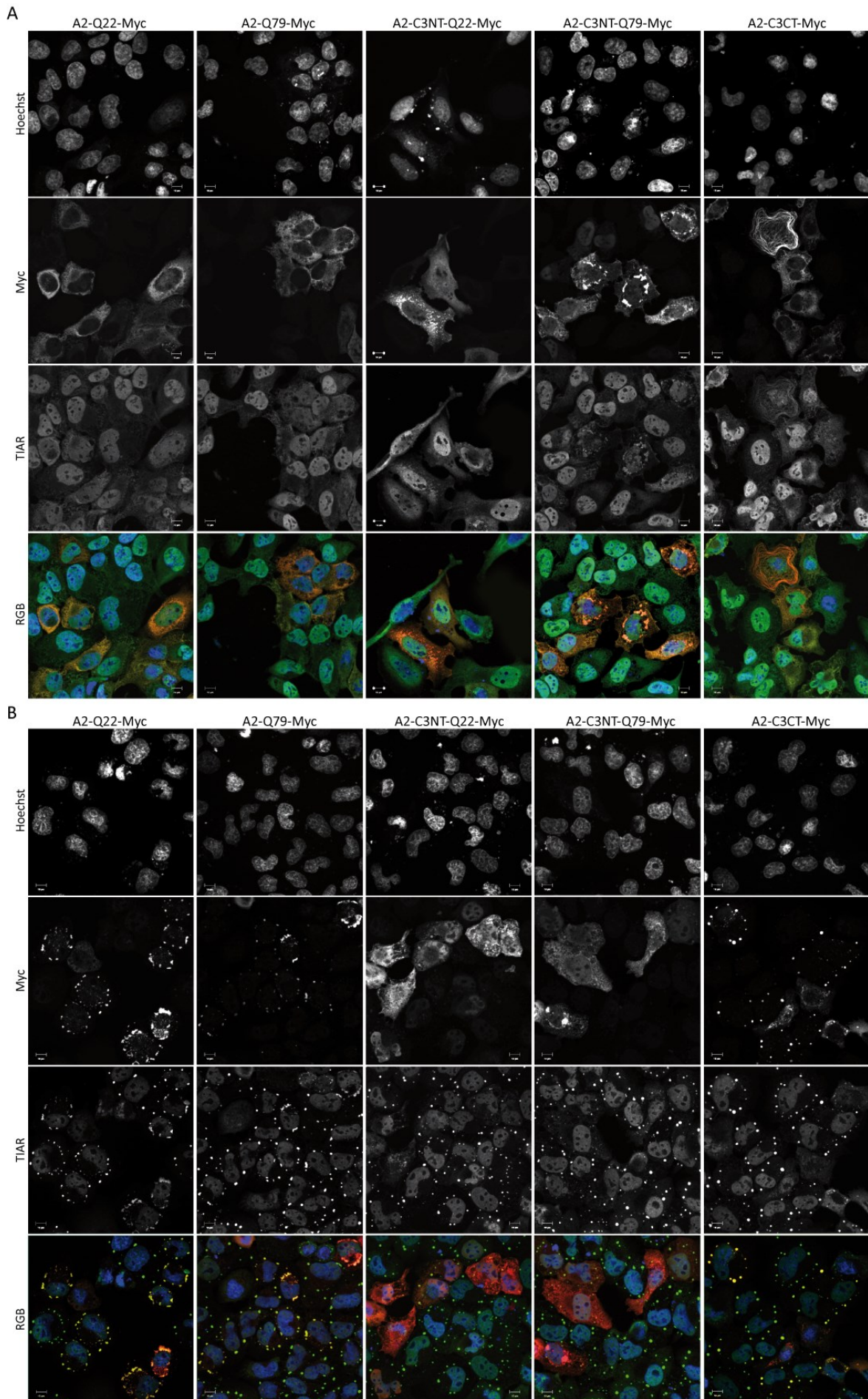


Abb. 4.13 Studien zur Fokibildung und SG-Lokalisation von Ataxin-2 oder seinen Spaltprodukten in HeLa-Zellen. (A) IF-Mikroskopieaufnahmen unbehandelter Zellen die Myc-markiertes, vollständiges Ataxin-2 mit 22 Q-Repeats (A2-Q22-Myc) bzw. 79 Q-Repeats (A2-Q79-Myc), die entsprechenden N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukte (A2-C3NT-Q22-Myc oder -Q79-Myc) oder das C-terminale Spaltprodukt (A2-C3CT-Myc) 25 h transient exprimiert hatten (B) wie (A) nur wurden die Zellen nach 24-stündiger transients Expression zur Stressinduktion eine Stunde mit 0,5 mM Natriumarsenit/DMEM-Lösung behandelt. (A) & (B) Die Zellen wurden wie im Text und in Abb. 4.11 beschrieben Ko-Immunfärbungen unterzogen. Hier wurde jedoch in Kombination mit dem gegen das Myc-Epitop gerichteten primären Antikörper (rb- α -Myc) ein gegen endogenes TIAR gerichteter, zweiter primärer Antikörper verwendet (m- α -TIAR). TIAR diente hierbei als SG-Marker (s. Abb. 4.12). Die Bilder zeigen Probenausschnitte in denen die Anteile der fokibildenden Zellen repräsentativ für die Beobachtungen aus elf Experimenten sind. Zur Fokibildung der Spaltprodukte in unbehandelten Zellen s. Abb. 4.11. Weitere Erläuterungen s. Text. (Vergrößerung: 430-fach, Maßstabsbalken: 10 μ m)

In arsenitbehandelten Zellen war die Q79-Isoform schließlich, ebenfalls analog zu nicht pathogenem Ataxin-2 in SG sowie in größeren, amorphen Strukturen zusammen mit TIAR detektierbar.

Im Unterschied dazu konnte das N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt mit 22 Q-Repeats wie bereits erwähnt (s. v. Abs.), sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus unbehandelter HeLa-Zellen detektiert werden (s. Abb. 4.13A).

Dies traf prinzipiell auch auf die Q79-Isoform des N-Terminus zu, allerdings waren deren Fluoreszenzsignale im Vergleich zu jenen der Q22-Isoform seltener exklusiv nukleär und dafür umso häufiger ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert (s. Abb. 4.13A). Diesbezüglich lag der Anteil der Zellen, die ausschließlich nukleär lokalisiertes Q79-N-Terminus-Signal aufwiesen bezogen auf alle N-Terminus exprimierenden Zellen bei durchschnittlich ca. 10 %. Im Gegensatz dazu betrug dieser Wert für die Q22-N-Terminus exprimierenden Zellen rund 20 % (s. Abs. 4.2.1.). Der entsprechende Anteil an Zellen mit rein zytoplasmatisch lokalisiertem Q79-N-Terminus lag andererseits bei etwa 60 % und war damit um 10 % größer als im Fall der Q22-N-Terminus exprimierenden Zellen. Der Anteil an Zellen, die sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiertes N-terminales Spaltprodukt aufwiesen, war demnach für beide Isoformen relativ konstant bei ungefähr 30 % der N-Terminus exprimierenden Zellen.

Wie bereits in berichtet (s. v. Abs.), wurde die Q22-Variante des Ataxin-2-N-Terminus außerdem bei der Untersuchung nicht stressbehandelter Zellen in perinukleären oder zytoplasmatischen Fluoreszenzfoki identifiziert. Dabei lag der Anteil fokibildender Zellen bei rund einem Drittel aller N-Terminus exprimierenden Zellen. Dieses Fokibildungsverhalten konnte auch in den hier vorgestellten Experimenten beobachtet werden (s. Abb. 4.13A). Ferner zeigten sich diesbezüglich ebenfalls Unterschiede zwischen der 22 Q-Repeats tragenden Isoform und der expandierten N-Terminus-Variante (s. Abb. 4.13A). So konnte für letztere ein entsprechender Anteil fokibildender Zellen von etwa 60 % festgestellt werden, wobei die Foki zudem durchschnittlich großflächiger waren, als die des Q22-N-Terminus oder der vollständigen Ataxin-2-Varianten. Außerdem zeigten die Foki der Q79-N-Terminus-Isoform verglichen mit denen der anderen Isoformen meist stärkere Fluoreszenzsignale, was auf eine relativ hohe Konzentration dieser Isoform in den Foki hinwies. Man kann daher festhalten, dass der Ataxin-2-N-Terminus mit 79 Q-Repeats in unbehandelten HeLa-Zellen stärker zur Fokibildung neigte als dessen 22 Q-Repeats tragende Isoform, wobei er wahrscheinlich zudem dichter gepackt in den Foki vorlag.

Darüber hinaus zeigten die Foki beider N-Terminus-Isoformen in unbehandelten Zellen Kolokalisation mit TIAR-Signalen, worin sie den beiden vollständigen Ataxin-2-Isoformen ähnelten (s. Abb. 4.13A). Ferner konnte zudem auch in arsenitbehandelten Zellen Kolokalisation zytoplasmatisch lokalisierter N-Terminus-Signale mit TIAR-positiven Foki festgestellt werden, was ebenfalls den Beobachtungen entsprach, die bezüglich der Isoformen des vollständigen Ataxin-2 gemacht worden waren (s. Abb. 4.12B). Dabei kolokalisierten die N-terminalen Spaltprodukte mit TIAR in den gestressten Zellen außerdem, ähnlich vollständigem Ataxin-2,

sowohl in größeren, meist amorphen Foki als auch in kleineren eher isometrischen Foki, d. h. SG. Letztere waren allerdings im Fall der N-Terminus-Isoformen durchschnittlich kleiner als jene o. g. SG in denen vollständiges Ataxin-2 mit TIAR kolokalisierte. Zudem war das Signal des dort lokalisierten TIAR meist relativ schwach im Verhältnis zum TIAR-Signal der SG, die in Zellen gebildet wurden, die vollständiges Ataxin-2 oder den Leervektor exprimierten (s. Abb. 4.12 & 4.13). In diesem Zusammenhang fiel außerdem auf, dass die zytoplasmatisch lokalisierten N-terminalen Spaltprodukt-Isoformen unter Stressbedingungen im Unterschied zu beiden vollständigen Ataxin-2-Isoformen viel diffuses zytoplasmatisches TIAR-Signal in den Zellen aufwiesen. Insgesamt vermittelten die Beobachtungen damit den Eindruck, dass die N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukte unabhängig von der PolyQ-Domänenexpansion die Bildung arsenitinduzierter SG in HeLa-Zellen unterdrücken. Das C-terminale Spaltprodukt seinerseits zeigte in unbehandelten Zellen eine bereits zuvor beobachtet (s. v. Abs.), ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation mit Bildung filamentöser Strukturen in etwa einem Viertel der Spaltprodukt exprimierenden Zellen (s. Abb. 4.13A). Diesbezüglich ergab sich nun außerdem, dass die Signale der C-Terminus-Filamente auch mit TIAR kolokalisierten (s. Abb. 4.13A). Dabei war die Überlagerung der Signale in diesem Fall sogar weitläufiger als jene, die im Fall der Kolokalisation von β -Tubulin mit den C-Terminus-Filamenten (s. Abs. 4.2.1.) beobachtet wurde (vgl. Abb. 4.11B & 4.13A).

Ferner konnte bezüglich der entsprechenden arsenitbehandelten Proben zudem festgestellt, dass das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt dort in vielen Zellen in TIAR-positiven SG lokalisiert war. Allerdings wurden diese SG lediglich in Zellen beobachtet, die keine C-Terminus-Filamente gebildet hatten. In diesem Zusammenhang konnte jedoch keine arsenitabhängige Änderung des Anteils filamentbildender Zellen beobachtet werden. Das bedeutet somit insgesamt, dass die SG-Bildung in diesem Fall auf maximal etwa drei Viertel der Zellen die den C-Terminus exprimierten beschränkt war. Die Bildung der C-Terminus-Filamente könnte demnach in HeLa-Zellen inhibitorisch auf die Assemblierung arsenitinduzierter SG wirken.

Man kann also festhalten, dass das Verhalten des Ataxin-2-C-Terminus in HeLa-Zellen einerseits dem von vollständigem Ataxin-2 glich, und er entsprechend in TIAR-positiven SG lokalisiert sein konnte (s. Abb. 4.13B). In dieser Hinsicht verhielt er sich somit anders als in o. g. Hefe-Untersuchungen bei denen keine C-Terminus-Kolokalisation mit Hefe-SG festgestellt wurde. Im Gegensatz dazu konnte der C-Terminus jedoch andererseits in durchschnittlich etwa einem Viertel der HeLa-Zellen filamentisieren, was ähnlich wie die C-Terminus-Fokibildung in *S. cerevisiae* mit einer Reduktion der SG-Bildung in betroffenen Zellen einherging.

Zusammenfassend lässt sich somit zunächst grundsätzlich sagen, dass sich alle Ataxin-2-Isoformen in den Mikroskopiestudien bezüglich Lokalisation, Fokibildung und TIAR-Kolokalisation gemäß den Beobachtungen initialer, diesbezüglich durchgeführter Experimente verhielten.²⁶² Ferner konnten dabei die Ergebnisse o. g. Analysen bezüglich der Fokibildung physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte in nicht stressbehandelten HeLa-Zellen (s. v. Abs.) bestätigt werden.

Außerdem konnten Unterschiede zwischen der auf 79 Q-Repeats expandierten und der Q22-Isoform des Ataxin-2-N-Terminus in den HeLa-Zellen erkannt werden, die entsprechend einen Einfluss auf die SCA2-Pathogenese haben könnten. So konnte z. B. eine negative Korrelation zwischen der PolyQ-Domänenlänge und der N-Terminus-Kernlokalisierung festgestellt werden. Das heißt der Anteil an Zellen mit nukleär lokalisiertem N-Terminus an der Gesamtzellmenge N-Terminus exprimierender Zellen war im Fall der expandierten Isoform größer als im Fall der nicht expandierten. Außerdem neigte besonders der expandierte Ataxin-2-N-Terminus zur Bildung zytoplasmatischer Foki, die in diesem Fall deutlich effizienter war als die des nicht expandierten N-Terminus sowie die der beiden untersuchten vollständigen Ataxin-2-Protein-Isoformen. Diesbezüglich zeigte

der auf 79 Q-Repeats expandierte N-Terminus zudem oft auch stärkere Foki-Fluoreszenzsignale als dessen nicht expandierte Variante.

Dabei waren derartige Unterschiede bezüglich der Fokibildung besonders im Fall der N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukte sehr auffällig, wohingegen sie beim Vergleich der beiden Isoformen des vollständigen Ataxin-2-Proteins nicht bzw. kaum erkennbar waren. Ebenso charakteristisch war schließlich zudem, eine Störung der Bildung arsenitinduzierter SG, die zwar bei Expression der N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukte jedoch nicht bei Expression von vollständigem Ataxin-2 beobachtet werden konnte.

Das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt zeigte hingegen eher wenig Auffälligkeiten und verhielt sich in unbehandelten Zellen wie zuvor beschrieben (s. v. Abs.). Ferner kolokalisierte es dort lediglich in o. g. filamentartigen C-Terminus-Strukturen mit TIAR. Allerdings war es darüber hinaus mit TIAR in arsenitabhängigen SG kolokalisiert und verhielt sich in dieser Beziehung wie vollständiges Ataxin-2. Dabei konnte jedoch in Zellen die C-Terminus-Filamente gebildet hatten keine SG-Bildung beobachtet werden.

Um nun außerdem mehr über die pathologisch sehr bedeutsame Beziehung zwischen Ataxin-2 und TDP-43 zu erfahren, wurden weitere Mikroskopieanalysen durchgeführt, die im nächsten Abschnitt beschrieben werden.

4.2.3. Analyse möglicher Einflüsse überexprimierter Ataxin-2-Spaltprodukte auf die zelluläre Lokalisation von TDP-43

In den bisher beschriebenen IF-Analysen konnte festgestellt werden, dass jedes der Ataxin-2-Spaltprodukte in bestimmten Eigenschaften dem vollständigen Protein gleicht. So konnte z. B. eine Reduktion der PB-Anzahl in HeLa-Zellen durch Expression des C-terminalen Proteinbereichs gezeigt werden (s. Abs. 4.2.1.). Eine Eigenschaft, die zuvor bereits für vollständiges Ataxin-2 beschrieben worden war.⁶⁵ Dasselbe gilt zudem für die SG-Kolokalisation des Ataxin-2, die ebenfalls für dessen C-Terminus in arsenitbehandelten HeLa-Zellen beobachtet werden konnte (s. Abs. 4.2.2.). Das N-terminale Spaltprodukt zeigte hingegen die auch für vollständiges Ataxin-2 typische Lokalisation in perinukleären Proteinanreicherungen.

Deshalb sollte in HeLa-Zellen untersucht werden, ob auch die zelluläre TDP-43-Lokalisation durch Expression der Ataxin-2-Spaltprodukte beeinflusst wird, und ob diese mit TDP-43 kolokalisieren. Diesbezüglich konnte nämlich für vollständiges, intermediär-expandiertes Ataxin-2 bereits ein modifizierender Effekt auf das ALS-Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden konnte. Außerdem zeigte sich in derselben Studie, dass TDP-43 und Ataxin-2 in Säugerzellen miteinander kolokalisieren, weshalb insgesamt auch eine Interaktion der Ataxin-2-Spaltprodukte mit TDP-43 vorstellbar war.¹⁵³

In einer weiteren Studie wurde darüber hinaus entdeckt, dass die intermediär expandierten Ataxin-2-Varianten zudem Caspase-3-Aktivität fördern.¹²⁰ Es ist daher durchaus denkbar, dass der beobachtete Effekt dieser Ataxin-2-Mutanten auf das ALS-Risiko indirekt über Caspase-3-vermittelte Ataxin-2-Spaltung ausgelöst werden könnte. Träfe dies zu, könnten die dadurch erzeugten Ataxin-2-Spaltprodukte zumindest teilweise auch Einfluss auf TDP-43 bzw. die ALS-Pathogenese haben, was zusätzlich dafür sprach ihr Verhalten in Säugerzellen näher zu analysieren. Darüber hinaus zeigten schließlich auch die oben beschriebenen Wachstumsuntersuchungen im TDP-43-Proteinopathie-Hefemodell (s. Abs. 4.1.5.) insbesondere einen modifizierenden Einfluss des C-terminalen Ataxin-2-Abschnitts auf die TDP-43-Toxizität.

Aus diesen Gründen sollten die Ataxin-2-Spaltprodukte nun auch im Säugerzellsystem auf TDP-43-regulierende Effekte hin überprüft werden. Deshalb wurden erneut Ko-IF-Untersuchungen in HeLa-Zellen durchgeführt, um

so Hinweise auf mögliche Einflüsse überexprimierter Ataxin-2-Spaltprodukte auf endogenes TDP-43 zu erhalten.

Dazu wurden HeLa-Zellen wie zuvor beschrieben (s. Abs. 4.2.1.) mit Plasmiden transfiziert, die für Myc-markierte N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukte sowie das entsprechende C-terminale Fusionsprotein kodierten (s. Abs. 4.2.1. & 4.2.2.). Die Plasmidexpression erfolgte daraufhin auch hier für 24 h und die Zellen wurden anschließend wie o. g. für die Mikroskopie vorbereitet (s. Abs. 4.2.1.). Dabei wurde jedoch in diesem Fall ein gegen endogenes TDP-43 gerichteter zusammen mit dem Myc-spezifischen Antikörper für die Primärantikörper-Behandlung der Zellen verwendet. Repräsentative Mikroskopieaufnahmen dieses Experiments zeigt Abb. 4.14.

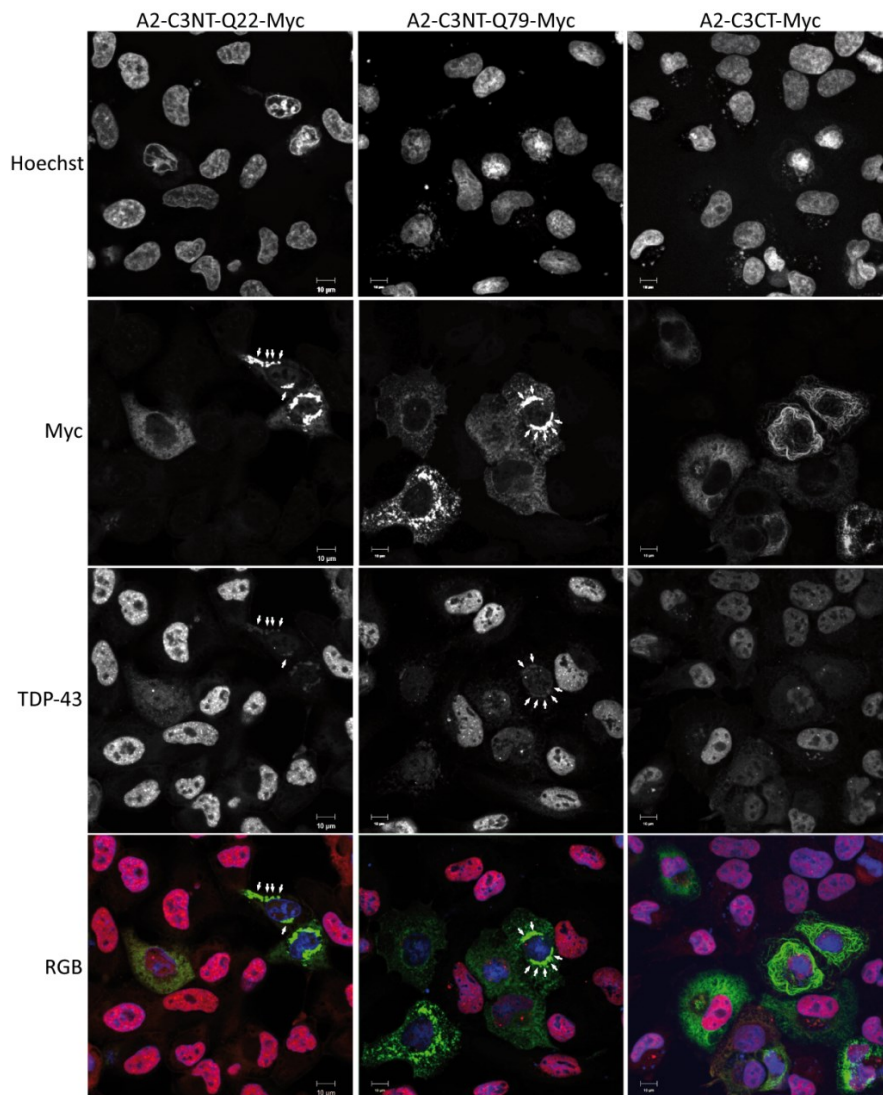


Abb. 4.14 Untersuchungen von Ataxin-2-Spaltprodukten hinsichtlich ihrer potentiellen Kolokalisation mit endo-genem TDP-43 in HeLa-Zellen. Die IF-Mikroskopie-bilder zeigen Zellen, die das physiologische N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt mit 22 oder 79 Q-Repeats oder das C-terminale Spaltprodukt (s. a. Abb. 4.13) für 24 h transient exprimiert hatten. Die Ko-Immundefärbungen der Zellen wurden wie o. g. (s. Abb. 4.11) durchgeführt, wobei hier ein gegen endogenes TDP-43 gerichteter, zweiter primärer Antikörper verwendet wurde (rb- α -TDP-43). Die N-terminalen Spaltprodukte zeigten Kolokalisation mit TDP-43 im Zytoplasma (v. a. in perinukleären N-Terminus-Foki. Ferner führte zytoplasmatisch lokalisierter Ataxin-2-N-Terminus zur Reduktion der TDP-43 Kernfluoreszenzsignale im Vergleich zu Kontroll-zellen. Der Ataxin-2-C-Terminus zeigte weder Kolokalisation mit, noch einen Einfluss auf TDP-43. (Pfeile: kolokalisierende Foki, RGB: Überlagerungsbild der detektierten Fluoreszenzen, Vergrößerung: 430-fach, Maßstabsbalken: 10 μ m)

Darauf lässt sich erkennen, dass die exogen exprimierten Ataxin-2-Spaltprodukte das aus o. g. Experimenten bekannte typische Lokalisations- und Fokibildungsverhalten zeigten (s. Abs. 4.2.1. & 4.2.2.). So war auch in diesem Fall der Ataxin-2-C-Terminus ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert, während der N-Terminus zusätzlich teilweise oder auch vollständig nukleär lokalisiert sein konnte. Ferner zeigte die IF-Färbung des C-terminalen Spaltprodukts in einigen Zellen erneut dessen Anreicherung in filamentösen Foki, und auch die N-terminalen Proteinbereiche waren wie zuvor beobachtet in zumeist perinukleären Foki konzentriert.

Bezüglich der Ko-IF-Färbung des endogenen TDP-43 konnte dabei festgestellt werden, dass dieses mit dem Ataxin-2-N-Terminus in o. g. perinukleären Strukturen kolokalisiert, was für dessen expandierte sowie die nicht expandierte Isoform gleichermaßen galt. Andererseits konnte in diesem Zusammenhang keine TDP-43-Kolokalisation mit dem C-terminalen Spaltprodukt festgestellt werden.

Diese Ergebnisse bestätigen somit die Beobachtungen aus den in Abs. 4.1.5.2. beschriebenen Kolokalisationsanalysen in Hefezellen, bei denen ebenfalls nur der N-terminale Bereich des Ataxin-2-Proteins mit TDP-43 kolokalisierte.

Zusätzlich erweitern sie Erkenntnisse aus früheren Studien in humanen Zelllinien, die bereits gezeigt hatten, dass vollständiges Ataxin-2 oder auch bestimmte Ataxin-2-Deletionsmutanten mit zytoplasmatischen TDP-43-Isoformen kolokalisieren können.^{100,153} Diesbezüglich weisen die Resultate nämlich daraufhin, dass vermutlich insbesondere der N-terminale Ataxin-2-Bereich für die Interaktion beider Proteine wichtig sein könnte.

Neben der beobachteten Kolokalisation des N-Terminus mit TDP-43 fiel in den Ko-IF-Analysen jedoch außerdem auf, dass dessen exogene Expression das nukleäre TDP-43-Signal beeinflusste. So konnte in Zellen die zumindest teilweise zytoplasmatisches N-Terminus-Signal aufwiesen im Vergleich zu jenen die kein bzw. nur nukleäres N-Terminus-Signal emittierten eine Abnahme der nukleären TDP-43-Fluoreszenz festgestellt werden. Diese war zudem in Zellen mit ausschließlich zytoplasmatischem N-Terminus größer als in Zellen die sowohl nukleären als auch zytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus enthielten. Ferner hing dieser Effekt somit indirekt auch mit der Länge der PolyQ-Domäne des Ataxin-2-N-Terminus zusammen. Das liegt daran, dass sich wie beschrieben die präferenzielle, zelluläre Lokalisation des N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts durch Expansion dieser Domäne änderte. So war expandierter Ataxin-2-N-Terminus mit 79 Q-Repeats häufiger zytoplasmatisch lokalisiert als dessen nicht expandierte Variante mit 22 Q-Repeats (s. Abs. 4.2.1.). Dementsprechend war die Reduzierung nukleärer TDP-43-Level bei Expression der N-terminalen Spaltprodukte häufiger im Fall der expandierten Isoform zu beobachten als im Fall der Q22-Isoform. Allerdings konnte in diesem Zusammenhang keine N-Terminus vermittelte Zunahme von zytoplasmatischem TDP-43-Signal erkannt werden, was bedeutet, dass in diesem Fall keine TDP-43-Misslokalisierung ins Zytoplasma vorlag, die derzeit als TDP-43-Proteinopathie-Pathomechanismus diskutiert wird.

Abschließend lässt sich somit festhalten, dass trotz einiger Unterschiede bezüglich Lokalisation und Fokibildung der Spaltprodukte in *S. cerevisiae* und HeLa-Zellen dennoch grundlegende Gemeinsamkeiten zwischen ihnen festgestellt werden konnten. So waren in beiden Modellsystemen sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus des Ataxin-2 grundsätzlich in der Lage zytoplasmatische Foki zu bilden (s. Abs. 4.1.4. & 4.2.1.). Die Tendenz zur Fokibildung war dabei jedoch für den N-Terminus im humanen Zellsystem höher als im Hefesystem. Im Gegensatz dazu neigte das C-terminale Spaltprodukt in den humanen Zellen weniger zur Anreicherung in Foki als in Hefezellen (s. Abs. 4.1.2. & 4.2.1.).

In Bezug auf die C-Terminus-Expression konnte zudem festgestellt werden, dass sie offenbar in beiden Modellsystemen zellschädigend wirken kann. So konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass durch C-Terminus-Expression das Zellwachstum gehemmt wird, und im humanen System konnte eine Assoziation filamentöser Foki des C-Terminus mit apoptotischen Zellveränderungen beobachtet werden (s. Abs. 4.1.2. & 4.2.1.). Dies spricht somit insgesamt sehr für eine mögliche Beteiligung dieses Ataxin-2-Abschnitts an pathogenen Prozessen, wie bereits zuvor postuliert.¹²¹ Außerdem waren sowohl die C-Terminus-Filamente in HeLa-Zellen als auch die in Hefe gebildeten C-Terminus-Foki mit Komponenten des Mikrotubulinnetzwerks kolokalisiert (s. Abs. 4.1.3. & 4.2.1.).

Schließlich zeigte sich zudem, dass in HeLa-Zellen ebenso wie im TDP-43-Proteinopathie-Hefemodell zwar der N-terminale jedoch nicht der C-terminale Ataxin-2-Abschnitt mit TDP-43 kolokalisiert (s. o.), wobei auch festgestellt wurde, dass zytoplasmatisch lokalisierter Ataxin-2-N-Terminus Einfluss auf die nukleären TDP-43-Level hatte.

Alles in allem hatte sich das Hefemodell damit als durchaus hilfreich erwiesen, um grundlegende Fragen zu Lokalisation und Fokibildung der Ataxin-2-Spaltprodukte zu klären. Deshalb wurden zur Ergänzung dieser Ergebnisse weitere Untersuchungen in *S. cerevisiae* unternommen, um zudem potentielle Regulatoren von Ataxin-2 bzw. seiner Spaltprodukte zu identifizieren.

4.3. Untersuchungen zur Identifikation genetischer Regulatoren von Ataxin-2

4.3.1. Hefe-Deletionsbank-Screens zur Identifizierung gemeinsamer genetischer Interaktoren von Ataxin-2 und TDP-43

Das *S. cerevisiae*-Modellsystem ist nicht nur für die Analyse proteotoxischer zellulärer Prozesse gut geeignet (s. Abs. 4.1.), sondern es bietet zudem eine effiziente Möglichkeit Hinweise auf unbekannte genetische Interaktionspartner humaner Proteine zu erhalten. Dazu werden u. a. sogenannte Synthetische-Letalitäts-Screens mit Deletionsstämmen aus Hefe-Deletionsbanken durchgeführt.

Ein solcher Screen wurde ebenfalls in der AG Krobitch durch Fr. C. Drescher vorgenommen, um genetische Interaktoren von Ataxin-2 (22 Q-Repeats) zu identifizieren.²⁸⁹ Grundlage dafür war das bereits beschriebene Ausbleiben zytotoxischer Einflüsse der Ataxin-2-Expression im WT-Hefestamm BY4741 (s. Abs. 4.1.1.), der zugleich Referenzstamm der für die Screens genutzten Hefe-Deletionsbank ist. Davon ausgehend wurden 23 ausgewählte Stämme dieser Deletionsbank in Wachstumsanalysen daraufhin getestet, ob in ihnen durch Ataxin-2-Expression synthetische Letalität ausgelöst wird. Das spräche entsprechend für eine genetische Interaktion des deletierten Gens mit Ataxin-2, da es darauf hinweist, dass dessen Expression im WT letale Effekte des Ataxin-2 unterdrückt.

Die o. g. Auswahl gescreenter Stämme konzentrierte sich dabei auf Deletionsmutanten von PB- und/oder SG-Komponenten mit humanen Orthologen. Es war nämlich zu erwarten, dass die Wahrscheinlichkeit darunter Ataxin-2-Interaktoren zu finden relativ hoch sein könnte, da bereits einige Verbindungen zwischen diesen mRNP-Granula und Ataxin-2 hergestellt worden waren. So wurde bereits gezeigt, dass Ataxin-2 eine Säuger-SG-Komponente ist, und darüber hinaus sowohl die Entstehung von SG als auch PB beeinflussen kann.^{60,65} Insofern diente die Auswahl o. g. Deletionsstämmen auch zur gezielten Identifizierung von Ataxin-2-Interaktoren die sich auf dessen Funktion als SG-Komponente auswirken könnten.

Parallel dazu wurde als Teil der vorliegenden Arbeit dieselbe Auswahl an Deletionsstämmen auf ähnliche Weise im o. g. TDP-43-Proteinopathie-Hefemodell (s. Abs. 4.1.5.) auf ihre TDP-43 Toxizitätsmodifizierenden Eigenschaften hin überprüft. Diese Untersuchungen basierten zum einen auf der Entdeckung, dass auch TDP-43 eine Komponente von Säuger-SG ist, weshalb es aus denselben Gründen wie bereits für Ataxin-2 beschrieben (s. o.) angebracht war, sich auf die o. g. Auswahl von Deletionsstämmen zu beschränken um gezielt TDP-43-Interaktionspartner zu identifizieren. Andererseits war wie schon erwähnt für Ataxin-2 ein modifizierender

Einfluss auf die ALS-Pathogenese entdeckt worden, wobei sich außerdem gezeigt hatte, dass Ataxin-2 und TDP-43 in Säugerkernen kolokalisiert. Zusätzlich konnten dabei sowohl im Hefe- als auch im Fliegenmodell verstärkende Einflüsse der entsprechenden Ataxin-2-Orthologe auf die TDP-43-Toxizität festgestellt werden.¹⁵³ Deshalb sollten letztendlich durch Vergleich der Ergebnisse beider gerichteter Hefe-Deletionsbank-Screens gemeinsame genetische Interaktoren von sowohl Ataxin-2 als auch TDP-43 mit Bezug zu deren SG-Funktion identifiziert werden.

4.3.1.1. Gerichteter Deletionsbank-Screen auf Modifikatoren der TDP-43-Toxizität in *S. cerevisiae*

Um nun die o. g. Hefe-Deletionsstämme (für eine Auflistung aller genutzten Stämme s. Abs. 3.1.4) auf potentielle modifizierenden Effekte bezüglich der TDP-43-Zytotoxizität in *S. cerevisiae* zu screenen, wurden diese zunächst transformiert. Dies erfolgte prinzipiell wie in Abs. 4.1.1. beschrieben, wobei zur Transformation das in Abs. 4.5.1. vorgestellte, galaktose-induzierbare TDP-43-Plasmid aus der AG Gitler verwendet wurde. Ferner wurde jeder Stamm zudem mit dem entsprechenden Leervektor p426Gal-L transformiert, um mögliche Nebeneffekte auf das Hefewachstum durch bloße Leervektorexpression kontrollieren zu können. Außerdem wurde ebenfalls der WT-Hefestamm entsprechend transformiert, wobei die Klone dieser Transformation als Referenz für Zellwachstum dienen sollten, das nicht durch Gendeletionen beeinflusst worden war. Die Transformationsansätze wurden schließlich auf CSM/Glc/-U selektiert und Einzelklone wie o. g. für Tropftests vorbereitet (s. Abs. 4.1.1.). Schließlich wurden ebenfalls analog zu o. g. Experimenten Suspensionen der Klone in Verdünnungsreihen auf je eine Glucose- und eine Galaktose-Selektionsmedium-Agarplatte ausgetropft, wobei auf letzterer die Plasmidexpression induziert wurde. Die Klone inkubierten daraufhin für 3 – 4 d bei 30°C, und im Anschluss wurden Fotografien der Hefekolonien aufgenommen, von denen einige in Abb. 4.15 dargestellt sind.

Die Abbildung zeigt dabei Ergebnisse repräsentativer Wachstumsanalysen der WT-Kontrollansätze sowie derjenigen Deletionsstamm-Ansätze, für die reproduzierbare modifizierende Einflüsse auf die TDP-43-Zytotoxizität erkannt wurden.

Darin kann man zunächst grundsätzlich erkennen, dass die exogene TDP-43-Expression im Vergleich zur Leervektorexpression das Wachstum des WT-Stamms stark negativ beeinflusste. Damit konnte die, bereits zuvor in diesem Modellsystem beobachtete, zytotoxische Wirkung der TDP-43-Expression hier unabhängig bestätigt werden.²⁶⁵ Dies war zugleich Grundvoraussetzung für die weiteren Analysen, bei denen das Ausmaß der durch TDP-43-Expression verursachten Hefewachstum-Inhibition zwischen dem WT-Stamm und den Deletionsstämmen verglichen wurde.

Bei diesen Vergleichsanalysen konnte schließlich festgestellt werden, dass die zytotoxische Wirkung der TDP-43-Expression in den Deletionsstämmen Δ XRN1, Δ PAT1, Δ UPF3 und Δ EBS1 verglichen mit der im WT-Hefestamm reproduzierbar reduziert war (s. Abb. 4.15A). Die entsprechenden Gene haben demzufolge im WT-Stamm offenbar einen verstärkenden Einfluss auf die TDP-43-Zytotoxizität.

Auf der anderen Seite konnte in den Deletionsstämmen Δ LSM6, Δ LSM7, Δ DHH1, Δ CCR4 und Δ POP2 eine gegenüber dem WT-Hefestamm verstärkte TDP-43-abhängige Störung des Hefezellwachstums beobachtet werden (s. Abb. 4.15B). Die Expression dieser Gene hat also dementsprechend in Zellen des WT-Stamms einen mildernden Einfluss auf die TDP-43-Zytotoxizität.

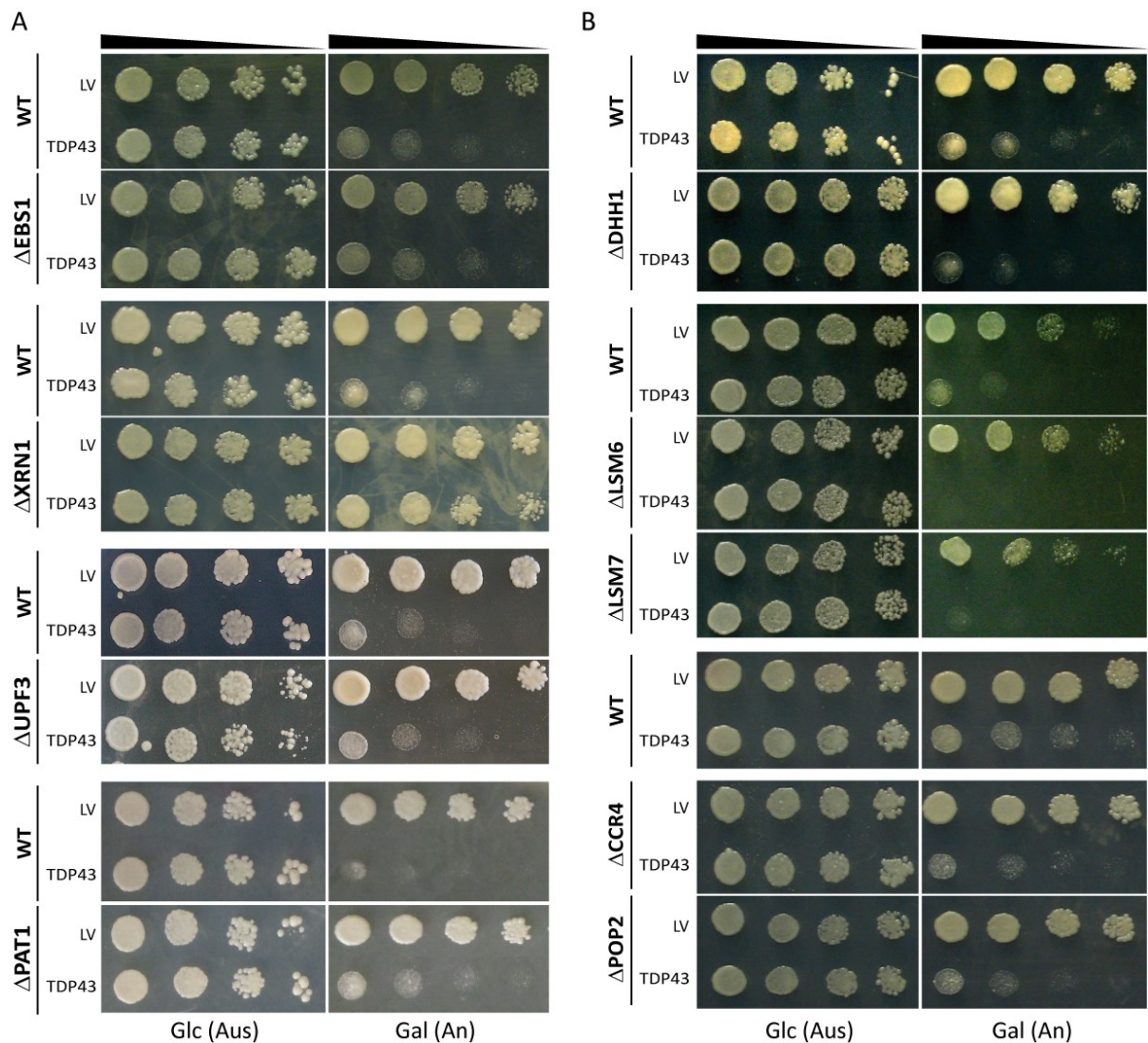


Abb. 4.15 Wachstumsanalysen aus einem Hefe-Deletionsbank-Screen hinsichtlich TDP-43-toxizitätsmodifizierender Deletionen (A) Fotografien von Wachstumsanalysen mit Hefe-Deletionsstämmen deren Deletionen konsistent mitigerend auf die durch exogen exprimiertes TDP-43 vermittelte Zytotoxizität in Hefezellen wirkten **(B)** Fotografien von Wachstumsanalysen mit Deletionsstämmen deren Deletionen konsistent verstärkend auf die TDP-43-Zytotoxizität wirkten. Alle Bilder sind repräsentativ für je 6 – 12 unabhängig getestete Klone pro Stamm und transformiertem Plasmid. Tendenziell dieselben Ergebnisse wurden zudem auch bei TDP-43-GFP-Expression in diesen Stämmen erzielt. Die Expression der TDP-43-Plasmide wurde durch Galaktose induziert. Die Glc-Platten dienten zur Kontrolle auf gleichmäßiges Wachstum der Hefeklone bei ausgeschalteter Expression, und die Durchführung der Experimente entsprach auch ansonsten o. g. Vorgehensweise (s. Abb. 4.1) (LV: p426Gal-L-Leervektorkontrolle)

Insgesamt konnte also mittels des gerichteten TDP43-Toxizitätsmodifikator-Screens von 23 Hefe-Deletionsstämmen in etwa einem Drittel der Fälle (d. h. in neun Stämmen) ein reproduzierbarer Einfluss auf die TDP-43-Toxizität beobachtet werden. Dabei waren es ausschließlich Deletionen von Genen für exklusiv oder zumindest hauptsächlich PB-assoziierte Proteine, die Effekte auf die toxische Wirkung des TDP-43 hatten. Deletionen von expliziten SG-Komponenten hatten hingegen keinen Einfluss auf die TDP-43-Toxizität unter den gewählten Bedingungen. Zusammen könnte das auf eine wichtige Rolle des mRNA-Abbaus bei der Ausprägung toxischer Effekte durch TDP-43-Expression in Hefezellen hindeuten.

Unabhängig davon zeigte ein anschließend vorgenommener Vergleich der Ergebnisse des TDP-43- und des Ataxin-2-Screens (s. v. Abs.) außerdem, dass tatsächlich zwei Gendeletionen einen Einfluss auf wachstumshemmende Effekte beider Proteine hatten. Dabei handelte es sich um die Deletionen von POP2 und

CCR4, deren Gene für zwei Deadenylasen kodieren, die als Teil des CCR4-NOT-Komplexes essentiell für den zytoplasmatischen mRNA-Abbau sind.²⁹⁰

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Deletionsstämme Δ POP2 und Δ CCR4 im Folgenden weiteren Analysen unterzogen, um mehr über ihren Einfluss auf Ataxin-2 und TDP-43 zu erfahren.

4.3.2. Untersuchungen zur Spezifität des Einflusses der Deletionen von POP2 und CCR4 auf Ataxin-2 in *S. cerevisiae*

Wie in im vorigen Abschnitt beschrieben induzierten bzw. verstärkten die Deletionen von POP2 und CCR4 zellschädigende Auswirkungen der Expression von Ataxin-2 bzw. TDP-43 in Hefezellen. Es lässt sich deshalb vermuten, dass beiden Hefeproteinen eine wichtige Funktion beim Schutz der Zellen gegen toxische Proteine zukommt. Dies war der Grund weitere Untersuchungen in den Hefestämmen Δ POP2 und Δ CCR4 durchzuführen, in denen zunächst der Einfluss der Deletionen auf Ataxin-2 näher charakterisiert werden sollte.

Dazu wurden erneut Wachstumsanalysen vorgenommen, in denen untersucht werden sollte, ob die Deletionen auch zuvor beobachtete Effekte der Expression von Ataxin-2-Spaltprodukten beeinflussen können (s. Abs. 4.1.)

4.3.2.1. Wachstumsanalysen zu potentiellen Einflüssen der Deletionen von POP2 und CCR4 auf Effekte der Expression von Ataxin-2-Spaltprodukten in Hefezellen

Wie in Abs. 4.3.1. beschrieben zeigte ein Screen ausgewählter Hefe-Deletionsstämme hinsichtlich synthetischer Letalität bei exogener Expression von vollständigem Ataxin-2, dass diese u. a. durch die Deletionen von POP2 und CCR4 induziert werden konnte. Dementsprechend ließ sich vermuten, dass, sollte der Einfluss der Deletionen auf das Hefewachstum bei Ataxin-2-Expression spezifisch sein, dieser auch in Zellen beobachtbar sein müsste, die o. g. Ataxin-2-Spaltprodukte exprimierten (s. Abs. 4.1.1.). Dies sollte in den hier vorgestellten Wachstumsanalysen überprüft werden.

Dazu wurden wie zuvor beschrieben (s. Abs. 4.1.1.) Zellen des WT-Hefestamms sowie der Deletionsstämme Δ POP2 und Δ CCR4 mit den bereits erwähnten, galaktose-induzierbaren Plasmiden transformiert, die für das C- oder N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt kodierten. Dabei wurden zum einen o. g. Plasmide zur Expression der nicht markierten Spaltprodukte und zum anderen jene zur Expression der Redstarmarkierten Spaltprodukt-Fusionsproteine genutzt (s. Abb. 4.1). Um außerdem die Induktion synthetischer Letalität durch Ataxin-2-Expression in den Deletionsstämmen direkt verifizieren zu können, wurden die Hefestämme zudem mit o. g. Plasmid transformiert, das für vollständiges Ataxin-2 kodierte. Auf CSM/Glc/-H-Festmedium selektierte Einzelklone dieser Transformationen wurden schließlich wie in Abs. 4.1.1. beschrieben in Suspension überführt, und über Nacht bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurden wie zuvor Verdünnungsreihen der Suspensionen auf galaktose- oder glucosehaltige Festmediumplatten getropft, und diese Platten für 3 – 4 d bei 30°C inkubiert, wobei die Galaktose zur Induktion der Plasmidexpression diente. Fotoaufnahmen die dabei beobachtetes typisches Wachstum der Hefeklone zeigen sind in Abb. 4.16 zu sehen.

Darin lässt sich zunächst grundlegend erkennen, dass die Expression von vollständigem Ataxin-2 in WT-Zellen das Hefewachstum im Vergleich zur Leervektorkontrollprobe nicht beeinflusst. Dagegen war das Wachstum Ataxin-2 exprimierender Zellen der Deletionsstämme Δ POP2 und Δ CCR4 im Vergleich zu den entsprechenden Leervektorkontrollen gehemmt (vgl. je 1. und 2. Spalte in Abb. 4.16). Damit war die bereits zuvor gemachte

Beobachtung bestätigt, dass die Deletionen von POP2 und CCR4 zur Induktion Ataxin-2-vermittelter synthetischer Letalität in den Hefezellen führen (s. Abs. 4.3.1.).²⁸⁹

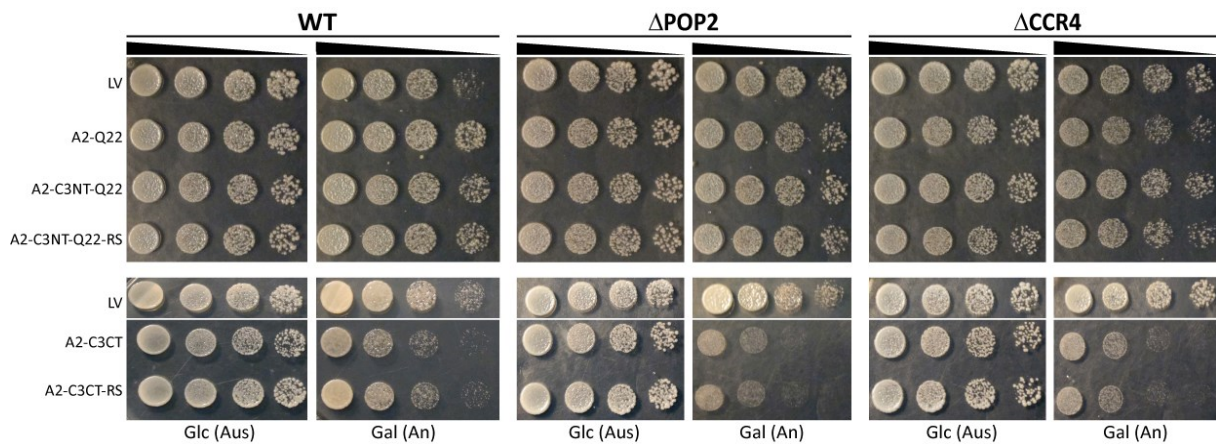


Abb. 4.16 Untersuchungen zu Einflüssen der POP2- oder CCR4-Gendeletionen auf das Wachstum von Ataxin-2 exprimierenden Hefezellen Die Experimente wurden wie in Abb. 4.1 angegeben durchgeführt, wobei auch die dort vorgestellten, rekombinanten Plasmide zur galaktose-abhängigen Expression von Ataxin-2 oder seinen Spaltprodukten (mit oder ohne Redstar(RS)-Fluoreszenzlabel) genutzt wurden. Zur direkten Kontrolle eines zuvor gezeigten synthetisch letalen Effekts der Deletionen auf Ataxin-2 exprimierende Zellen wurden solche Zellen hier ebenfalls untersucht. Alle Aufnahmen sind repräsentativ für Ergebnisse aus sechs unabhängigen Experimenten pro Stamm und transformiertem Plasmid. Die Untersuchungen bestätigten letztlich die bereits zuvor beobachtete synthetisch letale Wirkung der POP2- oder CCR4-Deletion auf Ataxin-2 exprimierende Hefezellen. Außerdem zeigten sie, dass die Deletionen eine durch Expression des Ataxin-2-C-Terminus hervorgerufene Toxizität in den Hefezellen (s. a. Abb. 4.1) verstärkten. Die Deletionen hatten allerdings keinen Einfluss auf Ataxin-2-N-Terminus exprimierende Zellen.

Darüber hinaus zeigte sich im WT-Stamm, dass dessen Zellwachstum bei Expression der C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukte im Vergleich zur Leervektorexpression gehemmt war, was bei Expression der N-terminalen Spaltprodukte nicht festgestellt wurde (s. Abb. 4.16 links). Diese Beobachtungen entsprachen damit ebenfalls den bereits zuvor gemachten Entdeckungen zum Einfluss der Spaltproduktexpression auf das Zellwachstum in diesem Stamm (s. Abs. 4.1.1.).

Ähnliches Wachstumsverhalten konnte darüber hinaus auch in den Deletionsstämmen festgestellt werden. So führte auch hier die Expression der C-terminalen Spaltprodukte zu einem gegenüber den Leervektorkontrollen gehemmten Hefewachstum, was auf die N-Terminus-Expression nicht zutraf (s. Abb. 4.16 Mitte und Rechts). Allerdings war in beiden Deletionsstämmen die durch C-Terminus-Expression ausgelöste Wachstumshemmung jeweils stärker ausgeprägt als im Fall des WT-Stamms.

Das bedeutet, dass die Deletionen von POP2 und CCR4 nicht nur bei Expression von vollständigem Ataxin-2 eine Störung des Hefewachstums induzieren, sondern auch bei Expression seines C-terminalen Spaltprodukts. Dies spricht somit zum einen erneut dafür, dass toxische Effekte des Ataxin-2 in Hefe insbesondere durch dessen C-Terminus vermittelt werden. Zum anderen untermauern die Ergebnisse zudem, dass die zuvor beobachtete, durch POP2- oder CCR4-Deletion ausgelöste, Ataxin-2-vermittelte synthetische Letalität in Hefezellen ein spezifischer Effekt gewesen war.

Um unabhängig davon noch weitere Informationen zur Spezifität der beobachteten wachstumsmodifizierenden Eigenschaften der Deletionen von POP2 und CCR4 auf Ataxin-2 exprimierende Zellen zu erlangen, wurden ferner Komplementationsanalysen durchgeführt.

4.3.2.2. Komplementationsanalysen in den Deletionsstämmen Δ POP2 und Δ CCR4 unter Verwendung von Überexpressionsvektoren

Um die Spezifität der beobachteten Wechselwirkungen zwischen POP2 und CCR4 einerseits sowie Ataxin-2 bzw. seinen Spaltprodukten andererseits zusätzlich zu verifizieren, wurden Komplementationsuntersuchungen vorgenommen. Dabei sollte getestet werden, ob die durch POP2- oder CCR4-Deletion vermittelte Verstärkung wachstumshemmender Effekte des Ataxin-2 oder seines C-terminalen Spaltprodukts durch exogene Expression der entsprechenden Hefegene komplementiert werden kann.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Zellen beider Deletionsstämmen sowie des WT-Stamms mit je zwei rekombinanten, galaktose-induzierbaren Plasmiden kotransformiert. Dabei handelte es sich zum einen um eines der o. g. Plasmide, die für Ataxin-2 oder dessen C-terminales Spaltprodukt mit oder ohne Redstar-Markierung kodierten (s. Abb. 4.1) und zum anderen um ein für POP2 oder CCR4 kodierendes Plasmid. Zudem wurden ähnlich wie in o. g. Kotransformationen (s. Abs. 4.1.5.) Kontrollansätze hergestellt in denen je eines der Plasmide durch den entsprechenden Leervektor ersetzt worden war, d. h. p423Gal-L im Fall der Ataxin-2-Plasmidkonstrukte (LV2 in Abb. 4.17) und p426Gal-L im Fall des POP2- oder CCR4-Vektors (LV1 in Abb. 4.17).

Auf CSM/Glc/-U/-H-Festmedium selektierte Einzelklone dieser Transformationen wurden schließlich für die Wachstumsanalysen wie zuvor beschrieben über Nacht im Inkubator aufgezogen und daraufhin in Verdünnungsreihen auf Agarplatten ausgetropft (s. Abs. 4.1.1.). Dabei enthielt auch hier eine der Platten galaktosehaltiges Medium zu Induktion der Plasmidexpression. Repräsentative Darstellungen der Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigt Abb. 4.17.

Dort kann man erkennen, dass das Hefewachstum der Kontrollproben, in denen der Leervektor 1 zusammen mit Ataxin-2 oder dessen C-terminalem Spaltprodukt exprimiert worden war, prinzipiell dem der o. g. Zellen entsprach, die Ataxin-2 bzw. die C-terminalen Spaltprodukte allein exprimierten (vgl. Abb. 4.16 & 4.17 links). So zeigte sich im WT-Stamm auch hier, dass Expression des vollständigen Ataxin-2 mit Leervektor 1 verglichen mit der Expression beider Leervektoren (LV1 + LV2) das Hefewachstum nicht negativ beeinflusste (s. Abb. 4.17 links). Wohingegen die WT-Zellen, die Leervektor 1 zusammen mit dem Redstar-markierten oder nicht markierten Ataxin-2-C-Terminus exprimierten bezogen auf die Doppel-Leervektorkontrolle etwas schlechter wuchsen. Das heißt, auch hier wirkte wie bereits in Abs. 4.3.2.1. beschrieben die C-Terminus-Expression im WT-Stamm toxisch, während die des vollständigen Ataxin-2 das Hefewachstum nicht beeinflusste.

Ebenso zeigte sich in den Deletionsstämmen, dass dort die gemeinsame Expression von Ataxin-2 bzw. seines C-Terminus mit dem Leervektor 1 das Hefewachstum auf ähnliche Weise beeinflusst wie Ataxin-2 bzw. C-Terminus-Expression allein (vgl. Abb. 4.16 & 4.17 rechts). So wurde im Fall der Ko-Expression von Leervektor 1 mit vollständigem Ataxin-2 in beiden Deletionsstämmen synthetische Letalität induziert (s. Abb. 4.17 rechts). Gleichzeitig konnte in diesen Experimenten bei gemeinsamer Expression des Ataxin-2-C-Terminus mit dem Leervektor 1 in den Deletionsstämmen ein wachstumshemmender Einfluss bezogen auf die Doppel-Leervektorkontrollproben festgestellt werden (s. Abb. 4.17 rechts). Dieser Einfluss war hierbei zudem, genau wie in o. g. Experimenten (s. Abs. 4.3.2.1.), in den Deletionsstämmen stärker ausgeprägt als im WT-Stamm. Somit konnte also die o. g. deletionsabhängige Verstärkung der durch den Ataxin-2-C-Terminus vermittelten Zytotoxizität auch bei Ko-Expression des C-Terminus mit Leervektor 1 bestätigt werden.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Überexpression von POP2 zusammen mit Leervektor 2 im WT-Stamm verglichen mit den Doppel-Leervektorkontrollen bereits wachstumshemmende Wirkung hatte (s. Abb. 4.17A links). Allerdings hatte in diesem Fall die Ko-Expression von POP2 und Ataxin-2 relativ zu der von POP2 und Leervektor 2 keinen zusätzlichen wachstumshemmenden Effekt auf die WT-Zellen. Dies entspricht damit den Beobachtungen für o. g. Kontrollansätze, die zeigten, dass Ataxin-2 Ko-Expression mit Leervektor 1 im Vergleich zu Doppel-Leervektorproben das Hefewachstum ebenfalls nicht negativ beeinflusste (s. o.).

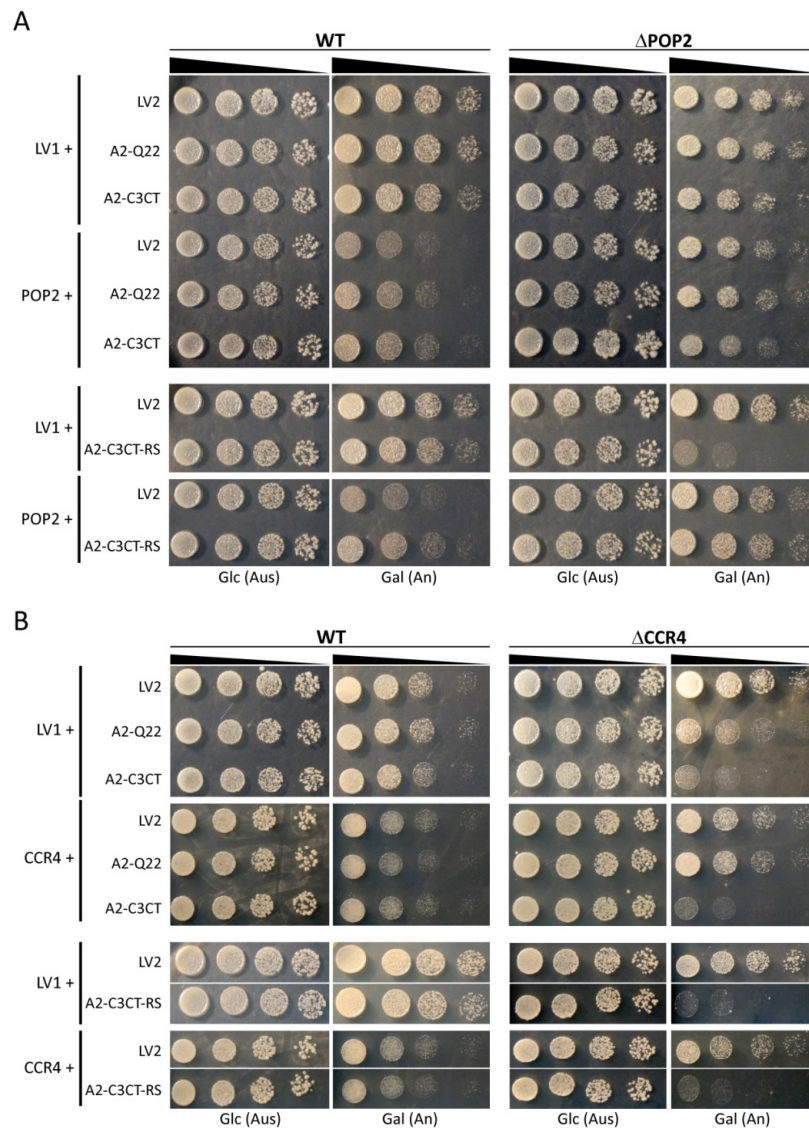


Abb. 4.17 Wachstumsanalysen zur Untersuchung komplementierender Effekte exogener POP2- oder CCR4-Expression auf die durch POP2- bzw. CCR4-Deletion ausgelöste synthetisch letale Wirkung der Ataxin-2-Expression bzw. die dadurch induzierte Verstärkung der Ataxin-2-C-Terminus-Zytotoxizität in *S. cerevisiae*. (A) Fotografien von Wachstumsanalysen (Durchführung s. Abb. 4.1) mit Zellen des WT-Hefestamms (links) sowie des ΔPOP2-Deletionsstamms (rechts). Diese exprimierten POP2 (Reihen 4 – 6 & 9 – 10) oder den entsprechenden Leervektor p426Gal-L (LV1, Reihen 1 – 3 & 7 – 8) zusammen mit Ataxin-2 (A2-Q22, Reihe 2 & 5), Ataxin-2-C-Terminus (A2-C3CT, Reihen 3 & 6), Redstarmarkiertem C-Terminus (A2-C3CT-RS, Reihen 8 & 10) oder dem Leervektor der rekombinanten Ataxin-2-Formen p423Gal-L (LV2, Reihen 1, 4, 7, 9). (B) wie (A) jedoch sind transformierte Zellen des ΔCCR4-Deletionsstamms und des WT-Hefestamms abgebildet. Alle Aufnahmen sind repräsentativ für das in 6 unabhängigen Experimenten beobachtete Hefewachstum. (Glc-Platten: keine Plasmidexpression, Gal-Platten: Plasmidexpression angeschaltet). Die synthetisch letalen Ataxin-2-Effekte konnten in beiden Fällen komplementiert werden. Die verstärkende Wirkung auf die C-Terminus-Zytotoxizität konnte jedoch nur im ΔPOP2-Stamm durch POP2-Expression komplementiert werden.

Bezüglich der im WT-Stamm festgestellten Zytotoxizität des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts in den Leervektor 1-Kontrollproben konnte jedoch bei Ko-Expression des C-Terminus mit POP2 verändertes Hefewachstum beobachtet werden (s. Abb. 4.17A links). So wuchsen Zellen, die den C-Terminus zusammen mit POP2 exprimierten besser als POP2 und Leervektor 2 ko-exprimierende Zellen, obwohl die Ko-Expression des C-Terminus mit Leervektor 1 bezogen auf Doppel-Leervektorkontrollen zu einer Wachstumshemmung geführt hatte. Demnach beeinflusste die POP2-Überexpression im WT-Stamm das durch Ataxin-2-C-Terminus-

Expression gestörte Hefewachstum positiv, wohingegen POP2-Deletion negativ auf das Wachstum von sowohl Ataxin-2 als auch dessen C-Terminus exprimierende Zellen wirkte. Dies spricht somit erneut für eine spezifische und zudem dosisabhängige Regulation von Ataxin-2 durch POP2.

Ebenso ließen ferner auch die Komplementationsanalysen im Δ POP2-Stamm eine derartige, spezifische Regulation vermuten. Dabei konnte nämlich festgestellt werden, dass die durch POP2-Deletion hervorgerufene synthetische Letalität der Ataxin-2-Expression durch exogene Expression von POP2 aufgehoben wurde. Das zeigte sich daran, dass zwar die Ko-Expression von Ataxin-2 und Leervektor 1 im Vergleich zu der beider Leervektoren in Δ POP2-Zellen synthetisch letal wirkte (s. o.), aber andererseits Δ POP2-Zellen die Ataxin-2 zusammen mit POP2 exprimierten keine Wachstumsunterschiede zu POP2 und Leervektor 2 exprimierenden Zellen aufwiesen (s. Abb. 4.17A rechts).

Ähnliches konnte zudem im Fall der C-Terminus-Expression beobachtet werden, deren zytotoxische Wirkung wie beschrieben im Δ POP2-Stamm stärker war als im WT-Stamm, wie die Leervektor 1-Kontrollansätze zeigten (s. Abb. 4.17A). Auch in diesem Fall konnte nämlich beim Vergleich des Wachstums POP2 und C-Terminus ko-exprimierender Zellen mit dem von Zellen die POP2 und Leervektor 2 gemeinsam exprimierten festgestellt werden, dass dieses sich durch die C-Terminus-Expression kaum verändert hatte. Die POP2-Expression wirkte also auch im Δ POP2 Stamm ähnlich wie bereits für den WT-Stamm beobachtet (s. o.) den zytotoxischen Effekten des Ataxin-2-C-Terminus entgegen.

Im Gegensatz dazu hatte die CCR4-Expression bereits im WT-Stamm andere Effekte auf das Hefewachstum als die POP2-Expression. So zeigte sich in diesem Fall, dass das Wachstums der Ataxin-2 und CCR4 ko-exprimierenden Zellen im Vergleich zu dem der CCR4 und Leervektor 2 ko-exprimierenden Zellen leicht gehemmt war (s. Abb. 4.17B). Das bedeutet, dass in diesem Fall die Überexpression von CCR4 zur Induktion von Ataxin-2-vermittelter synthetischer Letalität führte, was wie erwähnt auch für die CCR4-Deletion beobachtet werden konnte (s. Abb. 4.16). Dies könnte auf eine CCR4-Autoregulation via negativer Rückkopplung hinweisen, wobei eine durch CCR4-Überexpression ausgelöste CCR4-Herabregulation, ähnlich wie die CCR4-Deletion, die zytotoxische Wirkung von vollständigem Ataxin-2 induziert haben könnte. Da allerdings abgesehen davon ein durch CCR4-Überexpression verursachter verstärkender Einfluss auf die zytotoxische Wirkung des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts, wie er durch die CCR4-Deletion verursacht worden war, im WT-Stamm ausblieb (s. o.), bleibt fraglich ob eine solche CCR4-Rückkopplungsregulation tatsächlich stattfindet.

Ferner lässt sich bezüglich des Ataxin-2-C-Terminus generell sagen, dass dessen Ko-Expression mit CCR4 im WT-Stamm zu einem leicht gehemmten Zellwachstum bezogen auf das der CCR4 und Leervektor 2 ko-exprimierenden Zellen führte (s. Abb. 4.17B). Auch unter diesen Bedingungen konnte also eine Ataxin-2-C-Terminus-abhängige Zytotoxizität festgestellt werden, was damit den Beobachtungen entsprach, die auch bei alleiniger C-Terminus-Expression gemacht worden waren (s. Abb. 4.16 & 4.17 LV1-Kontrollproben). Anders als die POP2-Überexpression konnte demnach die CCR4-Überexpression im WT-Stamm die toxische Wirkung der C-Terminus-Expression nicht kompensieren.

Die CCR4-Überexpression im WT-Stamm hatte demzufolge, im Gegensatz zur POP2-Überexpression, unterschiedlichen Einfluss auf die zytotoxischen Effekte der Expression von Ataxin-2 einerseits und dessen C-Terminus andererseits (vgl. Abb. 4.17 A & B links). Dies könnte darauf hinweisen, dass die von Ataxin-2 und seinem C-terminalen Spaltprodukt vermittelte Wachstumshemmung auf verschiedene Arten durch CCR4 beeinflusst wird. Demnach wäre entsprechend o. g. Ergebnisse der CCR4-Einfluss auf vollständiges Ataxin-2

größer als auf dessen C-Terminus, da nur ersteres sowohl von CCR4-Überexpression als auch -Deletion beeinflusst worden war.

Für eine solche unterschiedliche Regulation von Ataxin-2 und seinem C-Terminus durch CCR4 sprechen außerdem die Ergebnisse der Komplementationsanalysen im Δ CCR4-Stamm. Dabei zeigte sich nämlich, dass die dort induzierte synthetische Letalität durch Ataxin-2-Expression (s. o.), bei Ko-Expression des Ataxin-2 mit CCR4 nicht mehr festgestellt werden konnte (s. Abb. 4.17B). Man kann also davon ausgehen, dass in diesem Fall die wachstumshemmenden Effekte der CCR4-Deletion bei Ataxin-2-Expression von der Überexpression des CCR4 komplementiert wurden. Demgegenüber konnte die relativ erhöhte Zytotoxizität der Ataxin-2-C-Terminus-Expression im Δ CCR4-Stamm gegenüber der im WT-Stamm, die für die Leervektor 1-Kontrollproben beobachtet wurde (s. o.), durch exogene Expression von CCR4 nicht aufgehoben werden. Dies ließ sich daran erkennen, dass sowohl die Ko-Expression von C-Terminus und Leervektor 1 relativ zur Expression beider Leervektoren als auch die von C-Terminus und CCR4 relativ zu der von Leervektor 2 und CCR4 im Δ CCR4-Deletionsstamm beide zu starker Hemmung des Hefewachstums führten (s. Abb. 4.17B).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die exogene Expression beider Deadenylase-Proteine im jeweiligen Deletionsstamm die synthetisch letalen Effekte der Ataxin-2-Expression komplementieren konnte. Das bedeutet, dass die Einflüsse der CCR4- und POP2-Deletionen auf die durch Ataxin-2 vermittelte Wachstumshemmung spezifisch sind, da sie direkt via POP2- bzw. CCR4-Expression aufgehoben werden konnten. Ebenso konnte die Spezifität der POP2-Interaktion mit dem C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukt festgestellt werden, da POP2-Expression sowohl im WT- als auch im Δ POP2-Stamm den toxischen Effekten der Spaltproduktexpression entgegenwirkte. Die toxizitätssteigernden Effekte der CCR4-Deletion bei Expression des Ataxin-2-C-Terminus konnten jedoch durch CCR4-Überexpression nicht aufgehoben werden. Ferner wurde durch CCR4-Überexpression im WT-Stamm zwar das Wachstum der Ataxin-2 exprimierenden Zellen negativ beeinflusst, sie hatte jedoch keinen Einfluss auf die dort beobachtete zytotoxische Wirkung des Ataxin-2-C-Terminus. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass CCR4 das Ataxin-2-Protein und dessen C-Terminus auf unterschiedliche Weise reguliert. Dabei schien der CCR4-Einfluss auf die Wirkung von vollständigem Ataxin-2 eher durch direkte Interaktion vermittelt worden zu sein, wohingegen dessen Einfluss auf die Effekte des C-Terminus möglicherweise eher indirekt gewesen war. Dies folgt daraus, dass die Wirkung von vollständigem Ataxin-2 sowohl durch CCR4-Überexpression als auch durch dessen Deletion beeinflusst worden war, was im Fall des C-Terminus nur auf die CCR4-Deletion zutraf.

Insgesamt führte somit in den Hefewachstumsanalysen mit den Deletionsstämmen Δ POP2 und Δ CCR4, ähnlich wie in den WT-Untersuchungen (s. Abs. 4.1.1.), besonders die Expression des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts zu deutlichen wachstumshemmenden Effekten. Diese waren zudem in den Deletionsstämmen stärker ausgeprägt als im WT-Stamm (s. Abs. 4.3.2.1.). Außerdem konnte im WT-Stamm bereits gezeigt werden, dass der Ataxin-2-C-Terminus stark dazu neigt sich in mikroskopisch sichtbaren Foki anzureichern, was die Ursache für dessen toxische Wirkung in Hefezellen gewesen sein könnte (s. Abs. 4.1.2. – 4.1.4.). Es war also denkbar, dass die POP2- und CCR4-Deletionen zumindest bezüglich des Ataxin-2-C-Terminus ihre regulatorische Wirkung über Beeinflussung der Ataxin-2-Fokibildung ausüben. Dies sollte in folgenden mikroskopischen Experimenten näher untersucht werden (s. Abs. 4.3.3.). Da POP2 und CCR4 zudem PB-Komponenten sind, sollte dabei außerdem geprüft werden, ob deren Deletionen die PB- oder SG-Bildung in Hefe beeinflussen, was ebenfalls ein möglicher Grund für deren Einflüsse auf die C-Terminus vermittelte Zytotoxizität gewesen sein könnte.

4.3.3. Quantitative Fluoreszenzmikroskopie zur Fokibildung von Ataxin-2-Spaltprodukten in Δ POP2 und Δ CCR4 unter Standard- und Stressbedingungen

Wie bereits erwähnt, ließen o. g. Experimente im WT-Hefestamm vermuten, dass die zytotoxische Wirkung des C-terminalen Ataxin-2-Abschnitts möglicherweise mit dessen hoher Neigung zur Fokibildung zusammenhängen könnte (s. Abs. 4.1.2. - 4.1.4.). Aus diesem Grund sollten im Folgenden potentielle Einflüsse der POP2- oder CCR4-Deletionen auf die Fokibildung des Ataxin-2-C-Terminus näher untersucht werden. So sollte überprüft werden, ob die Deletionen ihre verstärkenden Effekte auf die C-Terminus-Toxizität in o. g. Hefewachstumsanalysen (s. Abs. 4.3.2.), möglicherweise über eine Beeinflussung der C-Terminus-Fokibildung vermittelt haben könnten.

Darüber hinaus hatten frühere Untersuchungen zu POP2 und CCR4 gezeigt, dass beide Proteine Komponenten von Hefe-PB sind, die ihrerseits die Assemblierung von Hefe-SG begünstigen.^{99,179} Da POP2 und CCR4 somit in die Stressantwort der Hefezellen involviert sind war denkbar, dass sich deren Deletionen in gestressten Zellen auf die C-Terminus-Fokibildung anders auswirken könnten als in ungestressten. Deshalb sollten potentielle deletionsabhängige Einflüsse auf die C-Terminus-Fokibildung nicht nur in unbehandelten sondern auch in azid- oder hitzebehandelten Zellen analysiert und verglichen werden. Daneben wurde auch untersucht, ob die PB- oder SG-Bildung *per se* durch die Deletionen beeinflusst wird, da ein solcher Einfluss ebenfalls eine mögliche Ursache für die deletionsabhängige Verstärkung wachstumshemmender Effekte von Ataxin-2 bzw. dessen C-Terminus in den Hefezellen gewesen sein könnte (s. Abs. 4.3.4.).

4.3.3.1. Studien zur Fokibildung durch Ataxin-2-Spaltprodukte in nicht stressbehandelten Hefezellen

Für die Untersuchungen potentieller Effekte der Deletionen von POP2 oder CCR4 auf das Fokibildungsverhalten des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts in nicht stressbehandelten Zellen wurden zunächst Zellen des WT-Stamms sowie des Δ POP2- und Δ CCR4-Deletionsstamms transformiert. Dazu wurde das aus Abs. 4.1.1. bekannte galaktose-induzierbare Plasmid genutzt, das für Redstar-markierten Ataxin-2-C-Terminus kodierte. Um zudem die Spezifität hypothetischer Deletionseinflüsse auf die C-Terminus-Fokibildung zu verifizieren, wurden die drei Hefestämme zusätzlich mit dem ebenfalls o. g. Plasmid transformiert, das für Redstar-markierten Ataxin-2-N-Terminus kodierte.

Die Transformationen wurden dabei wie bereits zuvor erwähnt durchgeführt (s. Abs. 4.1.1.), wobei auch hier der plasmidkodierte Auxotrophiemarker URA3 zur Selektion transformierter Zellen auf Uracil-Mangelmedium-Agarplatten diente. Auf diese Weise selektierte Einzelklone transformierter Zellen wurden daraufhin entsprechend der in Abs. 4.1.2. beschriebenen Vorgehensweise für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen vorbereitet, wobei die Plasmidexpression mittels Galaktose induziert wurde. Die Mikroskopieanalysen erfolgten anschließend wie in Abs. 4.2.1. dargestellt, wobei Fotografien zufällig gewählter Probenbereiche erstellt wurden. Die Fokusebene wurde dabei jeweils mit Hilfe des Transmissionskanalbildes eingestellt, so dass eine auf Fluoreszenzsignalen basierende Vorauswahl bestimmter Probenbereiche für die Aufnahmen ausgeschlossen werden konnte.

Für die quantitative Auswertung wurden daraufhin mit Hilfe der Software ImageJ fokipositive Zellen gezählt. Dabei wurden die Zellen zudem hinsichtlich der Anzahl enthaltener Foki unterschieden. So konnte nicht nur der Anteil fokipositiver Zellen bezogen auf die Gesamtmenge fluoreszierender Zellen sondern auch die durchschnittliche Anzahl Foki pro fokipositiver Zelle als quantitative Ergebnisse ermittelt werden. Der relative

Anteil fokipositiver Zellen war dabei allerdings mitunter auch von der Effizienz der galaktosevermittelten Expressionsinduktion abhängig, die in den einzelnen Proben sehr variabel sein könnte. Entsprechend war dieser Wert für die quantitative Analyse eher ungeeignet. Deshalb wurde die durchschnittliche Fokizahl pro fokipositiver Zelle als Parameter für die Quantifizierung der Ataxin-2-Spaltprodukt-Fokibildung gewählt, weshalb sich nachfolgend allein darauf bezogen wird. Die grafische Darstellung der Zellzählungen sowie beispielhafte Mikroskopieaufnahmen zeigt Abb. 4.18.

Dort kann man erkennen, dass wie bereits zuvor beobachtet (s. Abb. 4.2) die galaktose-induzierte Expression des fluoreszenzmarkierten Ataxin-2-C-Terminus in einem Großteil der WT-Zellen zur Bildung von C-Terminus-Fluoreszenzfoki führte (vgl. Abb. 4.18A links & 4.2). Zudem ergab die Quantifizierung der C-Terminus-Fokibildung im WT-Stamm, dass dort durchschnittlich etwa 1,6 Foki pro fokibildender Zelle auftraten bzw. in der abgebildeten Fokusebene erkannt werden konnten (s. Abb. 4.18B).

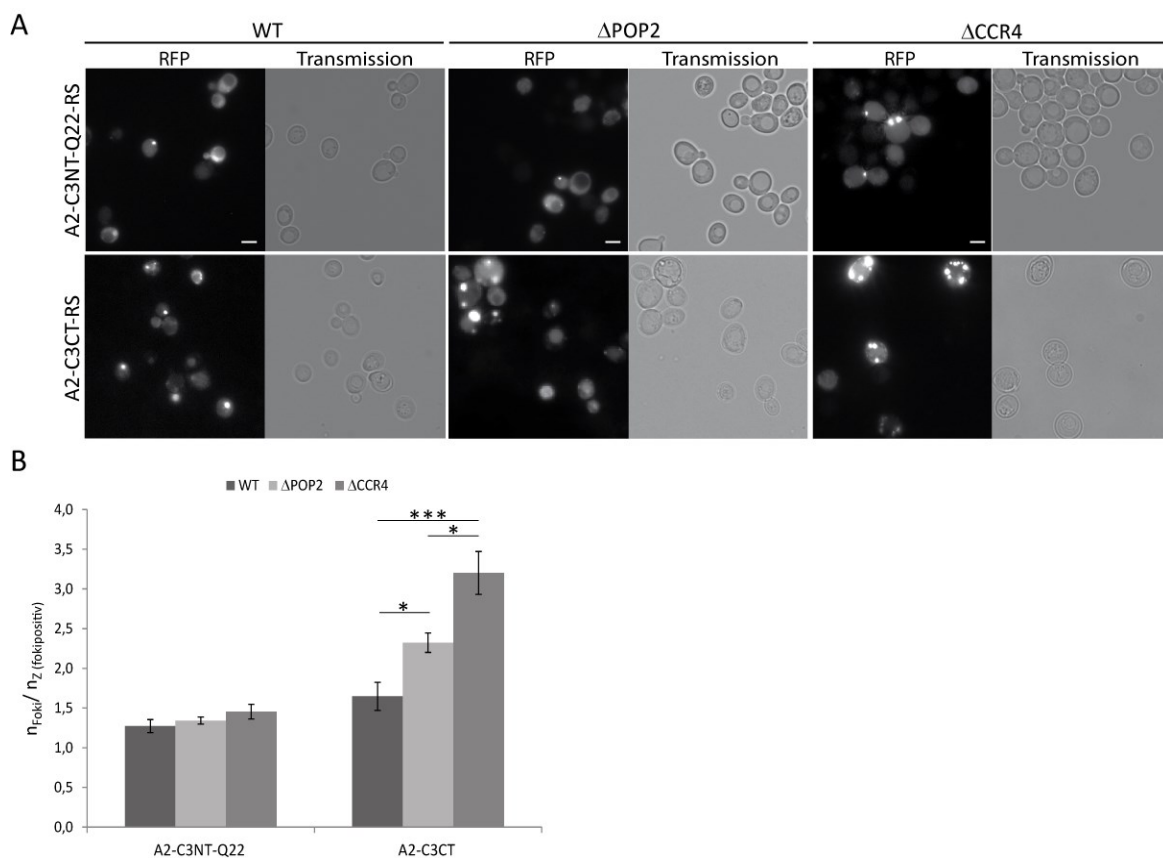


Abb. 4.18 Quantitative mikroskopische Analyse der Fokibildung zweier Ataxin-2-Spaltprodukte in Zellen des WT-Hefestamms sowie der Hefe-Deletionsstämme ΔPOP2 und ΔCCR4. (A) Exemplarische Aufnahmen von Zellen der entsprechenden Stämme die Redstar-markierten Ataxin-2-N-Terminus (oben) und -C-Terminus (unten) galaktose-induziert exprimierten (Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 μm) **(B)** Zusammengefasste Ergebnisse von Zählungen der Spaltprodukt-Fluoreszenzfoki aus sechs unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte (plus Standardfehler) der berechneten durchschnittlichen Fokianzahl pro fokipositiver Zelle. ΔPOP2-Zellen zeigten signifikant erhöhte Fokibildung gegenüber WT-Zellen. ΔCCR4-Zellen zeigten sowohl signifikant erhöhte Fokibildung gegenüber ΔPOP2-Zellen als auch höchst signifikante verstärkte Fokibildung gegenüber WT-Zellen.

Im Gegensatz dazu, konnte für den N-Terminus im WT-Stamm nur selten Fokibildung festgestellt werden, was ebenfalls den zuvor gemachten Beobachtungen entsprach (vgl. Abb. 4.18A links & 4.2). Diesbezüglich zeigte sich zudem, dass im Durchschnitt ca. 1,3 N-Terminus-Foki pro fokipositiver Zelle gebildet worden waren.

Die Quantifizierung der Fokibildung des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts im ΔPOP2-Stamm ergab ferner, dass dort durchschnittlich ca. 2,3 Foki pro fokipositiver Zelle detektiert werden konnten. In diesem

Zusammenhang bestätigte ein zweiseitiger t-Test darüber hinaus, dass sich die durchschnittliche Fokianzahl pro Zelle im Δ POP2-Stamm signifikant ($p \approx 0,012$) von der im WT-Stamm unterschied (s. Abb. 4.18B). Da außerdem eine solche Zunahme der Fokibildung bezüglich der Ataxin-2-N-Terminus-Foki beim Vergleich der Δ POP2- und der WT-Proben nicht festgestellt werden konnte, kann man davon ausgehen, dass der beobachtete deletionsabhängige Effekt spezifisch war.

Ferner ergab die Auszählung der Δ CCR4-Zellen, dass diese durchschnittlich etwa 3,2 C-Terminus-Foki gebildet hatten, womit diese Zellen verglichen mit denen der anderen beiden Stämme die stärkste Fokibildung zeigten. Dabei ergab ein zweiseitiger t-Test diesbezüglich, dass die beobachtete Zunahme der Fokibildung im Δ CCR4-Stamm im Vergleich zu der im WT-Stamm höchst signifikant ($p \approx 0,001$) war. Darüber hinaus konnte auf diese Weise zudem festgestellt werden, dass die Fokibildung in Δ CCR4-Zellen verglichen mit der in Δ POP2-Zellen ebenfalls signifikant ($p \approx 0,021$) erhöht war.

Bezüglich der Fokibildung des N-terminalen Ataxin-2-Abschnitts konnte hingegen auch im Δ CCR4-Stamm keine Änderung gegenüber dem WT-Stamm erkannt werden. Dies lässt somit wie im Fall des Δ POP2-Stamms darauf schließen, dass die durch CCR4-Deletion bewirkte Zunahme der Fokibildung des Ataxin-2-C-Terminus spezifisch war.

Diese Analysen zeigten also letztlich eindeutig, dass die Deletionen von POP2 und CCR4 die Fokibildung des Ataxin-2-C-Terminus in Hefezellen signifikant verstärkten. Da sie dort zudem wie zuvor demonstriert die toxische Wirkung der C-Terminus Expression förderten (s. Abs. 4.2.2.), spricht dies zusammengefasst erneut für o. g. Hypothese, nach der die Fokibildung des Ataxin-2-C-Terminus ursächlich für dessen Zytotoxizität in Hefe sein könnte (s. Abs. 4.1.2.).

4.3.3.2. Analyse des Fokibildungsverhaltens von Ataxin-2-Spaltprodukten in stressbehandelten Zellen

Da POP2 und CCR4 wie zuvor erwähnt als Komponenten von PB in die zelluläre Stressantwort involviert sind, sollte hier auch überprüft werden, ob Stress die Effekte der POP2 oder CCR4-Deletion auf die Fokibildung des Ataxin-2-C-Terminus beeinflusst.^{99,179}

Dazu wurde, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, vorgegangen. Die Zellen wurden jedoch in diesem Fall kurz vor ihrer mikroskopischen Analyse entweder Hitze- oder NaN_3 -Stress ausgesetzt, wobei die Konditionen der Stressbehandlung den in Abs. 4.1.4.1. genannten entsprachen. Die Quantifizierung der Fokibildung erfolgte daraufhin wie o. g. mit Hilfe der ImageJ-Software (s. v. Abs.). Repräsentative Mikroskopieaufnahmen dieser Experimente sowie die grafische Darstellung der Zellzählungen zeigt Abb. 4.19.

Diesbezüglich sei zunächst darauf hingewiesen, dass die in Abb. 4.19C dargestellten Werte der mittleren Fokianzahl pro fokibildender Zelle für nicht stressbehandelte Proben identisch zu den bereits im vorigen Abschnitt präsentierten Werten sind. Das liegt daran, dass die Untersuchungen der stressbehandelten Zellen parallel zu o. g. Analysen nicht behandelter Hefezellen durchgeführt wurden. So sollte erreicht werden, dass alle Proben, bis auf die Applikation exogener Stressoren, denselben Wachstumsbedingungen ausgesetzt waren, um die unbehandelten Proben als Referenz für den Vergleich mit den stressbehandelten Proben nutzen zu können.

Dieser Vergleich zeigte schließlich, dass die Stressbehandlung weder im WT-Stamm noch im Δ POP2- oder Δ CCR4-Stamm zu signifikant erhöhter Fokibildung des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts führte. Dies galt dabei sowohl für die hyperthermischen als auch die oxidativen Stressbedingungen (s. Abb. 4.19B & C.).

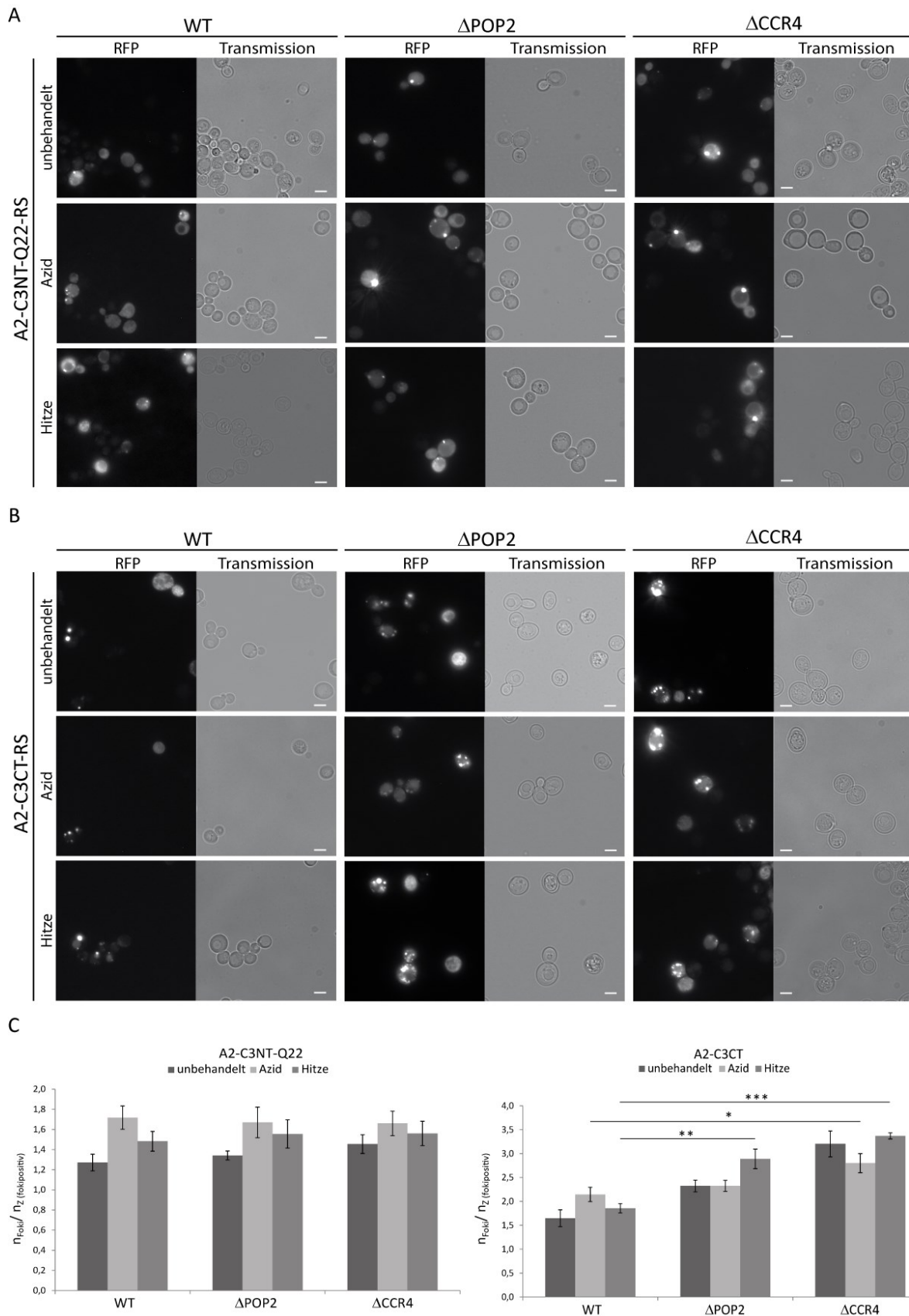


Abb. 4.19 Quantitative mikroskopische Analyse der Fokibildung zweier Ataxin-2-Spaltprodukte in stressbehandelten Zellen des WT-Hefestamms sowie der Hefe-Deletionsstämme Δ POP2 und Δ CCR4. (A) Exemplarische Aufnahmen von Zellen der o. g. Stämme die Redstar-markierten Ataxin-2-N-Terminus unter Standardbedingungen (oben), NaN_3 -Stress (Mitte) oder Hitzestress (unten) galaktose-induziert exprimierten. (B) Exemplarische Aufnahmen wie in (A) jedoch von Ataxin-2-C-Terminus exprimierenden Zellen (Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 μm) (C) Zusammengefasste Ergebnisse von Zählungen der Spaltprodukt-Fluoreszenzfoki aus sechs unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind

arithmetische Mittelwerte (plus Standardfehler) der berechneten durchschnittlichen Fokianzahl pro fokibildender Zelle. Der N-Terminus (links) zeigte keine signifikanten Änderungen seiner Fokibildung. Die C-Terminus-Fokibildung (rechts) wurde, wie zuvor beobachtet, durch o. g. Deletionen signifikant verstärkt (s. Abb. 4.18), blieb jedoch von Stress unbeeinflusst.

Andererseits zeigte sich in Analogie zu den unbehandelten Proben beim Vergleich der hitzebehandelten Zellen untereinander, dass auch in diesem Fall die Ataxin-2-C-Terminus-Fokibildung im Δ CCR4- oder Δ POP2-Deletionsstamm gegenüber der im WT-Stamm erhöht war. So konnten durchschnittlich ca. 3,4 Foki pro fokibildender Zelle im Δ CCR4-Stamm und etwa 2,9 Foki pro fokibildender Zelle im Δ POP2-Stamm gezählt werden (s. Abb.4.19C). Im Fall der WT-Zellen lag dieser Wert hingegen lediglich bei rund 1,9. Außerdem ergab ein zweiseitiger t-Test diesbezüglich, dass die Fokibildung im Δ CCR4-Stamm ($p \approx 3,2 \times 10^{-5}$) höchst signifikant und im Δ POP2-Stamm hoch signifikant ($p \approx 0,009$) gegenüber der im WT-Stamm verstärkt war.

Ferner zeigte die Analyse der NaN_3 -behandelten Proben hinsichtlich der Ataxin-2-C-Terminus-Fokibildung tendenziell ähnliche Unterschiede zwischen Zellen des WT-Stamms und jenen der beiden Deletionsstämme, wie zuvor für hitzebehandelte oder unbehandelte Zellen beobachtet (s. Abb. 4.19B & C). Das heißt, auch in diesem Fall zeigten Δ CCR4-Zellen die stärkste durchschnittliche Fokibildung (ca. 2,8 Foki / fokibildende Zelle), gefolgt von Δ POP2-Zellen (ca. 2,3 Foki/ fokibildende Zelle) und den WT-Zellen (ca. 2,2 Foki/ fokibildende Zelle). Allerdings lässt sich an den Durchschnittswerten auch erkennen, dass die in mit NaN_3 -behandelten Zellen beobachteten Unterschiede zwischen den drei Hefestämmen bezüglich der C-Terminus-Fokibildung verglichen mit denen in unbehandelten oder hitzebehandelten Zellen relativ gering waren. Dementsprechend ergab ein auch bezüglich der NaN_3 -Proben durchgeführter t-Test, dass lediglich die Fokibildung im Δ CCR4-Stamm signifikant gegenüber der im WT-Stamm erhöht war ($p \approx 0,04$). Der Hauptgrund für diese vergleichsweise geringen Unterschiede war dabei vermutlich die wenn auch nicht signifikante erhöhte, dennoch relativ starke C-Terminus-Fokibildung in NaN_3 -behandelten WT-Zellen im Vergleich zu unbehandelten oder hitzebehandelten WT-Zellen (s. Abb.4.19C).

Für die Spezifität der beobachteten Effekte spricht außerdem, dass, wie bereits zuvor für unbehandelte Hefezellen gezeigt, auch unter Stressbedingungen die Fokibildung des exogen exprimierten Ataxin-2-N-Terminus in allen drei untersuchten Stämmen nahezu identisch war (s. Abb. 4.19A & C).

Zusammengefasst lässt sich somit festhalten, dass sowohl die Deletion von POP2 als auch CCR4, die Fokibildung des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts in unbehandelten Hefezellen verstärkten. Dies lässt somit umgekehrt darauf schließen, dass POP2 und CCR4 im WT-Stamm wahrscheinlich der Bildung von Ataxin-2-C-Terminus-Foki entgegenwirken. Dabei war der verstärkende Effekt der Deletionen auf die Fokibildung, gemessen an der durchschnittlichen Anzahl von Ataxin-2-C-Terminus-Foki pro fokipositiver Zelle im Δ CCR4-Deletionsstamm am größten, gefolgt vom Δ POP2-Deletionsstamm. Die Unterschiede zur Fokibildung im WT-Hefestamm waren jedoch in beiden Fällen signifikant. Dies spricht somit erneut dafür, dass die Foki des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts tatsächlich zytotoxische Effekte in *S. cerevisiae* vermitteln könnten. Dies zugrunde gelegt, könnte möglicherweise der in Δ CCR4 relativ zu Δ POP2 größere verstärkende Einfluss auf die C-Terminus-Fokibildung auch die ausbleibende Komplementation toxizitätsmodifizierender Effekte der CCR4-Deletion durch CCR4-Expression in o. g. Wachstumsanalysen erklären (s. Abs. 4.3.2.2.). Der Grund dafür könnte dann schlicht darin gelegen haben, dass die exogene CCR4-Expression im Gegensatz zur POP2-Expression nicht effizient genug war, um die relativ starken Effekte der CCR4-Deletion auf die C-Terminus-Fokibildung zu kompensieren.

Darüber hinaus ergab der Vergleich stressbehandelter und unbehandelter Hefezellen, dass weder NaN_3 -Stress noch Hitzestress die Fokibildung der Ataxin-2-Spaltprodukte im WT-, ΔPOP2 - oder dem ΔCCR4 -Stamm signifikant änderte. Diese Ergebnisse entsprachen folglich den Beobachtungen aus o. g. Experimenten, in denen die Fokibildung von konstitutiv exprimiertem Ataxin-2-C-Terminus unter Stress in Hefe-GFP-Markerstämmen analysiert worden war (s. Abs. 4.1.4.), und bestätigten somit die begründete Annahme, dass die Spaltprodukt-Foki keine Hefe-SG sind.

Insgesamt zeigte sich also, dass hyperthermischer oder oxidativer Stress die durch POP2 und CCR4-Deletion vermittelten Einflüsse auf die Fokibildung des Ataxin-2-C-Terminus nur wenig beeinflusst.

In weiteren quantitativen Mikroskopie-Experimenten sollte nun zudem geklärt werden, in wie weit die POP2- oder CCR4-Deletion die PB und SG-Bildung in Hefezellen unter Standard- und Stressbedingungen beeinflusst.

4.3.4. Quantitative fluoreszenzmikroskopische Studien zur Bildung von P-Bodies und Stress-Granula in ΔPOP2 und ΔCCR4

Die zuvor beschriebenen Experimente hatten bereits gezeigt, dass die Fokibildung des C-terminalen Redstar-Ataxin-2-Spaltprodukts durch POP2- oder CCR4-Deletionen verstärkt wird (s. v. Abs.). Diese Effekte könnten somit, gemäß o. g. Hypothese von einer mutmaßlich zytotoxischen Wirkung der Ataxin-2-C-Terminus-Foki in *S. cerevisiae* (s. Abs. 4.1.2. – 4.1.4.), ein Grund für die deletionsabhängig erhöhte C-Terminus-Zytotoxizität in o. g. Wachstumsanalysen (s. Abs. 4.3.1. & 4.3.2.) gewesen sein.

Davon unabhängig bestand jedoch zudem die Möglichkeit, dass die relativ zum WT-Stamm in den Deletionsstämmen gesteigerten zellschädigenden Effekte von Ataxin-2 bzw. seinem C-terminalen Spaltprodukt durch gestörte PB- oder SG-Bildung hervorgerufen worden sein könnte. Dies konnte vermutet werden, da sowohl POP2 als auch CCR4 bereits als PB-Komponenten identifiziert worden waren.^{99,179} Deshalb wurde an dieser Stelle auch untersucht, ob die Deletionen von POP2 oder CCR4 die Bildung von Hefe-PB- oder SG in unbehandelten sowie in oxidativ und hyperthermisch gestressten Zellen beeinflussen.

Zu diesem Zweck wurden der WT-, der ΔPOP2 - und der ΔCCR4 -Hefestamm wie zuvor beschrieben (s. Abs. 4.1.1.) mit einem von zwei Plasmidvektoren transformiert, die in der Arbeitsgruppe von Prof. R. Parker entwickelt worden waren.⁹⁹ Dabei kodierte eines der Plasmide für ein C-terminal mCherry (mCh)-markiertes EDC3-Fusionsprotein (PB-Marker) und das zweite für ein ebenso markiertes PUB1-Fusionsprotein (SG-Marker), deren Expression jeweils von ihren eigenen Promotoren kontrolliert wurde. Ferner kodierten die Plasmide für den URA3-Auxotrophiemarker, der die Selektion transformierter Zellen auf Uracil-Mangelmedium ermöglichte. Selektierte Einzelklone o. g. Transformationen dienten schließlich als Ausgangsmaterial für die folgenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen.

Die Vorbereitung der Proben für die Mikroskopieanalysen inklusive ihrer Stressbehandlung mit NaN_3 und Hitze erfolgte dabei wie bereits in Abs. 4.1.4.1. beschrieben. Daraufhin wurden ebenfalls wie zuvor geschildert (s. Abs. 4.3.3.1.) Mikroskopieaufnahmen zufälliger Probenregionen erstellt und die PB- bzw. SG-Bildung via ImageJ-Software quantifiziert. Dabei wurde auch in diesem Fall der Anteil PB- bzw. SG-positiver Zellen an der Gesamtmenge fluoreszierender Zellen sowie die mittlere Anzahl an PB- oder SG- pro PB-/SG-positiver Zelle bestimmt. Anders als bei den Untersuchungen zur Ataxin-2-C-Terminus-Fokibildung (s. Abs. 4.3.3.) konnten hier jedoch beide Parameter zur Auswertung genutzt werden. Dies lag daran, dass die Fusionsproteine aufgrund ihrer konstitutiven Expression in allen Proben sehr gleichmäßig in nahezu jeder Zelle nachgewiesen werden

konnte. Dementsprechend war der Anteil PB-/SG-positiver Zellen an der Gesamtheit fluoreszierender Zellen hier weniger variabel und zudem, anders als in den Experimenten zur C-Terminus-Fokibildung, nicht von der Effizienz der galaktosevermittelten Proteinexpressions-Induktion abhängig (s. Abs. 4.3.3.1.). Er konnte deshalb in diesem Fall als valide Größe zur Quantifizierung der PB-/SG-Bildung angesehen werden.

Die bei diesen Experimenten bezüglich der Bildung EDC3-positiver PB ermittelten Ergebnisse der quantitativen Auswertung sowie entsprechende beispielhafte Mikroskopieaufnahmen zeigt Abb. 4.20.

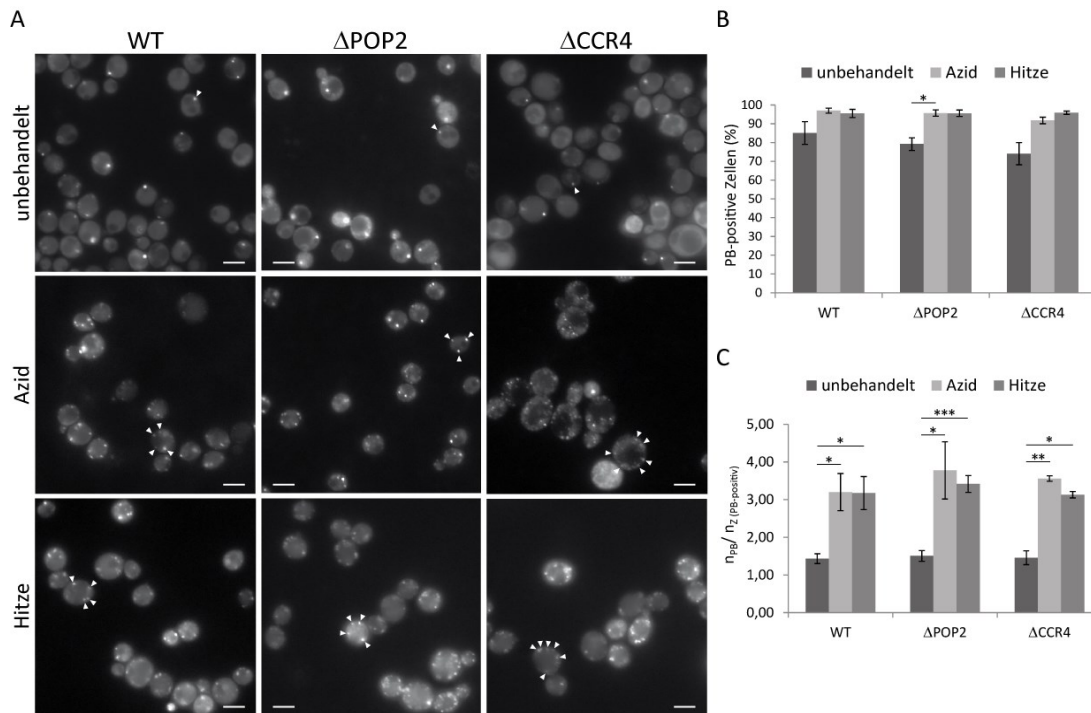


Abb. 4.20 Quantitative mikroskopische Studie zur PB-Bildung in stressbehandelten Zellen des WT-Hefestamms sowie der Hefe-Deletionsstämme Δ POP2 und Δ CCR4. (A) Exemplarische Aufnahmen von unbehandelten (oben), NaN_3 -behandelten (Mitte) oder hitzebehandelten (unten) Zellen, die EDC3-mCh (PB-Marker) konstitutiv exprimierten (Pfeilspitzen: PB, Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 μm) (B) & (C) Zusammengefasste Ergebnisse von Zählungen der PB aus sechs unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte (plus Standardfehler) des berechneten, durchschnittlichen Prozentsatzes PB-bildender Zellen (B) bzw. der durchschnittlichen PB-Anzahl pro PB-bildender Zelle (C). Beide Stressoren erhöhten die PB-Bildung in allen drei Stämmen signifikant. Die Deletionen von POP2 und CCR4 hatten keinen signifikanten Einfluss auf die PB-Bildung.

Dort kann man zunächst erkennen, dass die mit NaN_3 oder Hitze behandelten Proben in jedem der drei untersuchten Stämme verglichen mit den unbehandelten Proben einen erhöhten Anteil PB-positiver Zellen bezogen auf die Gesamtzellmenge aufwiesen (s. Abb. 4.20B). Jedoch konnte in diesbezüglich durchgeführten t-Tests lediglich zwischen azidbehandelten und unbehandelten Δ POP2-Proben ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \approx 0,013$) festgestellt werden. Dabei lag der Anteil PB-positiver Zellen in diesem Fall bei ca. 96 % in den gestressten und bei ca. 79 % in den ungestressten Proben.

Eindeutigere Ergebnisse lieferte allerdings die Ermittlung der durchschnittlichen PB-Anzahl pro PB-positiver Zelle (s. Abb. 4.20C), für die in allen drei Stämmen signifikante Unterschiede zwischen stressbehandelten und unbehandelten Proben festgestellt werden konnten. Im Speziellen heißt das, dass die PB-Anzahl pro PB-positiver Zelle in unbehandelten WT-Zellen mit 1,4 PB signifikant kleiner war als in NaN_3 -behandelten ($p \approx 0,027$) und hitzebehandelten ($p \approx 0,041$) WT-Zellen, in denen sie je etwa 3,2 PB betrug (s. Abb. 4.20A & C). Ähnliche Unterschiede konnten zudem für die Δ POP2-Zellen erkannt werden, deren PB-Anzahl pro PB-positiver Zelle in unbehandelten Proben bei ca. 1,5 PB lag und in azidbehandelten Proben signifikant ($p \approx 0,05$) auf etwa 3,8 PB

erhöht war. Außerdem konnte diesbezüglich in hitzebehandelten Δ POP2-Zellen eine bezogen auf unbehandelte Δ POP2-Zellen höchst signifikante ($p \approx 0,001$) Zunahme der PB-Anzahl pro PB-positiver Zelle auf ca. 3,1 PB festgestellt werden (s. Abb. 4.20A & C).

Schließlich zeigte sich darüber hinaus auch beim Vergleich un behandelter und stressbehandelter Δ CCR4-Proben, dass letztere eine höhere durchschnittliche Zahl an PB pro PB-positiver Zelle aufwiesen. So stieg dieser Wert von ca. 1,5 PB im Fall un behandelter, PB-positiver Δ CCR4-Zellen auf ca. 3,6 PB für NaN_3 -behandelte und auf etwa 3,1 PB für hitzebehandelte, PB- positive Δ CCR4-Zellen an. Dabei unterschied er sich zudem im Fall der NaN_3 -Behandlung hoch signifikant ($p \approx 0,005$) und im Fall der Hitzebehandlung signifikant ($p \approx 0,027$) von dem für un behandelte Zellen ermittelten Wert.

Andererseits konnten weder in un behandelten noch in mit Azid oder Hitze behandelten Proben signifikante Unterschiede hinsichtlich der PB-Bildung zwischen den WT-Stamm und dem Δ POP2 oder Δ CCR4-Stamm anhand o. g. Parameter erkannt werden (s. Abb. 4.20B & C).

Insgesamt hatten diese Experimente somit gezeigt, dass die PB-Entstehung in Hefezellen des WT-Stammes sowie in denen der Deletionsstämme Δ POP2 und Δ CCR4 durch oxidativen oder hyperthermischen Stress gefördert wird. Sie bestätigten und erweiterten damit frühere fluoreszenzmikroskopische Studien in denen bereits eine Verstärkung der Bildung EDC3-positiver PB durch Glucosemangel-Stress sowie NaN_3 -, KCl- oder H_2O_2 -Behandlung in *S. cerevisiae* demonstriert werden konnte.^{99,179,191}

Darüber hinaus konnte jedoch kein signifikanter Einfluss der POP2 oder CCR4-Deletion auf die PB-Entstehung in un behandelten sowie mit Natriumazid oder Hitze behandelten Hefezellen festgestellt werden. Diese Beobachtungen stimmen damit ebenfalls im Großteil mit denen früherer Experimente überein, in welchen die Hefe-PB-Bildung unter Glucosemangel untersucht wurde, und die zeigten, dass auch diese nicht bzw. kaum von der POP2- oder der CCR4-Deletion beeinflusst wird. Lediglich im Fall un behandelter Zelle Δ CCR4-Zellen konnte in der genannten früheren Studie eine leichte Abnahme der PB-Menge bezogen auf un behandelte WT-Zellen festgestellt werden. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass es sich bei diesem beobachteten Einfluss der Δ CCR4-Deletion nur um einen apparenten Effekt gehandelt hatte, da in o. g. Analysen keine Quantifizierung oder statistische Analyse durchgeführt wurde.¹⁷⁹ Insgesamt bleibt somit festzuhalten, dass die Deadenylasekomplex-Proteine und PB-Komponenten POP2 und CCR4 sehr wahrscheinlich keinen bzw. nur minimalen Einfluss auf die PB-Entstehung in *S. cerevisiae* ausüben.

Abgesehen von der PB-Bildung wurde, wie eingangs erwähnt, auch die SG-Bildung un behandelter sowie mit Natriumazid oder Hitze behandelter Zellen des WT-, Δ POP2- und Δ CCR4-Stamms mikroskopisch analysiert und quantifiziert. Dabei aufgenommene beispielhafte Mikroskopiebilder sowie die Ergebnisse deren quantitativer Auswertung sind in Abb. 4.21 dargestellt.

Diese zeigt, dass sich un behandelte und stressbehandelte Proben jedes der drei Hefestämme sowohl bezüglich des Anteils SG-bildender Zellen an der Gesamtmenge fluoreszierender Zellen (s. Abb. 4.21B) als auch bezüglich der mittleren SG-Anzahl pro SG-positiver Zelle (s. Abb. 4.21C) deutlich voneinander unterschieden. So betrug z. B. der Anteil SG-positiver Zellen in un behandelten WT-Proben etwa 4,8 %, während er in NaN_3 -behandelten Proben bei ca. 42,1 % und in hitzebehandelten Proben bei ca. 87,8 % lag (s. Abb. 4.21B). Dabei war sowohl der Unterschied zwischen NaN_3 -behandelten und un behandelten WT-Proben signifikant ($p \approx 0,027$) als auch der zwischen hitzebehandelten und un behandelten ($p \approx 0,035$) sowie der zwischen NaN_3 - und hitzebehandelten WT-Proben ($p \approx 0,023$).

Ferner ergab die quantitative Analyse des Δ POP2-Stamms für dessen unbehandelte Proben einen Anteil SG-positiver Zellen von ca. 9,0 %, wohingegen dieser in azidbehandelten Proben bei ca. 46,7 % und in hitzebehandelten Proben bei etwa 75,0 % lag (s. Abb. 4.21B). Diese Vergrößerung des Anteils SG-bildender Zellen war zudem in NaN_3 -behandelten relativ zu unbehandelten Proben hoch signifikant ($p \approx 0,007$) und in hitzebehandelten relativ zu unbehandelten Proben signifikant ($p \approx 0,023$), wobei in diesem Zusammenhang zudem auch der Unterschied zwischen NaN_3 - und hitzebehandelten Δ POP2-Proben Signifikanz erreichte ($p \approx 0,048$).

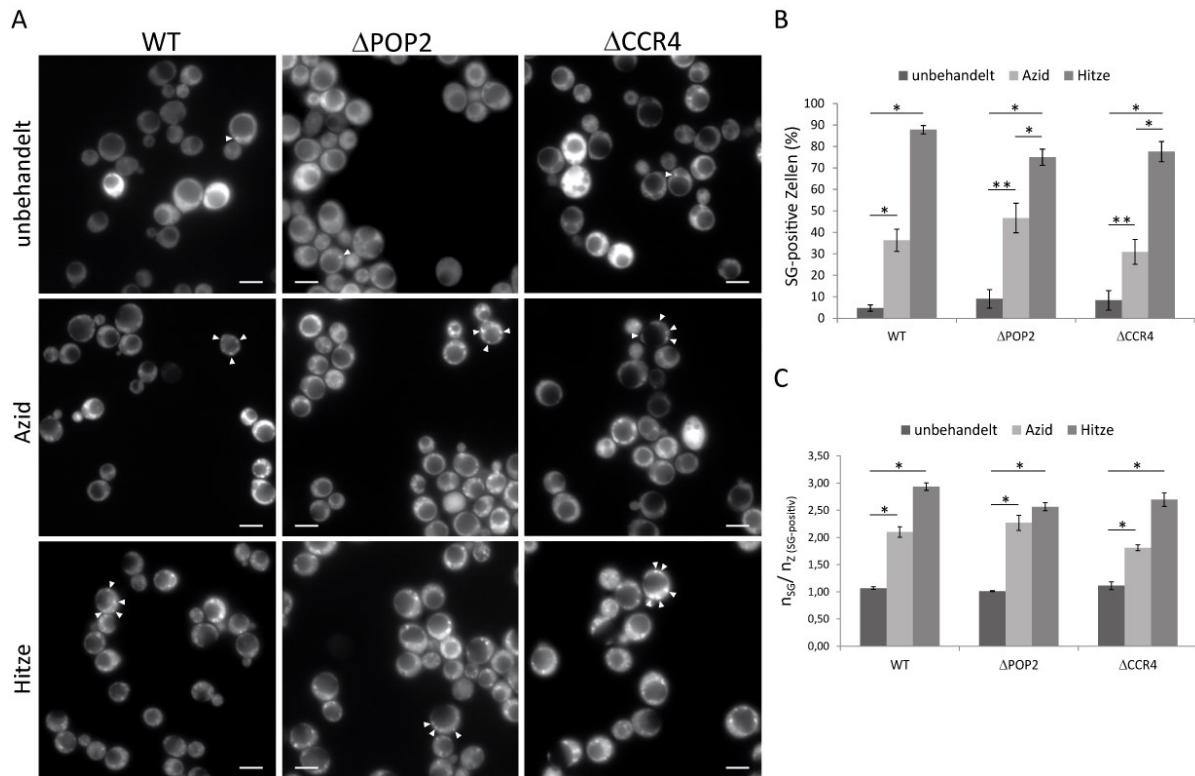


Abb. 4.21 Quantitative mikroskopische Untersuchung zur SG-Bildung in Zellen des WT-Hefestamms sowie der Hefe-Deletionsstämme Δ POP2 und Δ CCR4. (A) Exemplarische Aufnahmen von unbehandelten (oben), NaN_3 -behandelten (Mitte) oder hitzebehandelten (unten) Zellen, die PUB1-mCherry (SG-Marker) konstitutiv exprimierten (Pfeilspitzen: SG, Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 μm) (B) & (C) Zusammengefasste Ergebnisse von Zählungen der SG aus sechs unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte (plus Standardfehler) des berechneten, durchschnittlichen Prozentsatzes SG-bildender Zellen (B) bzw. der durchschnittlichen SG-Anzahl pro SG-bildender Zelle (C). Beide Stressoren erhöhten die SG-Bildung in allen drei Stämmen signifikant, wobei durch Hitze mehr Zellen zur Fokibildung angeregt wurden als durch Azid-Stress. Die Deletionen von POP2 und CCR4 hatten keinen signifikanten Einfluss auf die SG-Bildung.

Ähnliche Beobachtungen konnten ferner auch bei der Analyse der Δ CCR4-Zellen gemacht werden (s. Abb. 4.21B). Auch in diesem Fall zeigte sich nämlich eine relative Erhöhung des Anteils SG-positiver Zellen von ca. 8,4 % für unbehandelte Proben auf etwa 30,9 % für NaN_3 -behandelte und 77,2 % für mit hitzebehandelte Proben. Zudem ergab ein zweiseitiger t-Test diesbezüglich zum einen, dass der Unterschied zwischen NaN_3 -behandelten und unbehandelten Proben hoch signifikant ($p \approx 0,009$) war. Zum anderen zeigte er zusätzlich, dass der festgestellte Anteil SG-positiver Zellen in den hitzebehandelten Proben sich sowohl signifikant von dem unbehandelten Proben ($p \approx 0,05$) als auch von dem NaN_3 -behandelten Proben ($p \approx 0,032$) unterschied.

Andererseits war der Anteil SG-positiver Zellen in den unbehandelten, NaN_3 - oder hitzebehandelten WT-Proben gegenüber dem für die entsprechenden Δ POP2- oder Δ CCR4-Proben ermittelten Wert, nicht signifikant verändert (s. Abb. 4.21B).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte die Auswertung hinsichtlich der durchschnittlichen SG-Anzahl pro SG-positiver Zelle ebenfalls verstärkte SG-Bildung in Proben die Azid- oder Hitzestress ausgesetzt waren im Vergleich zu unbehandelten Proben (s. Abb. 4.21A & C). So konnte für die WT-Proben eine signifikante Erhöhung dieses Wertes von rund 1,7 SG im Fall unbehandelter Zellen auf ca. 2,10 SG für azidbehandelte Zellen ($p \approx 0,018$) und auf ca. 2,94 SG für hitzebehandelten Zellen ($p \approx 0,045$) festgestellt werden. Dasselbe traf ferner auf die Δ POP2-Proben zu, deren nicht gestresste Zellen ca. 1,01 SG pro SG-positiver Zelle aufwiesen, wohingegen dieser Wert in NaN_3 -behandelten Zellen bei durchschnittlich ca. 2,27 SG lag, was einer signifikanten ($p \approx 0,016$) Zunahme an SG entsprach. Gleiches traf zudem auf die hitzebehandelten Δ POP2-Zellen zu, deren durchschnittliche SG-Anzahl pro SG-positiver Zelle sich mit ca. 2,57 SG ebenfalls signifikant ($p \approx 0,043$) von der unbehandelten Zellen unterschied. Ähnliche Ergebnisse lieferte diesbezüglich zudem die quantitative Analyse der Δ CCR4-Proben. Diese zeigte nämlich das auch unbehandelte Δ CCR4 Zellen mit ca. 1,11 SG pro SG-positiver Zelle signifikant weniger SG gebildet hatten als azidbehandelte ($p \approx 0,043$) oder hitzebehandelte ($p \approx 0,048$) Zellen, für die dieser Wert bei ca. 1,81 SG (NaN_3 -Proben) bzw. etwa 2,70 SG (Hitze-Proben) lag. Allerdings konnten hinsichtlich der SG-Anzahl pro SG-positiver Zelle keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten Δ POP2- oder Δ CCR4-Proben und den unbehandelten WT-Proben festgestellt werden, was ebenso für die entsprechenden azid- oder hitzebehandelten Proben galt.

Zusammengefasst zeigten die Experimente zur SG-Bildung in Hefezellen also, dass diese wie bereits zuvor demonstriert durch Einwirkung von Hitze oder NaN_3 angeregt wird.^{191,214} Zusätzlich konnte dabei festgestellt werden, dass weder die Deletion von POP2 noch die von CCR4 einen signifikanten Einfluss auf die SG-Bildung in unbehandelten, azid- oder hitzebehandelten Zellen hatte.

Insgesamt blieb damit sowohl die PB- als auch die SG-Bildung in *S. cerevisiae* von der POP2- oder CCR4-Deletion unbeeinflusst, was dafür spricht, dass die Deadenylasekomplex-Proteine nicht essentiell für die HefemRNP-Granulabildung sind. Außerdem ließ dies vermuten, dass der zuvor beobachtete, durch POP2- oder CCR4-Deletion verursachte wachstumshemmende Einfluss auf jene Hefezellen, die Ataxin-2 oder dessen C-Terminus exprimierten, (s. Abs. 4.3.2.) nicht auf einer Störung der PB- oder SG-Bildung beruht hatte. Die Ergebnisse sind somit konform mit o. g. Hypothese, nach der die wachstumshemmenden Effekte der Deletionen zumindest im Fall C-Terminus exprimierender Zellen v. a. über eine spezifische Verstärkung der Bildung mutmaßlich zytotoxischer C-Terminus-Foki vermittelt worden sein könnten (s. Abs. 4.3.3.). Diesbezüglich ist jedoch noch unklar, ob die C-Terminus-Foki tatsächlich zytotoxisch wirksam sind. Allerdings konnte im Gegensatz dazu im erwähnten TDP-43-Proteinopathie-Hefemodell (s. Abs. 4.1.5.) bereits eine toxische Wirkung von TDP-43-Aggregaten auf die Hefezellen demonstriert werden.²⁶⁵ Ferner hatte o. g. Deletionsbank-Screen zudem gezeigt, dass die Toxizität von TDP-43 in diesem Modellsystem ähnlich der des Ataxin-2-C-Terminus durch Deletion von POP2 oder CCR4 erhöht worden war (s. Abs. 4.3.1. & 4.3.2.). Somit lag die Vermutung nah, dass diese deletionsabhängige Verstärkung der TDP-43-Toxizität von einer ebenso deletionsabhängigen Förderung der TDP-43-Aggregation vermittelt worden sein könnte, ähnlich wie für den Ataxin-2-C-Terminus postuliert (s. o.). Dies sollte in den folgenden, qualitativen fluoreszenzmikroskopischen Analysen untersucht werden.

4.3.5. Mikroskopiestudien zur TDP-43-GFP-Aggregatbildung in Δ POP2 und Δ CCR4

Wie bereits erwähnt verstärkte die POP2 und die CCR4-Deletion in Hefezellen nicht nur die wachstumshemmenden Effekte von Ataxin-2 und seinem C-terminalen Spaltprodukt sondern auch die von TDP-43 (s. Abs. 4.3.1. & 4.3.2.). Außerdem zeigten o. g. mikroskopische Untersuchungen, dass die Deletionen von POP2 und CCR4 die Fokibildung des Ataxin-2-C-Terminus begünstigen (s. Abs. 4.3.3.), was wiederum der Grund für deren fördernden Einfluss auf zytotoxische Wirkungen dieses Ataxin-2-Abschnitts in Hefezellen gewesen sein könnte. Daraus ergab sich die Frage, ob auch die Akkumulationsbildung von TDP-43, die nachgewiesenermaßen dessen Toxizität in Hefe vermittelt, durch POP2- oder CCR4-Deletion ebenfalls verstärkt wird.²⁶⁵ Um dies zu klären wurden entsprechende fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Akkumulationsbildung von TDP-43-GFP durchgeführt.

Dafür wurden Zellen des WT-Hefestamms sowie der Deletionsstämme Δ POP2 und Δ CCR4 mit dem in Abs. 4.1.5. vorgestellten, für TDP-43-GFP kodierenden und galaktose-induzierbaren Plasmid wie o. g. transformiert (s. Abs. 4.1.1.). Selektierte Einzelklone dieser Transformationen wurden dann entsprechend der bereits beschriebenen Vorgehensweise in Suspensionskulturen herangezogen und daraufhin mikroskopiert (s. Abs. 4.1.2.). Dabei erstellte Mikroskopieaufnahmen, die Zellen mit für den jeweiligen Stamm repräsentativer TDP-43-Aggregation zeigen, sind in Abb. 4.22. zu sehen.

Darin kann man erkennen, dass die im WT beobachteten TDP43-GFP-Akkumulationen im Vergleich zu denen der Deletionsstämme relativ klein waren. Außerdem hatten sie eine meist zirkuläre oder zumindest isometrische Morphologie. Demgegenüber waren die in Δ POP2- oder Δ CCR4-Zellen gebildeten TDP43-GFP-Aggregate oft relativ groß, und sie zeigten darüber hinaus auch häufiger amorphe Gestalt als die in WT-Zellen beobachteten Aggregate.

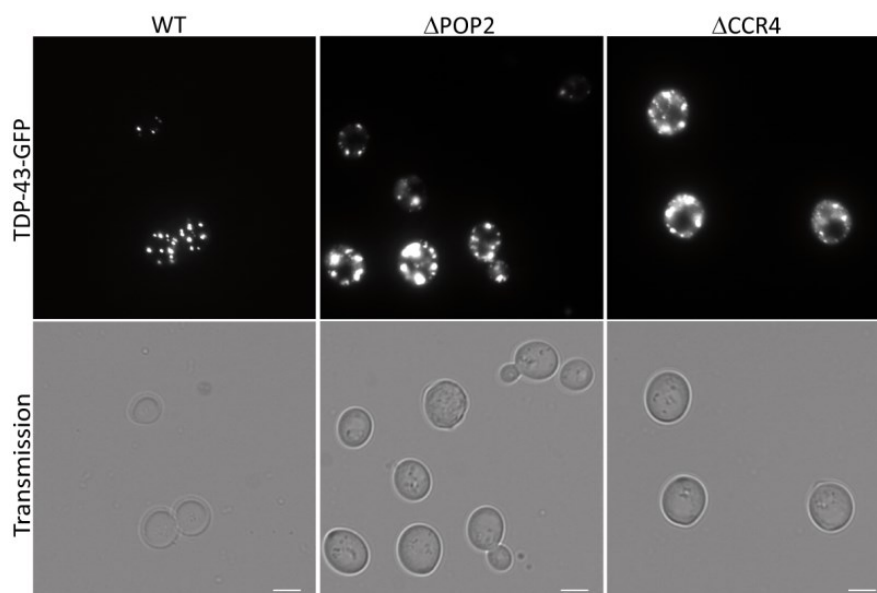


Abb. 4.22 Mikroskopische Analyse der TDP-43-Aggregatbildung in Zellen des WT-Hefestamms sowie der beiden Deletionsstämme Δ POP2 und Δ CCR4. Repräsentative Aufnahmen von Zellen die TDP-43-GFP galaktose-induziert exprimierten. Beide o. g. Deletionen führten zu deutlich gesteigerter TDP-43-GFP-Aggregation. (Vergrößerung: 630-fach, Maßstabsbalken: 5 μ m).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die Bildung toxischer TDP-43-GFP-Aggregate in den Deletionsstämmen Δ POP2 und Δ CCR4 relativ zum WT-Stamm effizienter ablief.

Das bedeutet somit insgesamt, dass die Deletionen von POP2 und CCR4 in nicht stressbehandelten Zellen sowohl die Aggregatbildung von TDP-43 als auch die des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts (s. Abs. 4.3.3.) auf dieselbe Weise reguliert hatten. Hinzu kommt, dass die Expression von TDP-43 sowie die des Ataxin-2-

Spaltprodukts ähnlich starke zytotoxische Effekte in Hefewachstumsanalysen auslösten, und diese zudem in beiden Fällen durch POP2- und CCR4-Deletion verstärkt wurden (s. Abs. 4.3.1 & 4.3.2.).

Zusammengefasst bekräftigen diese Ergebnisse damit die Annahme, dass die zytotoxischen Effekte der Expression des C-terminalen Ataxin-2-Abschnitts von dessen Akkumulationen ausgehen. Zudem lassen o.g. Ähnlichkeiten zwischen überexprimiertem TDP-43 und Ataxin-2-Spaltprodukt vermuten, dass beide ähnliche zytotoxische Eigenschaften haben könnten. Dementsprechend könnte die Akkumulationsbildung und möglicherweise auch die Zytotoxizität des C-terminalen Ataxin-2-Bereichs, ähnlich wie für TDP-43 vermutet, auf einem prionartigen Mechanismus beruhen (s. Abs. 5.1.2.).¹⁸¹

Ferner konnte aus dem beobachteten POP2- und CCR4-vermittelten, mildernden Einfluss auf die TDP-43-Aggregatbildung im WT-Hefestamm geschlossen werden, dass diese beiden Hefepoteine möglicherweise eine Protein-Qualitätskontrollfunktion besitzen könnten, wodurch sie die Entstehung fehlgefalteter TDP-43-Moleküle und so auch deren Aggregation unterdrückt haben könnten.

Insgesamt hatten sich somit mehrere, spezifische Effekte der Deletionen von POP2 und CCR4 auf Ataxin-2 und TDP-43 im Hefemodell gezeigt. Deshalb wurden im Anschluss daran siRNA-Knockdown-Analysen in HeLa-Zellen durchgeführt, die der Untersuchung von Einflüssen des Gen-Silencings der humanen POP2- und CCR4-Orthologe in humanen Zellen dienen sollten. So sollte überprüft werden ob die Herabregulation der Orthologexpression ähnlich den Deletionen von POP2 und CCR4 Einflüsse auf Ataxin-2 oder TDP-43 hat, wobei sich diese Analyse hier auf deren mRNA-Level beschränkte.

4.3.6. Untersuchungen zu Effekten des siRNA-Knockdown humaner POP2- und CCR4-Orthologe in HeLa-Zellen

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die Deletionen von POP2 und CCR4 die zytotoxischen Wirkungen sowie die Fokibildung von TDP-43 und Ataxin-2 bzw. Ataxin-2-Spaltprodukten im Hefemodellsystem beeinflussen (s. Abs. 4.3.1. – 4.3.5). Deshalb sollte in Analogie dazu in HeLa-Zellen untersucht werden, ob der siRNA-Knockdown (Kd) der humanen POP2-Orthologe CNOT7 und CNOT8 bzw. der humanen CCR4-Orthologe CNOT6 und CNOT6L im Säugersystem ebenfalls Effekte auf die beiden o. g. Krankheitsproteine hat. Dabei wurde sich in diesen initialen Säugerzell-Experimenten auf die Analyse potentieller Kd-Effekte auf die Ataxin-2- bzw. TDP-43-Transkriptmengen konzentriert, da sich o. g. CNOT-Proteine bereits in früheren Studien als transkriptionelle Regulatoren herausgestellt hatten.^{291,292}

Für diese Untersuchungen musste jedoch zunächst in Vorversuchen die Kd-Effizienz validiert werden, was via Immunoblot und IF-Mikroskopie erfolgte und im Folgenden beschrieben wird.

4.3.6.1. Validierung der siRNA-Kd-Effizienz für CNOT6-, CNOT6L-, CNOT7- und CNOT8-siRNA

Zur Bewertung der Wirksamkeit der für die Kd-Untersuchungen verwendeten siRNA-Pools gegen CNOT6, CNOT6L, CNOT7 und CNOT8 wurden als erstes Immunoblotanalysen mit HeLa-Zellysaten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die HeLa-Zellen zunächst mit den einzelnen siRNA-Pools unter Nutzung des „Lipofectamine RNAiMAX“-Reagenz transfiziert. Außerdem wurde für jedes Experiment als Negativkontrolle ein Ansatz mit einem Pool nicht zielgerichteter NT-siRNA (von engl. *non-targeting*) sowie ein weiterer mit RNase-freiem H₂O anstelle der siRNA (mock-Kontrolle) transfiziert bzw. behandelt. Die Zellen wurden daraufhin für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert (s. Abs. 4.2.1.). Im Anschluss daran wurden sie einmal

mit PBS gewaschen und mit HeLa-Lysepuffer für eine halbe Stunde bei 4°C lysiert. Dem folgte ein Zentrifugationsschritt um die Lysate von Zellüberresten zu befreien. Daraufhin wurde die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt und diese zusammen mit Lämmli-Puffer auf ein Polyacrylamidgel geladen, wobei darauf geachtet worden war, dass jede Geltasche mit äquivalenten Proteinmengen beladen wurde. Anschließend wurden die Proteine sowie ein Molekulargewichtsstandard mittel SDS-PAGE aufgetrennt und diese danach auf eine PVDF-Membran geblottet. Dem folgte eine Inkubation der Membran in Blockierpuffer, woraufhin sie mit primären Antikörpern gegen o. g. CNOT-Proteine für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt wurde. Zusätzlich wurde ein Teil der Membran im Zuge dessen außerdem mit einem Antikörper gegen das Haushaltsprotein GAPDH inkubiert, dessen Proteinsignal als Kontrolle für gleichmäßige Gelbeladung detektiert werden sollte. Daraufhin wurde die Membran mit sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpern behandelt, so dass die Proteine via ECL (enhanced chemiluminescence)-Kit detektiert und deren Chemilumineszenzsignale schließlich auf Röntgenfilm abgebildet werden konnten.

Dabei stellte sich allerdings heraus, dass die Behandlung der HeLa-Zellen mit CNOT6- oder CNOT6L-siRNA die Proteinlevel dieser beiden Paraloge im Vergleich zu den Kontrollproben nicht herabreguliert hatte (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte im Fall der mit CNOT7- oder CNOT8-siRNA behandelten Proben eine starke Abnahme der entsprechenden Proteinlevel im Immunoblot bezogen auf die Kontrollproben beobachtet werden (s. Abb. 4.23D). Das GAPDH-Signal blieb dabei zudem in allen Ansätzen konstant, was die gleichmäßige Gel-Beladung bestätigte. Somit konnte also der CNOT7- sowie der CNOT8-siRNA-Kd via Immunoblot validiert werden.

Um darüber hinaus die Effizienz der siRNA-vermittelten Herabregulation der CNOT6-, CNOT6L-, CNOT7- und CNOT8-Proteinexpression zusätzlich in unabhängigen Experimenten zu verifizieren, wurden außerdem IF-Mikroskopieanalysen durchgeführt. Hintergrund dafür waren Untersuchungen in humanen MCF7-Zellen die gezeigt hatten, dass der Kd der CNOT-Expression dort zu signifikanter Hemmung der PB-Bildung führt.²⁹¹ Dementsprechend sollte dieser Effekt hier zum indirekten Nachweis der Wirksamkeit o. g. CNOT-siRNA-Pools in den HeLa-Zellen dienen.

Aus diesem Grund wurden die Zellen wie beschrieben (s. o.) mit den CNOT-spezifischen siRNAs transfiziert und 72 h inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen kurz mit PBS gespült und anschließend ähnlich o. g. Vorgehensweise (s. Abs. 4.2.1.) für die IF-Analysen vorbereitet. In diesem Fall wurden die Proben jedoch lediglich mit je einem Paar aus Primärantikörper und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper behandelt, wobei die hierfür genutzten primären Antikörper entweder gegen DCP1 oder gegen DDX6 als PB-Markerprotein gerichtet waren.

Auch in diesen Experimenten konnte allerdings im Fall der CNOT6 und CNOT6L-Behandlung keine dadurch verursachte Reduktion der PB-Menge festgestellt werden (nicht gezeigt). Andererseits konnte hinsichtlich der CNOT7- und CNOT8-siRNA-Kd-Proben festgestellt werden, dass deren Anteile DCP1- bzw. DDX6-PB-positiver Zellen im Vergleich zu jenen der NT-siRNA-Kontrollen um ca. die Hälfte abgenommen hatte, wie in Abb. 4.23 A & B zu sehen ist. Die IF-Analysen hatten somit die Ergebnisse der Immunoblots bestätigt und gezeigt, dass der Kd von CNOT7 und CNOT8 in HeLa-Zellen effektiv war, was jedoch nicht auf den CNOT6- und den CNOT6L-Kd zutraf. Es bestand allerdings die Möglichkeit, dass insbesondere im Fall von CNOT6 und CNOT6L durch redundante Funktionen der Paraloge deren hemmender Einfluss auf die PB-Bildung in den Einzel-Kd-Ansätzen nicht erkennbar gewesen sein könnte. Dies könnte zudem auch auf die Einzel-Kd-Ansätze von CNOT7 und CNOT8 zutreffen haben, in denen ein die PB-Bildung störender Effekt des Kd eines

Paralogs durch die Funktion des anderen abgemildert worden sein könnte. Deshalb sollte im Folgenden auch untersucht werden, wie sich die entsprechenden Doppel-Kd beider Paraloge der zwei Paralogpaare auf die PB-Bildung der HeLa-Zellen auswirken.

Dazu wurden die Zellen zunächst simultan mit siRNA-Pools gegen CNOT6 und CNOT6L einerseits sowie CNOT7 und CNOT8 andererseits transfiziert. Außerdem wurden wie im Fall der Einzel-Kd-Untersuchungen auch hier einige Zellen zu Kontrollzwecken mit NT-siRNA transfiziert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten daraufhin ebenso wie zuvor für die Einzel-Kd-Proben beschrieben (s. o.), wobei wieder DCP1 und DDX6 zum Zweck der PB-Markierung mittels Immunfluoreszenztechnik angefärbt wurden.

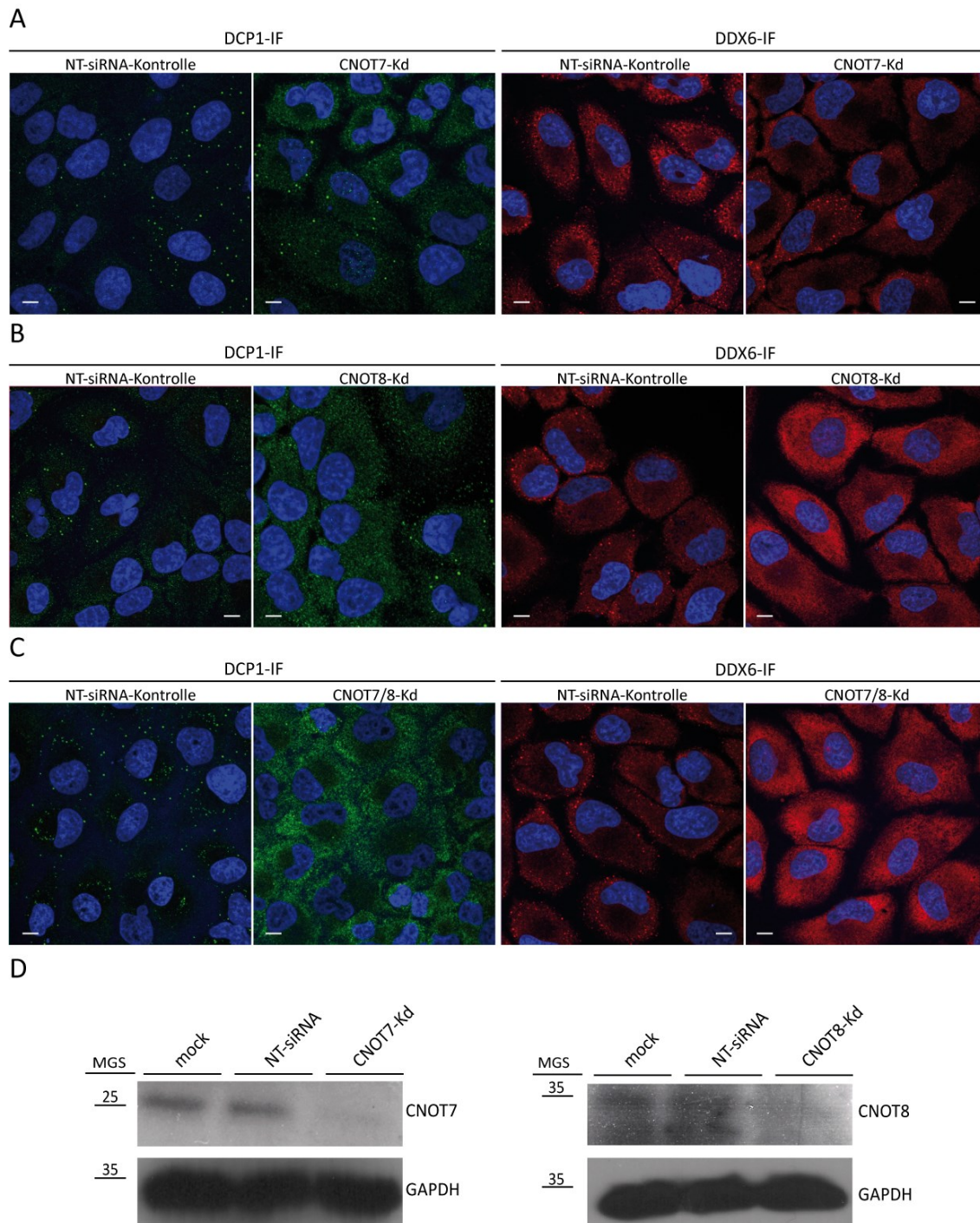


Abb. 4.23 Validierung des siRNA-Knockdown von CNOT7 und CNOT8 in HeLa-Zellen. (A) - (C) IF-Mikroskopieaufnahmen von Zellen die 72 h mit einem siRNA-Pool gegen CNOT7-mRNA (A), CNOT8-mRNA (B) oder mit zwei siRNA-Pools gegen je eines der beiden Transkripte (C) behandelt wurden bzw. von den entsprechenden mit NT-siRNA behandelten Kontrollzellen ((A) - (C) jeweils 1. & 3. Bild). Zudem wurden die Zellen Immunfärbungen zur PB-Visualisierung unterzogen. Dazu wurde entweder ein primärer, gegen DCPI gerichteter Antikörper (m- α -DCPI) mit dem sekundären AlexaFluor488® gt- α -m-IgG (linke Hälfte in (A) - (C)) oder ein primärer DDX6-Antikörper (rb- α -DDX6) mit dem Alexa Fluor594® gt- α -rb-IgG (rechte Hälfte in (A) - (C)) verwendet. Die Ausschnitte zeigen repräsentative PB-Bildung der HeLa-Zellen. Jeder der Einzel-Kd reduzierte die PB-Bildung moderat. Der Doppel-Kd führte zu nahezu vollständig inhibierter Bildung sowohl DCPI- als auch DDX6-positiver PB. (Vergrößerung: 430-fach, Maßstabsbalken: 10 μ m) (D) Immunoblot zum Nachweis der Einzel-siRNA-Kd von CNOT7 (links) und CNOT8 (rechts) auf Proteinebene. Die Zellen wurden wie o. g. mit siRNA behandelt und daraufhin lysiert. Die Lysate wurden anschließend auf ein SDS-PAGE-Gel geladen, wobei darauf geachtet wurde, dass die eingesetzten Proben äquivalente Proteinmengen enthielten. Nach Proteintrennung und Blotten wurden die Proteine mit primären Antikörpern gegen CNOT7 (rb- α -CNOT7) oder CNOT8 (rb- α -CNOT8) behandelt oder zur Kontrolle der gleichmäßigen Gelbelastung mit einem primären GAPDH-Antikörper (m- α -GAPDH). Schließlich wurden die Blots mit entsprechenden sekundären, HRP-gekoppelten Antikörpern (gt- α -m-IgG-HRP oder gt- α -rb-IgG-HRP) inkubiert und die Proteine daraufhin via ECL-Detektionskit auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Zu sehen ist die Abnahme der Proteinmengen von CNOT7 & CNOT8 in den Kd-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben (mock & NT-siRNA). (mock: ohne siRNA aber mit Transfektionsreagenz).

Die mikroskopische Analyse der PB-Bildung der mit CNOT6 und CNOT6L-siRNA behandelten Proben zeigte allerdings, dass deren Anteil PB-bildender Zellen im Vergleich zu jenem der NT-siRNA-Kontrollproben nicht erkennbar verändert war. Demgegenüber ergab der Vergleich des Anteils PB-positiver Zellen in den NT-siRNA-Kontrollproben mit dem CNOT7- und CNOT8-siRNA-behandelter Proben, dass dieser in letzteren erheblich reduziert war und gegen Null tendierte (s. Abb. 4.23C). Dieser hemmende Effekt auf die PB-Bildung war damit zugleich stärker als jener der für die Einzel-Kd-Proben von CNOT7 oder CNOT8 beobachtet worden war (s. Abb. 4.23A & B), die Anteile an PB-positiven Zellen zwischen 15 % und 30 % aufwiesen. Diese Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass CNOT7 und CNOT8 tatsächlich eine redundante Funktion bezüglich der PB-Bildung in humanen Zellen besitzen.

Insgesamt konnte somit für CNOT6 und CNOT6L kein erfolgreicher Kd nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte für CNOT7 und CNOT8 eine siRNA-vermittelte, effiziente Herabregulierung ihrer Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte in Immunfluoreszenzanalysen ein zuvor postulierter CNOT7- und CNOT8-Kd-spezifischer negativer Einfluss auf die PB-Bildung reproduziert werden, was zusätzlich für die siRNA-Wirksamkeit spricht. Dabei bestätigte sich zudem die schon zuvor gemachte Beobachtung, dass der CNOT7/ CNOT8-Doppel-Kd die PB-Bildung effizienter unterdrückt als jeder der einzelnen Kd, was gleichzeitig für redundante Funktionen dieser beiden Paraloge spricht.²⁹¹

Deshalb wurde, um entsprechende Redundanzeffekte zu vermeiden, in den folgenden, quantitativen RT-PCR (qRT-PCR)-Experimenten ausschließlich der Einfluss des CNOT7/ CNOT8-Doppel-Kd auf die mRNA-Level von Ataxin-2 sowie TDP-43 untersucht.

4.3.6.2. Untersuchungen zu Auswirkungen des CNOT7/ CNOT8-siRNA-Doppel-Knockdown auf die zellulären Transkriptmengen von Ataxin-2 oder TDP-43

Für die qRT-PCR-Analysen wurden die HeLa-Zellen wie in o. g. Experimenten mit CNOT7- und CNOT8-siRNA- oder NT-siRNA-Pools transfiziert und damit für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Daraufhin wurde die mRNA der Zellen mittels eines kommerziellen Kits (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert und im Anschluss daran via reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die dabei erhaltenen cDNA-Proben wurden danach mit dem „SYBR-Green-qRT-PCR-Master-Mix“ (Thermo-Fisher) gemischt, der zur fluoreszenzvermittelten Detektion der cDNA-Moleküle eingesetzt wurde. Ferner wurden den Proben zur Amplifikation der interessierenden cDNA-Moleküle Paare analytischer Primer zugefügt. Mit diesen sollten zum

einen die Mengen an CNOT7- und CNOT8-cDNA bestimmt werden um die Kd-Effizienz direkt auf Transkriptebene zu überprüfen. Zum anderen wurden mit Hilfe weiterer Primerpaare die cDNA-Gehalte der Haushaltsgene B2M und GAPDH in den Proben gemessen. Dabei dienten die GAPDH-Werte als Referenz für die Auswertung der Rohdaten mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, bei der die Messdaten auf einen interne Kontrolle (hier: GAPDH-cDNA) bezogen werden.^{293,294} Die Messung der B2M-cDNA-Mengen andererseits hatte den Zweck Veränderungen der globalen Genexpression zu erkennbar zu machen. Daneben wurden zudem zwei weitere Primerpaare gegen Ataxin-2 bzw. TDP-43-cDNA eingesetzt, um den Effekt des CNOT7/ CNOT8-Doppel-Kd auf die Transkriptlevel der beiden Krankheitsproteine zu untersuchen. Schließlich wurden die in Triplikaten angesetzten Proben automatisiert gemessen, wobei insgesamt fünf qRT-PCR-Experimente durchgeführt wurden.

Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend wie erwähnt durch Berechnung von $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werten, die die relative Mengenänderung der jeweils interessierenden cDNA bzw. mRNA bezogen auf die cDNA des Haushaltsgens GAPDH widerspiegeln. Die so errechneten Werte für die einzelnen Kd-Proben wurden außerdem jeweils in Relation zu denen der NT-siRNA-Kontrollproben gesetzt, die in diesem Fall als unbehandelte Referenzproben betrachtet wurden. Abschließend wurden zudem die arithmetischen Mittel dieser relativen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte aus allen fünf Experimenten berechnet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse dieser Berechnungen ist in Abb. 4.24 zu sehen ist.

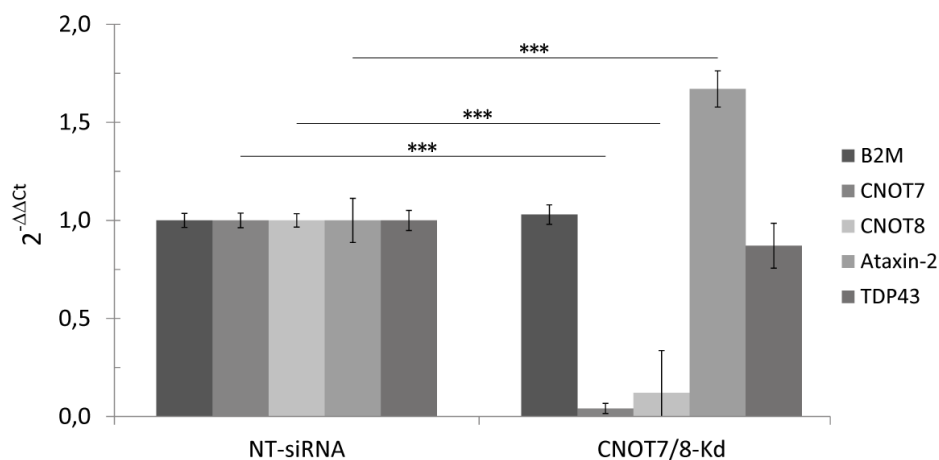


Abb. 4.24 Ergebnisse aus qRT-PCR-Analysen von HeLa-Zell-cDNA zu Effekten des siRNA-Doppel-Kd von CNOT7 und CNOT8 auf die mRNA-Transkriptmengen von Ataxin-2 und TDP-43. Dargestellt sind durchschnittliche $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte (plus Standardfehler) basierend auf fünf unabhängigen Experimenten. Die Werte entsprechen dabei den Mengen der interessierenden mRNA-Transkripte bezogen auf die GAPDH-Transkripte, die als interne Kontrolle dienten. Zudem sind die Werte in Relation zu den NT-siRNA-Kontrollproben gesetzt worden, die als Referenz für basale Bedingungen dienten. Die Kd-Dauer betrug 72 h. Erkennbar sind signifikante Reduktion der CNOT7- und CNOT8-Transkriptmengen sowie eine signifikante Zunahme der relativen Ataxin-2-Transkriptmenge in den Kd-Proben.

Dort lässt sich zunächst erkennen, dass alle relativen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte im Fall der NT-siRNA-Proben bei 1 bzw. 100 % lagen, da diese als Referenzproben definiert worden waren und ihre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte im Zuge der Auswertung auf sich selbst bezogen wurden (s. o.).

Hinsichtlich des relativen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werts des B2M-Transkripts konnte außerdem kein signifikanter Unterschied in den Kd-Proben bezogen auf die NT-siRNA-Kontrollen festgestellt werden. Dies sprach dafür, dass der CNOT7/ CNOT8-Doppel-Kd die globalen Transkriptlevel nicht wesentlich beeinflusst, und somit potentiell beobachtete Kd-Effekte auf die Transkriptmengen der interessierenden Proteine als spezifisch angesehen werden konnten.

Ferner zeigte sich, dass die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte für die CNOT-Transkripte in den Doppel-Kd-Ansätzen deutlich kleiner waren als die der CNOT-Transkripte in NT-siRNA-Kontrolle.

Dabei war dieser Wert und somit die relative Transkriptmenge im Fall von CNOT7 durch die siRNA-Behandlung höchst signifikant ($p \approx 0,5 \times 10^{-7}$) auf 4 % des für die NT-siRNA-Kontrollen berechneten Wertes reduziert worden.

Ähnliches galt zudem für die CNOT8-Transkriptmenge, die in den Kd-Ansätzen auf durchschnittlich ca. 17 % des für die Kontrollproben ermittelten Wertes reduziert war, was ebenfalls einer höchst signifikanten ($p \approx 0,8 \times 10^{-5}$) Veränderung entsprach. Diese Ergebnisse bestätigten den in o. g. Experimenten bereits auf Proteinebene bzw. funktionell nachgewiesenen siRNA-Kd der CNOT-Proteine (s. v. Abs.) somit nun auch auf mRNA-Transkriptebene.

Die Auswertung der qRT-Analysen bezüglich der Ataxin-2-Transkriptmengen zeigte darüber hinaus, dass deren für die Kd-Proben ermittelter $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert höchst signifikant ($p \approx 0,006$) gegenüber dem der NT-siRNA-Kontrollen gesteigert war. Dabei war der relative Ataxin-2-Transkriptgehalt in den Kd-Proben auf 167 % des Referenzwertes erhöht. Man kann somit zusammengenommen davon ausgehen, dass der CNOT7/ CNOT8-Doppel-Kd zur Erhöhung der Ataxin-2-Transkriptlevel geführt hat, was bedeutet, dass beide Proteine in unbehandelten HeLa-Zellen wahrscheinlich als Repressoren der Ataxin-2-Proteintranslation agieren. Demgegenüber konnte allerdings für TDP-43 keine signifikante Doppel-Kd-abhängige Veränderung seiner relativen Transkriptlevel festgestellt werden.

Insgesamt lässt sich also festhalten, dass der CNOT7/ CNOT8-Doppel-Kd in HeLa-Zellen zu einem Anstieg der Ataxin-2-mRNA-Menge führte. Somit war, neben dem o. g. Einfluss der POP2-Deletion auf Effekte der Ataxin-2-Expression in Hefezellen (s. Abs. 4.3.2. & 4.3.3.), hier zudem ein regulatorischer Effekt der POP2-Orthologe auf die Ataxin-2-mRNA in einer humanen Zelllinie gezeigt worden. Das bedeutet also, dass die Screens auf spezifische Ataxin-2-regulierende Gene in Hefe-Deletionsstämmen (s. Abs. 4.3.1.) letztendlich auch zur erfolgreichen Identifikation zweier Ataxin-2-Regulatoren im Säugerzellsystem geführt haben, nämlich den Paralogen CNOT7 und CNOT8, was das Hauptziel dieser Untersuchungen war.

Diesbezüglich liegt ferner die Vermutung nah, dass beide bzw. eines dieser Paraloge direkt am Abbau von Ataxin-2-Transkripten beteiligt gewesen sein könnten. Das ergibt sich daraus, dass sie ebenso wie ihr Hefe-Ortholog POP2 katalytisch aktive Bestandteile eukaryontischer CCR4/NOT-Deadenylase-Komplexe sind, die als geschwindigkeitsbestimmende Enzyme beim zytoplasmatischen mRNA-Abbau wirken. Demnach könnte der simultane CNOT7- und CNOT8-Funktionsverlust in o. g. Kd-Experimenten direkt zu einer verringerten Deadenylierung von Ataxin-2-mRNA-Transkripten geführt und so deren Abbau gestört haben, was eine plausible Erklärung für die beobachtete Kd-abhängige Erhöhung der zellulären Ataxin-2-Transkriptmengen gewesen sein könnte.

Bezüglich des CCR4/NOT-Komplexes ist zudem bekannt, dass er über seine CNOT1-Untereinheit an DDX6 binden kann, das seinerseits bereits als direkter Interaktionspartner von Ataxin-2 identifiziert wurde. Dies könnte somit auf eine DDX6-abhängige Interaktion und demzufolge auch eine gemeinsame Funktion von Ataxin-2 und dem CCR4/NOT-Komplex hinweisen. Unabhängig davon stehen Ataxin-2 und Bestandteile des CCR4/NOT-Komplexes zudem über den dynamischen Komponentenaustausch zwischen SG und PB in Verbindung.^{65,198,295}

Insgesamt konnte daher vermutet werden, dass möglicherweise die Ataxin-2-Funktion ähnlich wie die der Deadenylierungskomplexe mit der Regulation des zellulären Transkriptom via mRNA-Abbau zusammenhängt. Allerdings ergaben kürzlich veröffentlichte Ergebnisse aus Mikroarray-Transkriptomanalysen verschiedener

Gewebe eines Ataxin-2-KO-Mausmodells, dass der Gen-Knockout dort eher geringe Effekte auf das Maus-Transkriptom hatte. Andererseits konnte dabei jedoch auch gezeigt werden, dass insbesondere translations- und sekretionsrelevante mRNA-Transkripte, z. B. für ribosomale Untereinheiten, Translations-Initiationsfaktoren oder rER-Translokasefaktoren, durch Ataxin-2-KO reguliert worden waren.⁷² Dies sprach somit eher für eine wichtige regulatorische Funktion von Ataxin-2 bei der zellulären Proteinbiosynthese als beim mRNA-Abbau, was zudem dadurch unterstützt wurde, dass für Ataxin-2 bereits subzelluläre Kolokalisation und Kofraktionierung mit Komponenten des rER festgestellt werden konnte. Ferner wurde zudem Kolokalisation von Ataxin-2 mit Ribosomen beobachtet, und schließlich konnte auch dessen Interaktion mit dem PABP1-Protein nachgewiesen werden, das selber ein positiver Regulator der Proteintranslation ist.^{61,60,67,66,68,69}

Es war daher wahrscheinlich, dass Ataxin-2 über seine mutmaßliche regulatorische Funktion bei der Translationskontrolle auch Einfluss auf die zelluläre Proteomzusammensetzung haben könnte. Um dies zu untersuchen, wurden deshalb proteomische Analysen im *S. cerevisiae*-Modell zu Auswirkungen der Deletion des Ataxin-2-Hefe-Orthologs PBP1 auf das Hefeproteom unternommen, von denen der nächste Abschnitt handelt.

4.4. Vergleichende Proteomanalysen in *S. cerevisiae*

Wie am Ende des letzten Abschnitts beschrieben, ließen o. g. Experimente zur Identifikation von Ataxin-2-Regulatoren sowie frühere Studien vermuten, dass Ataxin-2 selbst eine regulatorische Funktion bei der zellulären Proteintranslation ausüben könnte.

Deshalb sollte im *S. cerevisiae*-Modell untersucht werden, wie bzw. ob sich die Zusammensetzung des Hefeproteoms durch Deletion des Ataxin-2-Hefe-Orthologs PBP1 ändert, was mit Hilfe HPLC-gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie überprüft werden sollte. Die Daten dieser Analysen wurden dabei zum einen universell ausgewertet, wobei Proteinnetzwerke erstellt und Proteinanreicherungsanalysen unternommen wurden. Zum anderen wurden sie jedoch zudem spezifisch hinsichtlich deletionsabhängig regulierter SG- und PB-Komponenten überprüft, um mehr über die Funktion von PBP1 als SG-Komponente zu erfahren.

4.4.1. Untersuchung von Einflüssen der PBP1-Deletion auf das Hefeproteom

Grundlegend wurde zur Identifizierung potentieller Effekte der PBP1-Deletion auf das Hefeproteom einerseits die Proteomzusammensetzung des WT-Hefestamms sowie andererseits die zweier PBP1-Deletionsmutanten bestimmt und miteinander verglichen. Dabei waren der WT-Stamm und einer der beiden Deletionsstämme (Δ PBP1-DB) der o. g. Hefe-Deletionsbank entnommen (s. Abs. 4.3.1.). Der zweite Deletionsstamm (Δ PBP1-sm) hingegen war mittels Cre/loxP-basierter homologer Rekombination in der AG Krobitch von Fr. A. Günther generiert worden, und seine Analyse sollte v. a. zur Verifizierung der Resultate aus den Untersuchungen der Deletionsbankstämme dienen.

Für die Proteomanalysen wurden nun zunächst auf Vollmedium gewachsene Einzelklone des WT-Stamms sowie beider Deletionsstämme in Suspension überführt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am Folgetag wurden diese Suspensionskulturen auf einen gemeinsamen Ausgangs OD₆₀₀-Wert von 0,2 eingestellt und bis zum Erreichen logarithmischen Wachstums bei 30°C schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurden die Hefezellen abzentrifugiert und nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem *Aqua bidest.* in MS-Lysepuffer aufgenommen. Die anschließende Zelllyse erfolgte in einem Zellhomogenisator mit Hilfe von Glaskügelchen, die ebenfalls zu den Ansätzen

gegeben worden waren. Die so gewonnenen Proteinlysate wurden daraufhin von den Glaskügelchen getrennt und nach Messung ihrer Proteinkonzentrationen an die interne MS-Service Einrichtung des Max-Planck-Instituts unter Leitung von Dr. Meierhofer übergeben. Dort wurden sie schließlich nach weiteren vorbereitenden Schritten massenspektrometrisch untersucht, wobei insgesamt drei biologische Replikate jedes Lysats analysiert wurden. Zudem wurden die Ergebnisse dieser Analysen ebenfalls in der AG Meierhofer einer labelfreien Quantifizierung (LFQ) unterzogen. Die Resultate dieser Quantifizierung waren schließlich die Grundlage für die im Nachfolgenden beschriebene weitere Auswertung der MS-Daten.

Dabei wurde zunächst für jedes durch die MS-Analyse gefundene und in der Uniprot-Datenbank annotierte Protein, d. h. für jeden Treffer, das Verhältnis seiner Menge in jedem Deletionsstamm zu der seines Pendantes im WT-Stamm gebildet. Die daraus resultierenden Werte dienten dabei als Maß für die durch PBP1-Deletion verursachten Veränderungen in der Zusammensetzung des *S. cerevisiae*-Proteoms (im Folgenden auch als Regulation bezeichnet). Das bedeutet dementsprechend, dass die Regulation umso stärker war je weiter der o. g. Quotient von 1 entfernt lag. Auf dieser Grundlage wurden alle Proteine mit Werten ab 1,5 (d. h. ab 50 % erhöhter Expression gegenüber dem WT) als positiv, und alle Proteine mit Werten unter 0,67 (dem Reziprok von 1,5) als negativ reguliert eingestuft. Die Treffer mit Werten zwischen 0,67 und 1,5 wurden hingegen als unreguliert angesehen und deshalb nicht in die Auswertung mit einbezogen. Zudem ergaben einige Treffer im WT-Stamm LFQ-Werte von Null und konnten deshalb aus mathematischen Gründen nicht für die Auswertung genutzt werden.

Schließlich konnten auf diese Weise für Δ PBP1-DB insgesamt 107 abwärts regulierte und 218 aufwärts regulierte und für Δ PBP1-sm 129 abwärts regulierte und 257 aufwärts regulierte Proteine nachgewiesen werden (s. Anhang 1). Diese wurden ferner mit Hilfe der internetbasierten Anwendung BioVenn auf Gemeinsamkeiten hin untersucht, d. h. es wurden jene Proteine identifiziert, die in beiden Deletionsstämmen gleichartig reguliert gewesen waren (unidirektional regulierte Proteine) (s. Abb. 4.25).

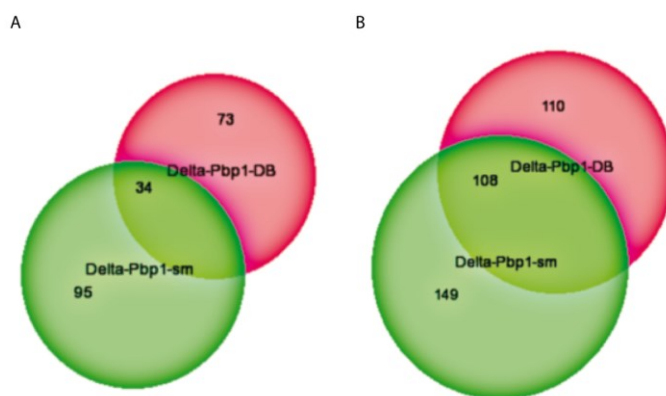


Abb. 4.25 Venn-Diagramme der Mengen von Proteinen die in zwei Δ PBP1-Hefe-Deletionsstämmen unidirektional reguliert worden waren. (A) Abwärts regulierte Proteine. (B) Aufwärts regulierte Proteine. (Rot, Grün: Mengen der durch einen Δ PBP1-Deletionsbankstamm (DB) oder durch einen selbst hergestellten Δ PBP1-Stamm (sm) regulierten Proteine). Proteine galten als reguliert, wenn ihre Menge in den Deletionsstämmen im Vergleich zum WT-Stamm auf unter 67 % gesunken oder über 150 % angestiegen war (Die Verhältnisse wurde dabei aus Mittelwerten labelfreier Quantifizierungen von sechs unabhängigen LC-MS/MS-Analysen berechnet).

Auf diese Weise wurden 34 Proteine identifiziert, die konsistent in beiden Deletionsstämmen infolge der PBP1-Deletion abwärts reguliert waren, sowie 108 Proteine, deren Menge in beiden Deletionsstämmen zunahm. Eine Auflistung dieser Proteine zeigt Tab. 4.1. Damit lieferte diese Studie, verglichen mit anderen Hochdurchsatz-Untersuchungen, die bis zu diesem Zeitpunkt umfangreichste Sammlung genetischer Interaktionspartner von PBP1.^{296–305}

Außerdem lässt sich an diesen Werten erkennen, dass durch PBP1-Deletion etwa dreimal mehr Proteine aufwärts als abwärts reguliert waren. Diese Ergebnisse sprechen folglich dafür, dass PBP1 in WT-Hefezellen hauptsächlich als Repressor der Proteintranslation fungiert und eher weniger als deren Aktivator.

Tabelle 4.1 PBP1-deletionsabhängig regulierte Proteine: Auflistung der in Bezug auf den WT-Stamm in zwei Δ PBP1-Stämmen unidirektional regulierten Proteine (linke Spalte: in beiden Deletionsstämmen abwärts regulierte Proteine, rechte Spalte: in beiden Deletionsstämmen aufwärts regulierte Proteine)

Abwärts regulierte Proteine		Aufwärts regulierte Proteine						
AIM9	PST1	ADE12	CMS1	GPI16*	NOP10	RPA49	TAF9*	YER156C
BLM10	RIM1	AIM29	CNA1*	GPM3	NOP53	RPB8*	TDA10	YET3
CIT1	RNQ1	ALT1	COA4	HBS1	NPA3*	RPC31*	TED1	YFH1
CYT1	RPL39	APS3	CRP1	HEM13	NRP1~	RRS1	TOM5	YLR413W
DDR48	RPP1A	ARP5*	DCP2^	HGH1	OAC1	RRT2	TOP1	YME1
DLD1	RPS30B	ARP7	DIB1	HOC1	PEP8	SDA1	TPM2	YVH1
GLK1	RPS5	BOI1	DNF1*	HPR1*	PFY1	SDC1*	TRS33	
HEF3	SDH1	BRE5^	DYN2*	IMD2	PHO91	SEC14	TY1B-MR1	
HSP104*	SEC7	BUD22	EMG1	IRC25	PLP2	SEC28	TY1B-PR1	
HSP12*	SKN7	CAB4	EMW1	JJ3	PMT4*	SEE1	UBC9	
HSP150	SSA4*	CAD1	ENA1	LEU1*	POF1	SFT2	YCR076C	
HSP26~*	TDA3	CAF20	ENP1	LEU9	POM152	SKN1	YBL036C	
HSP78*	TSL1	CDC34*	ENP2	MAK31*	PRS5*	SKY1	UTP18	
IVY1	XRN1~^	CHD1*	ERG2	MKT1^	PUF4	SNF7	VMA7	
KEL1	YOP1	CHZ1	ERG5	MNN11*	RCL1	SPE4	VTA1	
MLS1	YOR238W	CIR2	ESF2	MRPL13	RET1*	STE20	YAE1	
NADPH-abh. α -ketoamid-Reduktase	ZTA1	CLC1	GNP1	NAT5*	RFA1	TAF6*	YDL121C	

~ annotierte Stress-Granula Komponenten der *S. cerevisiae* Genom-Datenbank (SGD)

^ annotierte P-Body Komponenten der *S. cerevisiae* Genom-Datenbank (SGD)

* in GO-Analysen als angereichert identifizierte Proteine (aufwärts: katalytische Komplexe, abwärts: zelluläre Hitzeantwort (s. Tab. 4.2))

Um außerdem einen besseren Überblick über die Beziehungen zwischen den auf diese Weise identifizierten, unidirektional regulierten Proteinen zu erhalten, wurden ferner Proteinnetzwerke mit Hilfe der String-Protein-Protein-Interaktionsdatenbank erstellt. In diesem Zusammenhang wurden die regulierten Proteine via eines in die Datenbank integrierten Werkzeugs zudem daraufhin untersucht, ob unter ihnen Faktoren bestimmter zellulärer Prozesse angereichert waren, die in der KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)-Datenbank annotiert gewesen waren. Das dabei generierte Netzwerk für alle 142 in den o. g. Grenzen regulierten Proteine ist in Abb. 4.26 zu sehen. Die entsprechenden Netzwerke für die auf- oder abwärts regulierten Proteine sind darüber hinaus in Abb. 4.27 dargestellt.

Allerdings konnten in den diesbezüglich durchgeführten Proteinanreicherungsanalysen weder unter allen regulierten noch unter den nur auf- oder abwärts regulierten Proteinen Anreicherungen von Faktoren KEGG-annotierter zellulärer Prozesse festgestellt werden. Dies könnte jedoch unter Umständen lediglich am KEGG-Datenbank-spezifischen Annotationssystem gelegen haben.

Daher wurde eine ähnliche Analyse unter Verwendung der GO (*Gene Ontology*)-Datenbank durchgeführt, um potentielle Proteinanreicherungen zu identifizieren, die mittels KEGG-Datenbankanalyse möglicherweise nicht erkennbar gewesen waren. Dabei wurden die Proteine, im Unterschied zu den KEGG-Analysen, im Fall der

GO-Anreicherungsanalysen allerdings nicht nur hinsichtlich biologischer Prozesse sondern zudem auch bezüglich molekularer Funktionen und Zugehörigkeit zu bestimmten Zellkomponenten untersucht.

Dabei konnten schließlich die in Tab. 4.2 aufgelisteten, spezifischen Proteinanreicherungen festgestellt werden. So ergab der Abgleich aller regulierten Proteine mit der GO-Datenbank eine geringe signifikante Anreicherung von Proteinen metabolischer Prozesse auf das 1,3-fache eines, bei jeder Anfrage automatisch generierten Erwartungswertes. Dieser repräsentierte dabei den Anteil an Proteinen des jeweiligen GO-Terms (hier: metabolische Prozesse), der in einer Proteingruppe einer der Anfrage entsprechenden Größe erwartet werden würde, in der keine Anreicherung stattgefunden hätte.

Tab. 4.2 Ergebnisse aus Proteinanreicherungsanalysen (GO-DB) der durch PBP1-Deletion regulierten Proteine. Die Analysen bezogen sich ausschließlich auf Proteine die in zwei unabhängig hergestellten PBP1-Deletionsstämmen unidirektional reguliert worden waren. (p: Zufallswahrscheinlichkeit für die jeweilige Proteinanreicherung)

Abwärts regulierte Proteine (ges.: 33)					
Biologische Prozesse	Proteine in Referenz-Liste	Proteine in Anfrage	erwartete Proteine in Anfrage	Anreicherung (x-fach)	p-Wert
Zelluläre Hitze-Antwort	50	5	.25	> 5	8,93E-03
Aufwärts regulierte Proteine (ges.: 108)					
Zelluläre Komponenten	Proteine in Referenz-Liste	Proteine in Anfrage	erwartete Proteine in Anfrage	Anreicherung (x-fach)	p-Wert
Katalytische Komplexe	518	23	8,48	2,71	6,10E-03
Auf- und abwärts regulierte Proteine (ges.: 141)					
Biologische Prozesse	Proteine in Referenz-Liste	Proteine in Anfrage	erwartete Proteine in Anfrage	Anreicherung (x-fach)	p-Wert
Metabolische Prozesse	3738	104	79,89	1,3	3,51E-02
Zelluläre Komponenten					
Katalytische Komplexe	518	26	11,07	2,35	2,45E-02

Abgesehen davon zeigte die GO-Proteinanreicherungsanalyse bezogen auf biologische Prozesse zudem, dass in der Gruppe deletionsabhängig abwärts regulierter Proteine insbesondere Faktoren der zellulären Hitze-Antwort signifikant angereichert waren, wobei die Anreicherung hierbei den o. g. Erwartungswert um mehr als das Fünffache übertraf (s. Tab. 4.2.). Diesbezüglich handelte es sich bei den angereicherten Proteinen um die Hitzeschockproteine HSP12, HSP26, HSP78, HSP104 sowie das SSA4-Protein. (s. Abb. 4.26 rechts & 4.27A & Tab. 4.1). Dieses Ergebnis sprach somit klar für eine wichtige Funktion von PBP1 bei der Stressantwort in Hefezellen.

Ferner konnte für die aufwärts regulierten Proteine ebenfalls eine spezifische und signifikante Proteinansammlung nachgewiesen werden, die sich in diesem Fall allerdings auf zelluläre Komponenten bezog (s. Tab. 4.2). Es stellte sich nämlich diesbezüglich in den Anreicherungsanalysen heraus, dass besonders Bestandteile katalytischer Komplexe unter den durch PBP1-Deletion aufwärts regulierten Proteinen angereichert gewesen waren, und zwar auf das ca. 2,7-fache des Erwartungswertes, was insgesamt 23 Proteine betraf (s. Tab. 4.1 Asterisken & Abb. 4.27B). Diese Anreicherung von Proteinen katalytischer Komplexe war darüber hinaus so groß, dass sie sich sogar in den Ergebnissen der Anreicherungsanalyse aller regulierten Proteine widerspiegelte (s. Tab. 4.2).

Die größte Untergruppe der deletionsabhängig regulierten Komponenten katalytischer Komplexe bestand dabei aus acht Proteinen die hauptsächlich Funktionen bei der Transkription ausüben. So waren allein fünf dieser Proteine (HPR1, RET1, RPA49, RPB8, RPC31) Untereinheiten von RNA-Polymerasen. Bei den restlichen drei Proteinen handelte es sich außerdem um zwei Transkriptions-Initiationsfaktoren (TAF6 & TAF9) und einen Chromatin-Remodellierungsfaktor (CHD1) (s. Abb. 4.27B rechts oben).

Ab- und aufwärts regulierte Proteine

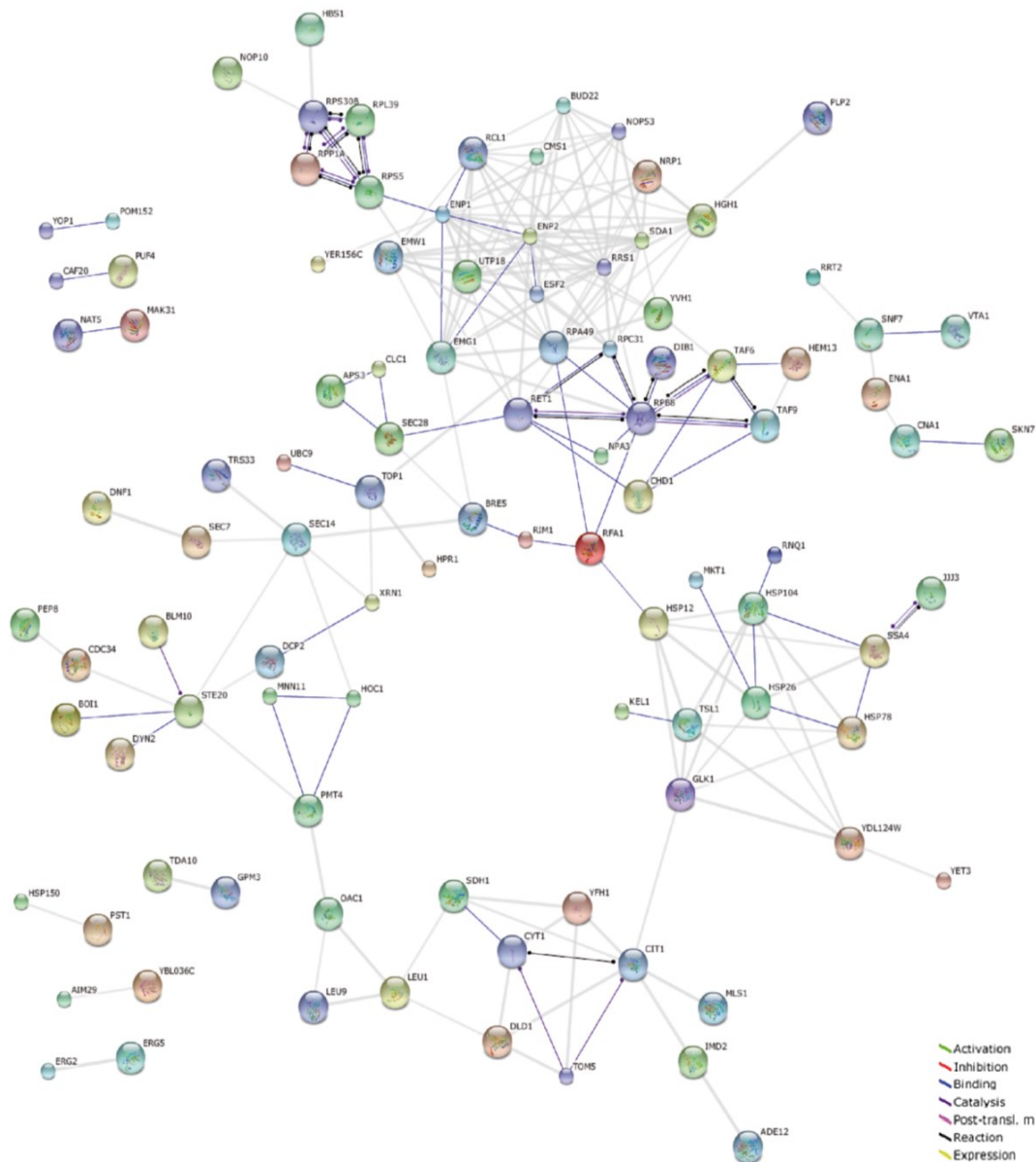
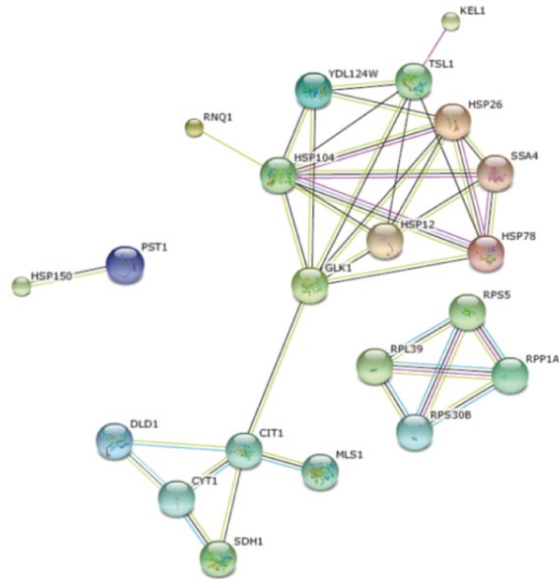


Abb. 4.26 Mit Hilfe der String-DB erstelltes Protein-Netzwerk (Aktions-Ansicht) aller 142 durch PBP1-Deletion in zwei unabhängigen Deletionstämmen konsistent regulierter Proteine (s. Tab. 4.1) Im Netzwerk sind ausschließlich Interaktionen mit hoher statistischer Konfidenz (String-Konfidenz-Quotient: 0,7) abgebildet, und unverbundene Knotenpunkte wurden entfernt. Die Bedeutung der verschiedenen Verbindungen ist in der String-Legende rechts unten dargestellt

Eine zweite große Gruppe unter den regulierten Komponenten katalytischer Komplexe bildeten ferner Transferasen bzw. deren Untereinheiten (sieben Proteine), von denen einige auch einen direkten Bezug zu C-metabolischen Prozessen haben. Dies bezieht sich dabei auf die folgenden fünf Proteine: PMT4 (Mannosyltransferase), MNN1 (mutmaßl. Mannosyltransferase-Untereinheit), HOC1 (mutmaßl. Glycosyl-Transferase), MAK31 (Acetyltransferase), NAT5 (Acetyltransferase-Untereinheit). Die weiteren beiden Transferase-Proteine in dieser Gruppe waren zudem GPI16 (GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Transamidase-Untereinheit) sowie SDC1 (Methyltransferase). Auffällig war daran v. a. dass mindestens vier dieser durch PBP1-Deletion aufwärts regulierten Transferase-Proteine, d. h. PMT1, MNN1, HOC1 und GPI16 wichtig für ER- bzw. Golgi-Apparat (GA)-abhängige Proteinmodifizierungen sind.

A

Abwärts regulierte Proteine



B

Aufwärts regulierte Proteine

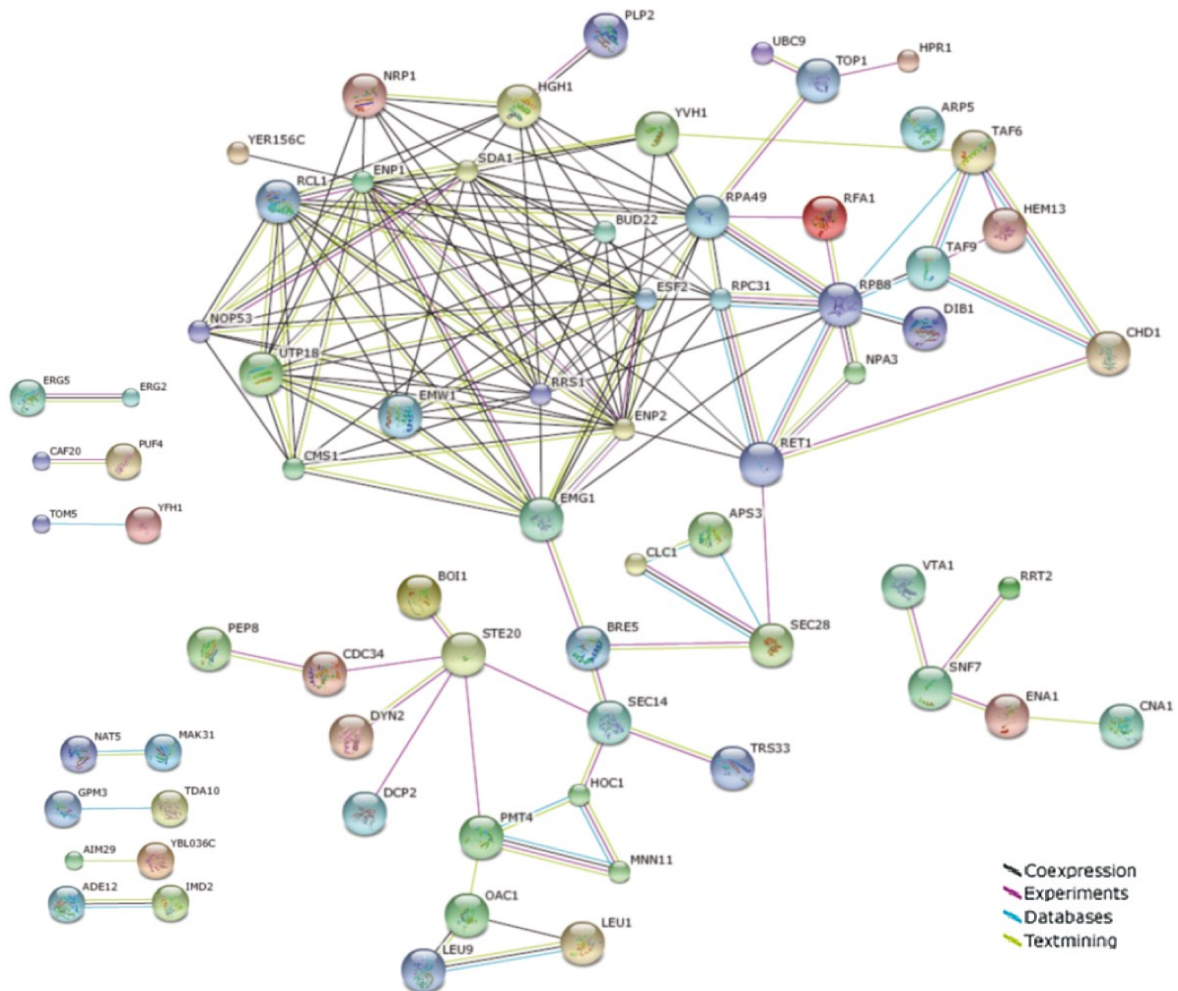


Abb. 4.27 Mit Hilfe der String-DB erstellte Protein-Netzwerke (Beweis-Ansicht) für die durch PBP1-Deletion in zwei unabhängigen PBP1-Deletionsstämmen konsistent regulierten Proteine (s. Tab. 4.1). (A) 34 abwärts regulierte Proteine und (B) 108 aufwärts regulierte Proteine. In den Netzwerken sind ausschließlich Interaktionen mit hoher statistischer Konfidenz (String-Konfidenzquotient: 0,7) abgebildet, und unverbundene Knotenpunkte sowie genomische Interaktionen wurden entfernt bzw. ausgelassen. Die Bedeutung der verschiedenen Verbindungen kann in den Original-String-Legenden jeweils rechts unten in den Bildern abgelesen werden (*Textmining* = Literaturrecherchen).

Neben der bereits zuvor gezeigten Lokalisation von Ataxin-2 an ER und GA, konnte hier somit zudem eine durch dessen Ortholog PBP1 vermittelte Regulation von Proteinen beobachtet werden, die wichtig für die Katalyse proteinmodifizierender Reaktionen an diesen Kompartimenten sind. Zusammengenommen könnte Ataxin-2 demzufolge auch in humanen Zellen eine Rolle bei der Regulation ER- bzw. GA-abhängiger Proteinmodifikationen spielen.

In diesem Zusammenhang sei jedoch erwähnt, dass die Acetyltransferase-Proteine MAK31, NAT5 und die Methyltransferase SDC1 unter Umständen auch zur o. g. ersten Gruppe der durch PBP1-Deletion regulierten Komponenten katalytischer Komplexe, d. h. den transkriptionsrelevanten Proteinen, gezählt werden könnten. Diese Art von Transferasen sind nämlich v. a. dafür bekannt Histone zu acetylieren oder zu methylieren, wodurch sie die Zugänglichkeit von Chromatin für Transkriptions-Initiationsfaktoren und damit auch die Transkriptionsinitiation an sich regulieren. Insgesamt ließ dies den Schluss zu, dass PBP1 in WT-Hefezellen durch Inhibition der Expression transkriptionsregulierender Enzymkomplexe selbst als indirekter Regulator der Transkription bestimmter Gene fungieren könnte.

Neben o. g. Komponenten katalytischer Komplexe, die unter den durch PBP1-Deletion aufwärts regulierten Proteinen angereichert waren und größeren Gruppen zugeordnet werden konnten, gehörten dazu jedoch noch weitere Proteine, die eher kleinere Gruppen bildeten. So konnten darunter z. B. drei weitere Proteine erkannt werden, die man als explizite Signalproteine kategorisieren könnte. Dies waren CNA1 (Phosphatase), CDC34 (E2-Ubiquitin-konjugierendes Enzym) sowie NPA3 (GTPase). Dazu kamen mit DYN2 (Dynein leichte Kette) und ARP5 (Aktin zugehöriges Protein) ferner zwei zytoskelettspezifische Proteine, sowie mit DNF1 eine Phospholipid transportierende ATPase und mit LEU1 eine Dehydrogenase. Auch in Hinblick auf diese Proteine lässt sich somit davon ausgehen, dass ihre Expression im WT-Stamm durch PBP1 inhibiert gewesen war.

Abschließend sei zudem auf die in diesen Experimenten erstmals nachgewiesene genetische Verbindung zwischen PBP1 und dem Hefe-Prionprotein RNQ1 (Reich an N und Q 1) hingewiesen, für das in diesem Fall allerdings eine deletionsabhängige Abwärtsregulation festgestellt wurde (s. Abb. 4.27A & Tab. 4.1). Dabei war die RNQ1-Menge im Δ PBP1-DB-Stamm auf ca. 32 % und im Δ PBP1-sm auf etwa 41 % des diesbezüglich für den WT-Stamm festgestellten Wertes abgesunken. Man kann daher folgern, dass PBP1 im WT-Hefestamm die RNQ1-Proteinexpression fördert. Davon ausgehend wäre es entsprechend auch für Ataxin-2 denkbar, dass es ähnlich seinem Hefe-Ortholog die Expression von humanem Prion-Protein oder prionartigen Proteinen (z. B. TDP-43) kontrolliert.

Neben dieser globalen Auswertung der massenspektrometrischen Untersuchungen wurden diese zusätzlich auf durch PBP1-Deletion regulierte PB und SG-Komponenten hin analysiert, worüber im folgenden Abschnitt berichtet wird.

4.4.2. Auswertung der Proteomanalysen hinsichtlich PB- und SG-Komponenten

Da auch mRNP-relevante PBP1-Funktionen in dieser Arbeit untersucht werden sollten, wurden die o. g. via PBP1-Deletion regulierten Proteine zielgerichtet auf das Vorkommen von SG- oder PB-Komponenten hin untersucht. Dabei zeigte sich, wie in Abb. 4.28 zu erkennen ist, dass einerseits drei SG- und andererseits vier PB-Komponenten unter den unidirektional regulierten Proteinen (s. v. Abs.) identifiziert werden konnten.

Diesbezüglich fiel ferner auf, dass die mRNP-Komponenten durch PBP1-Deletion in den meisten Fällen aufwärts reguliert waren, was somit auch in diesem Zusammenhang auf eine eher repressorische Funktion von PBP1 hinweist. Eins dieser Proteine war z. B. das SG-Protein NRP1 (N-reiches Protein 1), ein bisher kaum

charakterisiertes, vermutlich mRNA-bindefähiges Protein, welches infolge von Glc-Mangel zu SG rekrutiert wird. Ebenso deletionsabhängig aufwärts reguliert waren zudem die drei PB-Komponenten MKT1, DCP2, BRE5 (Brefeldin A sensitiv 5).

Besonders zu erwähnen ist dabei die Regulation von MKT1, da dieses mit PBP1 komplexieren kann, wodurch dessen Lokalisation zu Polysomen ermöglicht wird.⁷⁰ MKT1 kann zudem zytoplasmatische Foki infolge von DNA-Replikations-Stress bilden, was ebenso für DCP2, die katalytische Untereinheit des DCP1/DCP2-Komplexes zutrifft, die ebenfalls durch PBP1-Deletion abwärts reguliert worden war. Die PBP1-abhängige Regulation dieser beiden Proteine könnte demnach besondere Bedeutung bei der mRNP-Granulabildung während der zellulären Stressantwort haben.

Davon abgesehen weist die PBP1-Abhängigkeit des Ubiquitin-Proteasokofaktors BRE5 einmal mehr auf die Teilnahme von PBP1 an Endomembran-Transportprozessen hin, da dieser bereits als Koregulator von antero- und retrogradem Transport zwischen ER und GA bekannt ist.³⁰⁶

Die zwei abwärts regulierten Proteine andererseits waren XRN1, welches insofern besonders ist, da es in SG und PB vorkommen kann (vgl. Abb. 4.28A & B), sowie das HSP26-Protein, das als stressinduzierbares Chaperon für die Reparatur fehlgefalteter Proteine verantwortlich ist. Dabei steht HSP26 wie im vorigen Abschnitt beschrieben zudem mit vier weiteren PBP1-regulierten Proteinen in Verbindung die eine Rolle bei der zellulären Stressantwort spielen. (s. Abb. 4.27A) Dies lässt vermuten, dass besonders das Netzwerk aus diesen fünf Proteine sowie PBP1 für die stress-spezifischen und SG-bildenden Funktionen von PBP1 wichtig sein könnten.

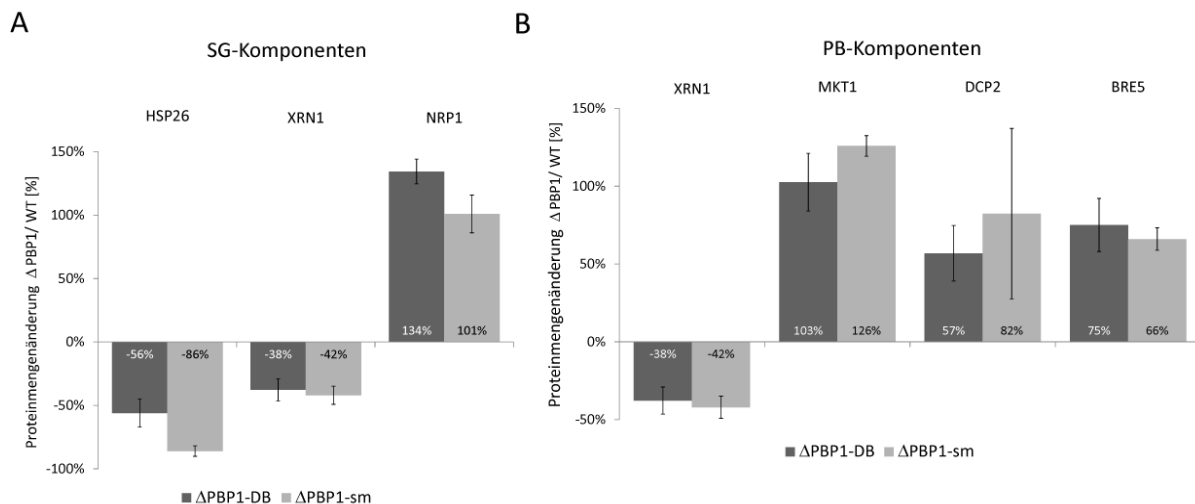


Abb. 4.28 Durch PBP1-Deletion in zwei unabhängigen ΔPBP1-Hefe-Deletionsstämmen unidirektional regulierte SG- und PB-Komponenten (A) SG-Komponenten, (B) PB-Komponenten. Dargestellt ist die relative Änderung der Proteinmengen (plus Standardfehler) in den Deletionsstämmen bezogen auf den WT-Hefestamm. Die Verhältnisse wurden auf Grundlage von Mittelwerten labelfreier Quantifizierungen aus drei unabhängigen MS-Experimenten berechnet.

Zusammengefasst wiesen die vergleichenden Proteomanalysen also auf einen hauptsächlich inhibitorischen Einfluss von PBP1 auf die Proteinexpression in *S. cerevisiae* hin (s. Tab. 4.1 & Abb. 4.27), der besonders katalytische Komplexe betraf. Dabei handelte es sich zum Großteil um Komplexe die an der Gentranskription bzw. deren Regulation beteiligt sind sowie um verschiedene Transferasen (s. o.), die überwiegend mit ER-spezifischen Proteinmodifikationsprozessen in Verbindung standen. Zudem konnte bezüglich der meisten hier als PBP1-reguliert identifizierten mRNP-Granulakomponenten von einem inhibitorischen PBP1-Einfluss auf deren Expression ausgegangen werden (s. Abb. 4.28). Eine Ausnahme davon war jedoch das, infolge der PBP1-Deletion abwärts regulierte HSP26-Protein, das genau wie PBP1 eine SG-Komponente ist.^{99,307} Das bedeutet

somit, dass PBP1 im WT-Hefestamm die Expression von HSP26 positiv reguliert. Es wäre demnach möglich, dass sich dieser regulatorische Einfluss auf HSP26 v. a. in Stress-Situationen fördernd auf die SG-Assemblierung der Hefezellen auswirken könnte, was in diesem Fall auch potentielle Ursache einer bereits zuvor beobachteten, durch PBP1-Deletion vermittelten SG-Assemblierungs-Inhibition gewesen sein könnte.⁹⁹

In diesem Zusammenhang ist ferner festzuhalten, dass HSP26 zudem einer Gruppe spezifisch angereicherter Proteine unter den deletionsabhängig abwärts regulierten Proteinen angehörte, die alle der zellulären Stressantwort auf Hitze zugerechnet werden konnten (s. Tab. 4.2). Diese Gruppe bestand hauptsächlich aus weiteren HSP-Proteinen, von deren PBP1-vermittelter, positiver Regulation im WT-Hefestamm dementsprechend ebenfalls ausgegangen werden konnte. Dies deutete somit insgesamt auf eine wichtige PBP1-Funktion bei der Regulation der zellulären Reaktion auf Stress hin, für die zudem die Expression der o. g. Gruppe spezifisch angereicherter Proteine der zellulären Hitze-Stressantwort wichtig sein könnte

Abschließend sei hier noch erwähnt, dass die MS-Analysen auch auf eine PBP1-abhängige positive Regulation des Hefe-Prionprotein RNQ1 in WT-Hefezellen hinwiesen. Daraus ergibt sich, dass Ataxin-2 in humanen Zellen ebenfalls die Expression prionogener Proteine beeinflussen könnte, was, sofern zutreffend, auch pathologisch sehr bedeutsam wäre.

5. Diskussion

5.1. Untersuchung zweier physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte im *S. cerevisiae*-Modellsystem

Ein besonders auffälliges, gemeinsames Merkmal diverser neurodegenerativer Erkrankungen ist die Bildung pathologischer, proteinreicher intra- oder extrazellulärer Einschlüsse in erkranktem Gewebe. Dort sind neben bestimmten krankheitspezifischen Proteinen häufig auch proteolytisch prozessierte Teilabschnitte dieser Proteine angereichert. Diese Spaltprodukte sind oft aggregationsaffiner als die entsprechenden vollständigen Proteine, und in vielen Fällen konnte eine von ihnen ausgehende pathogene oder pathogenesefördernde Wirkung nachgewiesen werden (s.u.).

So konnte z. B. im Fall der motoneurodegenerativen ALS gezeigt werden, dass die dafür charakteristischen zytoplasmatischen Akkumulationen des TDP-43-Proteins in erkrankten Zellen neben dem vollständigen Protein auch mit trunkeierten C-terminalen, Caspase-3-abhängigen TDP-43-Spaltprodukten angereichert sind. Diesen konnte dabei zudem zytotoxische Wirkung nachweisen werden, weshalb man davon ausgeht, dass sie die ALS-Pathogenese begünstigen.³⁰⁸

Ähnliches gilt zudem für einige PolyQ-Erkrankungen wie Chorea Huntington, SCA3 oder SCA1, die durch pathogene intranukleäre Einschlüsse in erkrankten Neuronen gekennzeichnet sind. Diese Einschlüsse sind dabei reich an den entsprechenden PolyQ-Proteinen Htt, Ataxin-3 und Ataxin-1. Es konnte jedoch auch in diesen Fällen zusätzlich die Anreicherung PolyQ-Domänen-tragender Proteinteilabschnitte in den intranukleären Akkumulationen festgestellt werden, denen darüber hinaus ebenfalls zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden konnte.^{104,105}

Im Gegensatz dazu trägt die Bildung von neuronalen intranukleären Ataxin-2-Einschlüssen zur SCA2-Pathogenese vermutlich nur wenig bei, wie Untersuchungen an *post mortem* SCA2-Hirngewebe und in Zellkultur zeigten. Allerdings konnten auch diesbezüglich in SCA2-Hirnextrakten via Immunoblot zwei spezifisch angereicherte, verkürzte Ataxin-2-Isoformen detektiert werden. Dabei handelte es sich zum einen um eine ca. 42 kDa große N-terminale Isoform sowie zum anderen um einen ca. 70 kDa große C-terminalen Ataxin-2-Teilabschnitt. Damit entsprachen die Größen dieser Isoformen relativ genau denen zweier Ataxin-2-Spaltprodukte einer mutmaßlichen Caspase-3-vermittelten Proteolyse an einer bereits zuvor identifizierten Caspase-3-Konsensussequenz im Ataxin-2 (AS: 397 – 400, s. Abb. 4.1A).^{7,50,110} Daher wird angenommen, dass es sich bei den entdeckten Isoformen um caspase-abhängige Ataxin-2-Spaltprodukte handelt. Über potentielle pathogene Eigenschaften dieser Spaltprodukte sowie über deren zelluläre Lokalisation ist jedoch zurzeit nichts bekannt. Aus diesem Grund wurden hier entsprechende rekombinante Ataxin-2-Teilabschnitte hinsichtlich zytotoxischer Effekte, Fokibildungsverhalten und ihrer subzellulären Lokalisation im *S. cerevisiae*-Modellsystem untersucht.

Das Hefemodell wurde dabei v. a. deshalb gewählt, da es bereits erfolgreich zur Untersuchung des Akkumulationsverhaltens und zum Nachweis der Zytotoxizität diverser neurodegenerativer Proteine bzw. pathogener Proteinisoformen eingesetzt worden war. Zu diesen gehören z. B. das Prion-Protein, TDP-43 aber auch PolyQ-Proteine wie Ataxin-3 oder Htt bzw. ein N-terminaler, PolyQ-tragender Htt-Teilbereich.^{265,309,310,283} Dabei liegt ein Hauptvorteil von *S. cerevisiae* gegenüber anderen Modellen darin, dass es ein relativ kleines und

v. a. sehr gut charakterisiertes Genom besitzt. Dementsprechend stehen bereits viele etablierte Untersuchungsmethoden und genetische Werkzeuge, wie z. B. systematische Hefe-Genombibliotheken, dafür zur Verfügung. Gleichzeitig sind Hefezellen eukaryontische Individuen und ähneln darin humanen Zellen. Das bedeutet, dass v. a. grundlegende zelluläre Abläufe (z. B. Genexpression, Apoptose etc.), Komponenten (z. B. Proteine), Strukturen (z. B. mRNP-Granula wie SG und PB) oder auch Interaktionen (z. B. mRNA-Protein-Bindungen) zwischen beiden Zellsystemen konserviert sind. Dies zusammen macht das *S. cerevisiae*-Modell somit zu einer relativ einfach zu nutzenden und gleichzeitig sehr effizienten Möglichkeit basale zellbiologische Zusammenhänge zu analysieren, was sich auch in dieser Arbeit zu Nutze gemacht wurde.

5.1.1. Die Ataxin-2-Spaltprodukte zeigten Unterschiede hinsichtlich zytotoxischer Effekte und Fokibildung in Hefezellen

Mit Hilfe von Wachstumsanalysen im Hefemodell wurden bereits diverse humane neurodegenerative Krankheitsproteine hinsichtlich ihrer zytotoxischen Effekte untersucht (s. v. Abs.). Für exogen in *S. cerevisiae* exprimiertes Ataxin-2 konnte jedoch auf diese Weise bisher keine Zytotoxizität festgestellt werden, was sowohl für nicht pathogenes Ataxin-2 (22 Q-Repeats) als auch für eine pathogene Ataxin-2-Mutante (79 Q-Repeats) gilt.^{60,289} Ein Ergebnis, dass auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (s. Abb. 4.1B).

Abgesehen davon bestand allerdings die Möglichkeit, dass die zuvor erwähnten physiologischen Ataxin-2-Spaltprodukte (s. v. Abs.) dennoch Zytotoxizität in Hefe vermitteln könnten, was hier in Wachstumsanalysen untersucht wurde. Dabei konnte für ein galaktose-induziert exprimiertes, C-terminales Ataxin-2-Spaltprodukt sehr konsistent ein toxischer Einfluss auf die Hefezellen nachgewiesen werden (s. Abb. 4.1B). Andererseits vermittelte die Expression eines entsprechenden N-terminalen Spaltprodukts in diesen Experimenten keine reproduzierbare wachstumshemmende Wirkung.

Es war also in diesem Fall bemerkenswerterweise genau der Ataxin-2-Abschnitt ohne PolyQ-Domäne, der toxisch in den Hefezellen wirkte, was aufgrund der Bedeutung dieser Domäne für die SCA2-Pathogenese eher unerwartet war. Allerdings hatte bereits eine frühere Studie zu Auswirkungen der Expression des mutmaßlich caspase-abhängigen Ataxin-2-N-Terminus in Säugerzellen (COS-1) zu ähnlichen Ergebnissen geführt. Dort konnte nämlich ebenfalls für keine der untersuchten N-Terminus-Isoformen (mit 22, 58 oder 108 Q-Repeats) eine zelltodfördernde Wirkung mittels Trypan-Blau-Test festgestellt werden. Dementsprechend vermuteten die Autoren dieser Publikation bereits, dass eher C-terminal der PolyQ-Domäne gelegene Proteinbereiche von Ataxin-2 für dessen zytopathologische Effekte wichtig sein könnten.¹²¹ Die Ergebnisse der hier durchgeführten Hefewachstumsanalysen bestätigten diese Säugerzellstudie somit hinsichtlich des ausbleibenden zytotoxischen Effekts des N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts. Sie lieferten jedoch darüber hinaus auch erstmals den prinzipiellen *in vivo*-Beweis dafür, dass der Ataxin-2-C-Terminus in Eukaryonten tatsächlich, wie zuvor postuliert worden war, zytotoxisch wirken kann.

Eine anschließende mikroskopische Fokibildungsanalyse mit galaktose-induzierbaren, Redstar-fluoreszenzmarkierten Spaltprodukt-Fusionsproteinen ergab außerdem, dass insbesondere der C-terminale Ataxin-2-Abschnitt stark zur Fokibildung neigte. So konnten in allen diesbezüglich untersuchten Proben in der überwiegenden Mehrheit der Zellen die den C-Terminus exprimierten, zwischen zwei und drei Fluoreszenzfoki detektiert werden. Diese waren zudem gelegentlich sehr groß, und konnten in diesen Fällen im Querschnitt nahezu die Hälfte der Gesamtzellfläche einnehmen (s. Abb. 4.2). Das N-terminale Redstar-markierte Ataxin-2-

Spaltprodukt zeigte hingegen unter diesen Bedingungen nur sehr selten Fokibildung und war stattdessen in nahezu allen N-Terminus exprimierenden Hefezellen diffus verteilt. Zusammengenommen führten diese Beobachtungen schließlich zu der Hypothese, dass die zytotoxischen Effekte des Ataxin-2-C-Terminus in Hefezellen durch dessen starke Fokibildung verursacht worden sein könnten.

Auf dieser Grundlage wurde daraufhin in weiteren mikroskopischen Analysen zudem die Lokalisation der C-Terminus-Foki in den Hefezellen näher charakterisiert, um so u. a. Hinweise darüber zu erhalten, wie sie mutmaßliche zytotoxische Effekte vermittelt haben könnten. Dabei wurden sie zum einen hinsichtlich ihrer Kolokalisation mit Markern subzellulärer Hefezellkompartimente und zum anderen bezüglich ihres SG-Charakters untersucht. Von diesen Untersuchungen handeln die beiden folgenden Abschnitte.

5.1.1.1. Die Foki des Ataxin-2-C-Terminus kolokalisierten mit Markerproteinen diverser subzellulärer Kompartimente

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts wurden zunächst Kolokalisationsanalysen in einer Reihe von Hefestämmen durchgeführt, die RFP-markierte Zellkompartiment-Marker chromosomal exprimierten.²⁶³ Dabei handelte es sich um Marker für den Nukleolus (NOP56), den Nukleus (NIC96), Spindelpolkkörper (SPC42), den Golgi-Apparat (ANP1), Liposomen (ERG6), COPII-Vesikel (SEC13), Endosomen (SNF7), Peroxisomen (PEX3) und Aktin (SAC6).

Anders als in o. g. initialen Fokibildungs- und Wachstumsanalysen (s. v. Abs.) wurde dabei allerdings entsprechend den hier gegebenen experimentellen Bedingungen kein Redstar- sondern ein GFP-markiertes Fusionsprotein des Ataxin-2-C-Terminus untersucht. Da jedoch beide Fusionsproteine nahezu identisches Fokibildungsverhalten zeigten konnte davon ausgegangen werden, dass dieses von der Art des Fluoreszenz-Tags nicht beeinflusst wurde.

Ferner wurde in diesem Zusammenhang zu Vergleichs- und Kontrollzwecken zudem ein GFP-markierter Ataxin-2-N-Terminus untersucht, dessen Fokibildungsverhalten dabei ebenfalls nahezu dem seines Redstar-markierten Fusionsproteins aus o. g. Analysen entsprach (s. v. Abs.). Das bedeutet, dass auch der GFP-markierte N-Terminus fast ausschließlich diffus in den Hefezellen verteilt vorlag. Allerdings konnte darüber hinaus selbst im Fall der selten beobachteten Foki des GFP-markierten N-terminalen Spaltprodukts keine Kolokalisation mit irgendeinem der o. g. RFP-Markerproteine festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu zeigte das GFP-markierte C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt in diesen Experimenten weitreichende Kolokalisation mit vier der neun untersuchten RFP-Markerproteine. Diese waren erstens der Peroxisomenmarker PEX3, zweitens der Golgi-Apparat (GA)-Marker ANP1, drittens die Spindelpolkkörper-Komponente SPC42 und viertens das Kernporenkomplex-Proteins NIC96.

Diesbezüglich sprechen frühere Untersuchungen besonders im Fall des GA-Markers ANP1 dafür, dass dessen Kolokalisation mit dem Ataxin-2-C-Terminus spezifisch war. So konnte in diesem Zusammenhang z. B. für Zellen aus humanem, *post-mortem* Cortex-Gewebe demonstriert werden, dass deren Ataxin-2-Protein sich infolge differentieller Zentrifugation in derselben subzellulären Fraktion anreichert wie GA-spezifische Proteine. Gleichzeitig konnte dort in Immunfluoreszenz (IF)-Analysen immortalisierter Primatenzellen (COS-1) Ataxin-2-Kolokalisation mit dem GA-Marker Ergic58 festgestellt werden.¹¹⁹ Davon unabhängig konnte ferner auch in Nagerzellen (PC12) Kolokalisation von Ataxin-2 mit dem Trans-Golgi-Netzwerk-Marker p230 beobachtet werden, und darüber hinaus zeigte sich in dieser Studie anhand von subzellulären Fraktionierungen der murinen Zellen ebenfalls eine Ataxin-2-Anreicherung in deren GA-Fraktion.¹¹⁸

Dies lässt vermuten, dass GA-spezifische Funktionen und Protein-Interaktionen des Ataxin-2 evolutionär zwischen *S. cerevisiae* und humanen Zellen konserviert sein könnten. Diesbezüglich sei jedoch darauf hingewiesen, dass hier lediglich ein Ataxin-2-Spaltprodukt untersucht wurde. Um also genauere Aussagen zu evolutionär konservierten zellulären Funktionen oder Aufenthaltsorten von Ataxin-2 in Hefezellen machen zu können, wäre es ratsam die hier erzielten Ergebnisse zunächst mit vollständigem Ataxin-2-Protein zu validieren. Neben diesen Verbindungen von Ataxin-2 zum GA, konnte darüber hinaus in IF-Experimenten mit humanen Zellen (HeLa) und Primatenzellen (COS-7) zudem eine Ataxin-2-Assoziation mit den ER-Markern Calreticulin und Calnexin festgestellt werden. Außerdem wurden in diesem Zusammenhang Maushirn-Homogenate einer komplexen, differentiellen Zellfraktionierung unterzogen, die ergab, dass Ataxin-2 hauptsächlich mit Komponenten des rER kofraktionierte.⁶⁹ Zudem ist darüber hinaus von PEX3 bekannt, dass es zunächst als integrales Protein in die ER-Membran eingebaut wird, und daraufhin die Knospung von Peroxisomen vermittelt. Demnach könnte es sich bei den mit PEX3 kolokalisierenden Ataxin-2-C-Terminus-Foki, die in den hier durchgeführten Kolokalisationsanalysen (s. o.) beobachtet wurden, möglicherweise zumindest teilweise um ER lokalisiertes Spaltprodukt gehandelt haben. Wobei dessen Signal in diesem Fall eher unspezifisch mit dem des PEX3-RFP kolokalisiert gewesen sein könnte. Dies spräche im Umkehrschluss jedoch für eine spezifische ER-Lokalisation des Ataxin-2-C-Terminus, was unter den o. g. Einschränkungen zusätzlich auf eine evolutionär in Hefe konservierte Wechselwirkung zwischen Ataxin-2 und dem ER hinweisen könnte. Da das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt allerdings insbesondere mit PEX3-RFP in besonders vielen Foki kolokalisierte, könnten einige dieser Foki natürlich auch Peroxisomen gewesen sein. Darüber, ob Ataxin-2 in Säugerzellen mit Peroxisomen kolokalisiert, ist jedoch nur wenig bekannt. Allerdings ließen erste IF-Kolokalisationsanalysen mit einem Katalase-Antikörper zumindest in HeLa-Zellen keine Peroxisomen-Lokalisation von Ataxin-2 erkennen, was eher gegen eine spezifische Ataxin-2-C-Terminus-Kolokalisation mit den PEX3-positiven Hefe-Peroxisomen spricht.¹¹⁸

Außerdem sei hier erwähnt, dass trotz der beobachteten Assoziation des Ataxin-2-C-Terminus mit dem GA-Marker ANP1 und dem mutmaßlich teilweise ER-lokalisierten PEX3 für diesen keine Kolokalisation mit dem COPII-Vesikel-Protein SEC13 beobachtet wurde. Eine Verbindung des Ataxin-2-C-Terminus zum ER-zu-GA-Transport konnte somit also in den Hefezellen nicht hergestellt werden.

Davon abgesehen lässt sich bezüglich der hier festgestellten Kolokalisation des C-terminalen Ataxin-2-Abschnitts mit dem Hefe Kernporenkomplex-Protein NIC96 ebenfalls eine spezifische Assoziation vermuten. Der Grund dafür ist, dass bei Experimenten in Säugerzellkultur bereits perinukleäre Lokalisation von Ataxin-2 beobachtet wurde, welches demzufolge mit den Kernporen in Verbindung gestanden haben könnte.¹¹⁹ Allerdings wurden diesbezüglich bisher keine Kolokalisationsstudien durchgeführt, so dass noch unklar ist ob Ataxin-2 in Säugerzellen tatsächlich an den Kernporen lokalisiert ist. Es wäre daher für folgende Experimente ratsam zunächst zu evaluieren, ob insbesondere das humane NIC96-Ortholog Nup93 oder auch andere humane Kernporenkomplex-Proteine mit Ataxin-2 kolokalisieren können.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang außerdem eine kürzlich entdeckte Verbindung zwischen NIC96 und der H₂O₂-Stressantwort in Hefezellen, die durch NIC96-Deletion peroxidhypersensitiv wurden. Interessant ist dies zum einen, da Ataxin-2 und sein Hefe-Ortholog PBP1 als SG-Bestandteile Teil der integrierten Stressantwort sind, und zum anderen da in dieser Arbeit Kolokalisation des Ataxin-2-C-Terminus mit dem Peroxisomen-Marker PEX3 gezeigt werden konnte (s. o.).^{60,101} Man kann daher vermuten, dass Ataxin-2 ein Verbindungsglied zwischen dem Nukleus bzw. Kernporenkomplexen und der zellulären Peroxid-Stressantwort

via Peroxisomen darstellen könnte. Die Analyse der trilateralen Beziehungen zwischen Ataxin-2, den Kernporenkomplexen sowie Peroxisomen könnte somit ebenfalls ein vielversprechender Ansatz für nachfolgende Untersuchungen zur zellulären Ataxin-2-Funktion sein.

Eine weitere Verbindung des C-terminalen Ataxin-2-Abschnitts zur Kernperipherie kann zudem aus seiner Kollokalisierung mit dem Kernprotein des Spindelpolkörpers SPC42 geschlossen werden, da diese Struktur in die Kernhülle von *S. cerevisiae*-Zellen integriert ist. Dort dient der Spindelpolkörper als einziges Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOZ) der Hefezelle, und übt somit während der Karyokinese zudem die Funktion des Hefe-Zentrosoms aus. Bezüglich des humanen Systems könnte das bedeuten, dass Ataxin-2 bzw. dessen C-Terminus neben seiner mutmaßlichen Assoziation mit perinukleären Proteinen auch mit zytoplasmatischen MTOZ interagieren könnte. Das ist besonders deshalb interessant, da Fehlfunktionen von Proteinen des Mikrotubuli-Netzwerks bereits mit z. B. Tauopathien oder der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht wurden.³¹¹ Aus diesem Grund wäre es vermutlich sehr sinnvoll potentielle funktionelle Zusammenhänge zwischen Ataxin-2 und Mikrotubuli sowie den MTOZ in weiterführenden Experimenten näher zu untersuchen.

Schließlich sei darüber hinaus erwähnt, dass keine Kollokalisierung zwischen einem der beiden Ataxin-2-Spaltprodukte und SAC6 festgestellt werden konnte. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass ein früherer Hefe-Deletionsbank-Screen ergab, dass die SAC6-Deletion synthetische Letalität in Ataxin-2 exprimierenden Hefezellen induziert, was damit auf eine SAC6-Funktion als Inhibitor zellschädigender Einflüsse von Ataxin-2 im entsprechenden WT-Hefestamm hinwies.⁸⁶ Die Ergebnisse der hier durchgeführten Kollokalisationsstudien könnten somit darauf hinweisen, dass diese SAC6-Funktion nicht durch dessen direkte Interaktion mit Ataxin-2 vermittelt wird. Allerdings wäre es auch vorstellbar, dass vollständiges Ataxin-2 aufgrund einer gegenüber den Spaltprodukten veränderten Konformation dennoch mit SAC6 kollokalisieren bzw. interagieren könnte. Es könnte sich also auch in diesem Fall anbieten in Folgeexperimenten zunächst die Kollokalisierung von vollständigem Ataxin-2 mit SAC6 zu untersuchen, um die Art ihrer Wechselwirkung besser verstehen zu können.

5.1.1.2. Die Ataxin-2-C-Terminus-Foki sind keine Stress-Granula und inhibieren zudem die Stress-Granula-Assemblierung in Hefezellen.

Wie erwähnt sind Ataxin-2 in humanen Zellen und PBP1 in Hefezellen jeweils Bestandteil der dort gebildeten Stress-Granula (SG), und sie fördern zudem in beiden Fällen die SG-Assemblierung.^{60,65,99,101,183} Deshalb wurde hier auch untersucht, ob die beobachteten Foki des Ataxin-2-C-Terminus Hefe-SG gewesen sein konnten, wobei gleichzeitig geprüft wurde, ob die zelluläre SG-Bildung durch Expression eines der beiden Ataxin-2-Spaltprodukte beeinflusst wird.

Dazu wurde in diesem Fall ein Hefestamm genutzt, der als SG-Marker GFP-markiertes PBP1 chromosomal exprimierte, der sich jedoch ansonsten nicht von o. g. RFP-Markerprotein-Hefestämmen unterschied (s. v. Abs.).²⁶³ Um dabei die Brauchbarkeit des PBP1-GFP-Stamms als SG-Markerstamm abzusichern, wurde er allerdings zunächst unabhängig von der Spaltprodukt-Expression untersucht. Diese Analysen zeigten, dass sowohl Natriumazid (NaN_3) als auch Hitze die Bildung von PBP1-GFP-Foki in diesem Stamm sehr effektiv induzierten. Außerdem wurde diese stressabhängige Fokibildung durch den SG-Assemblierungsinhibitor Cycloheximid (CHX) unterdrückt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei den PBP1-GFP-Foki um Hefe-SG handelte. Diese Ergebnisse bestätigten damit auch zwei frühere Studien, die zeigten, dass PBP1 eine Komponente von hitze- bzw. NaN_3 -abhängigen Hefe-SG ist.^{191,312}

Hinsichtlich der Foki des Ataxin-2-C-Terminus zeigte sich daraufhin, dass diese zwar meist mit PBP1 kolokalisierten, allerdings wurde die Bildung dieser kolokalysierenden Foki durch Hitze- oder NaN_3 -Stress nicht verstärkt. Gleichzeitig führte die Stressbehandlung jedoch zu r Zunahme von PBP1-GFP-Foki, die nicht mit dem C-Terminus kolokalysiert waren, wobei dieser Effekt durch CHX-Behandlung inhibiert werden konnte. Andererseits hatte CHX wiederum keinen Einfluss auf die Entstehung der mit dem C-Terminus kolokalysierenden PBP1-Foki. Diese Beobachtungen lassen somit den Schluss zu, dass erstens die nicht mit den C-Terminus-Foki kolokalysierenden PBP1-Foki tatsächlich Hefe-SG waren, und dass zweitens die C-Terminus-Foki sowie die damit kolokalysierenden PBP1-Foki keine SG darstellten, da diese stressunabhängig und CHX-resistent waren. Ein weiteres Indiz für diese Annahme ist zudem, dass die Ataxin-2-C-Terminus Foki in diesen und allen anderen diesbezüglich hier durchgeführten Experimenten meist größer waren als die im PBP1-GFP-Stamm ohne Spaltproduktexpression (s. o.) detektierten SG.

Zusätzlich sprechen weiterhin Ergebnisse aus mikroskopischen Untersuchungen der C-Terminus-Fokibildung in einem DHH1-GFP-Stamm für diese Schlussfolgerung, die parallel zu den Experimenten im PBP1-GFP-Stamm durchgeführt wurden (s. Abs. 4.1.4.). Auch in diesem Stamm konnte nämlich zum einen festgestellt werden, dass die Menge an C-Terminus-Foki, die nebenbei bemerkt oft mit DHH1-GFP kolokalysiert waren, in NaN_3 - oder hitzebehandelten gegenüber unbehandelten Proben nahezu unverändert war. Zum anderen konnte auch in diesem Fall die Bildung der Ataxin-2-C-Terminus-Foki durch CHX-Applikation nicht inhibiert werden.

Es bleibt daher festzuhalten, dass die Foki des Ataxin-2-C-Terminus vermutlich nicht infolge einer Stressreaktion auf die exogene Spaltproduktexpression entstanden sind, da ihr Fokibildungsverhalten nicht dem herkömmlicher Hefe-SG entsprach.

Die Untersuchungen zur Fokibildung des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts im PBP1-GFP-Hefestamm ließen jedoch noch mehr erkennen. So konnte hier beobachtet werden, dass die Bildung echter, d. h. stressabhängiger und CHX-sensibler Hefe-SG vorrangig in Zellen ablief, die keine C-Terminus-Fokibildung zeigten. Man kann also davon ausgehen, dass die Foki des C-terminalen Ataxin-2-Abschnitts einen inhibierenden Einfluss auf die Bildung PBP1-positiver SG in *S. cerevisiae* hatten.

Wie erwähnt wurde im Zuge dieser Analysen außerdem das N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt hinsichtlich Kolokalisation mit PBP1-GFP bzw. potentieller Effekte auf die SG-Bildung untersucht. Diesbezüglich konnte jedoch weder Kolokalisation zwischen dem N-Terminus und PBP1-GFP noch ein Effekt der Spaltproduktexpression auf die SG-Bildung festgestellt werden. Dabei fiel allerdings generell auf, dass das N-terminale Spaltprodukt in diesem Fall sehr viel häufiger Foki bildete als in den vorherigen Fokibildungs- bzw. Kolokalisationsanalysen. Dies lag sehr wahrscheinlich daran, dass die exogene Spaltproduktexpression in den SG-Bildungsanalysen anders als zuvor konstitutiv und nicht galaktose-induziert ablief. Dadurch war in diesem Fall kein Wechsel der C-Quelle auf Galaktose nötig, und die Zellen befanden sich dementsprechend während des gesamten Experiments in glucosehaltigem Medium. Daraus lässt sich schließen, dass die schwache Fokibildung des N-terminalen Spaltprodukts sowie möglicherweise auch dessen ausbleibende Zytotoxizität in den vorangegangenen Analysen vermutlich eine Folge der Verwendung von Galaktose als C-Quelle waren. Es lässt sich somit festhalten, dass das in den GFP-Markerproteinstämmen beobachtete Fokibildungsverhalten des konstitutiv exprimierten, Redstar-markierten Ataxin-2-N-Terminus (d. h. häufige Fokibildung) als dessen Standard-Fokibildungsverhalten in Hefezellen angesehen werden kann und sollte. Die Fokibildung des Ataxin-2-N-Terminus konnte allerdings wie im Fall des C-Terminus weder im PBP1- noch im DHH1-GFP-Stamm durch CHX inhibiert werden, was bedeutet, dass auch die N-Terminus-Foki keine Hefe-SG waren.

5.1.2. Mögliche Ursachen für die zytotoxische Wirkung des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts in Hefe

Die konsistentesten und auffälligsten Ergebnisse o. g. Experimente in *S. cerevisiae* waren also zum einen die hohe Zytotoxizität des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts und zum anderen dessen starke Neigung zur Fokibildung. Daraus entstand die Hypothese, dass die Foki des Ataxin-2-C-Terminus dessen zytotoxische Effekte vermittelt haben könnten.

Dafür sprechen auch Ergebnisse hier ebenfalls durchgeführter Untersuchungen in Hefe-Deletionsstämmen. Dabei hatte sich nämlich gezeigt, dass die Gendelektionen der Deadenylasekomplex-Komponenten POP2 und CCR4 die toxischen Auswirkungen der Ataxin-2-C-Terminus-Expression verstärkten. Zusätzlich ergab eine quantitative, mikroskopische C-Terminus-Fokibildungsanalyse in den Deletionsstämmen Δ POP2 und Δ CCR4, dass in beiden Stämme signifikant mehr C-Terminus-Foki gebildet wurden als im WT-Stamm. Dies ließ vermuten, dass die gegenüber dem WT-Stamm erhöhte Fokibildung des Ataxin-2-C-Terminus in den Deletionsstämmen ursächlich für den beobachteten, verstärkenden Einfluss der POP2- oder der CCR4-Deletion auf die C-Terminus-Zytotoxizität war.

In diesem Zusammenhang bestand allerdings ferner die Möglichkeit, dass eine gegenüber dem WT-Stamm veränderte PB- oder SG-Bildung in den Deletionsstämmen ebenfalls Einfluss auf die zytotoxische Wirkung des Ataxin-2-C-Terminus gehabt haben könnte. Es war nämlich bereits bekannt, dass sowohl POP2 als auch CCR4 Komponenten von Hefe-PB sind, so dass durchaus denkbar war, dass sich deren Deletion auf die Assemblierung von PB oder SG auswirken könnte.¹⁷⁹

Deshalb wurde in weiteren quantitativen Analysen auch die PB- und SG-Bildung in den Deletionsstämmen im Vergleich zum WT-Stamm untersucht. Dabei konnte allerdings weder in unbehandelten noch in NaN_3 - oder hitzebehandelten Zellen ein Einfluss der Deletionen auf die PB-Bildung festgestellt werden, was anhand des sehr spezifischen PB-Markers EDC3 beurteilt wurde. Analog dazu zeigten SG-Bildungsanalysen unter Nutzung des spezifischen SG-Markers PUB1 ebenfalls keine deletionsabhängigen Einflüsse auf die SG-Assemblierung unter Standard- oder Stressbedingungen (NaN_3 , Hitze). Somit konnte ein potentieller Effekt einer durch POP2- oder CCR4-Deletion verursachten, anormalen PB- oder SG-Bildung als Ursache für die o. g. deletionsabhängige Verstärkung der Zytotoxizität des Ataxin-2-C-Terminus ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang mit denen einer früheren Studie, in der u. a. auch der Einfluss der POP2- und CCR4-Deletionen auf die PB-Bildung untersucht wurde. Dort hatte sich nämlich ebenfalls gezeigt, dass der Funktionsverlust von POP2 oder CCR4 die PB-Assemblierung nicht bzw. nur minimal beeinflusste.¹⁷⁹ Dadurch wird jedoch außerdem o. g. Vermutung unterstützt, nach der die Foki des Ataxin-2-C-Terminus dessen zytotoxische Effekte in Hefezellen vermittelt haben könnten.

Auf welche Art dies genau geschehen sein könnte ist jedoch nicht bekannt. Allerdings geben einige der hier durchgeführten Analysen Grund zu der Annahme, dass die C-Terminus-Foki möglicherweise via eines prionähnlichen Mechanismus zytotoxisch in den Hefezellen gewirkt haben könnten.

Ein erster Hinweis darauf stammte dabei aus Untersuchungen zu modifizierenden Effekten der POP2- bzw. CCR4-Deletion auf Toxizität und Aggregationsverhalten von TDP-43 in einem humanisierten *S. cerevisiae*-Modell. Diese ergaben nämlich zum einen, dass die zytotoxische Wirkung von TDP-43 ähnlich der von exogen exprimiertem Ataxin-2-C-Terminus durch beide Gendelektionen gesteigert werden konnte. Zum anderen zeigte sie jedoch zusätzlich, dass auch die Fokibildung von TDP-43-GFP in den Deletionsstämmen Δ POP2 und

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weitere paarweise, lokale Sequenzalignments vorgenommen, bei denen der Ataxin-2-C-Terminus mit anderen bekannten prionartigen Proteinen verglichen wurde. Dabei wurden zum einen Sequenzen von Krankheitsproteinen mit prionartigen Domänen (EWSR1, FUS/TLS, hnRNPA1 und das Prion-Protein) und zum anderen die zweier SG-Proteine (TIA-1, TIAR) mit der C-Terminus-Sequenz aligniert.¹⁸¹ So sollte geprüft werden, ob der C-terminale Ataxin-2-Abschnitt auch Sequenzen aufweist, die den prionartigen Domänen dieser Proteine ähneln.

Dabei konnte festgestellt werden, dass die Sequenz des Ataxin-2-C-Terminus auch in allen o. g. Fällen besonders gut mit Bereichen der prionartigen Domänen der untersuchten Krankheits- bzw. SG-Proteine übereinstimmte (s. Abb. 5.1A & B). Dabei war insbesondere der dem TIA-1-Protein ähnliche Bereich des Ataxin-2-C-Terminus sehr weit ausgedehnt und deckte fast das komplette TIA-1-Protein ab. Dem gegenüber waren die Ähnlichkeiten zum Prion-Protein und zum hnRNPA1-Protein auf relativ kurze Sequenzabschnitte beschränkt. Gleichwohl war die Übereinstimmung der Sequenzen mit dem Ataxin-2-C-Terminus speziell im Fall der Krankheitsproteine FUS/TLS und EWSR1 besonders weitreichend und zudem auch relativ genau. So konnte im Fall des FUS-Proteins eine Identität zur C-Terminus-Sequenz von 23,8 % und für das EWSR1-Protein ein entsprechender Wert von 25,6 % ermittelt werden (s. Anhang 2).

Diese Analysen zeigten also, dass verschiedene Bereiche der Ataxin-2-C-Terminus-Sequenz besonders gut mit Teilabschnitten prionartiger Domänen unterschiedlicher prionähnlicher Proteine übereinstimmen. Um ferner jedoch auch Aussagen über die Signifikanz der beobachteten Sequenzähnlichkeit zwischen TDP-43 und dem Ataxin-2-C-Terminus machen zu können, wurde ein weiteres lokales Sequenzalignment mit Hilfe der LALIGN-Anwendung durchgeführt. Diese basiert auf einem Algorithmus von Huang und Miller und berechnet lokale nicht überlappende Alignments, wobei auch Zufallswahrscheinlichkeiten für die alignierten Sequenzabschnitte ausgegeben werden.^{279,280}

Bei diesen Analysen konnte festgestellt werden, dass ein 85 Aminosäuren umfassender Sequenzbereich des Ataxin-2-C-Terminus 70 % Ähnlichkeit zu einem nahezu gleich langen Abschnitt der TDP-43-Sequenz aufwies (s. Abb. 5.1A roter Rahmen & C). Dabei betrug die Zufallswahrscheinlichkeit für dieses Alignment $p \approx 0,02$, so dass die Sequenzähnlichkeit als signifikant angesehen werden kann (s. Anhang 2). Diesbezüglich entsprachen die mit LALIGN alignierten Sequenzabschnitte zudem Teilbereichen der bereits mit der WATER-Anwendung (s. o.) als ähnlich erkannten Sequenzen von TDP-43 und dem Ataxin-2-C-Terminus. Das bedeutet auch in diesem Fall betraf die Sequenzähnlichkeit besonders einen Großteil der prionartige Domäne des TDP-43.

Insgesamt sprachen die hier beschriebenen Sequenzalignments somit dafür, dass der Ataxin-2-C-Terminus ähnlich dem TDP-43-Protein prionartigen Charakter haben könnte. Demzufolge könnte er also seine Zytotoxizität in *S. cerevisiae* über die Bildung prionartiger Akkumulationen vermittelt haben, die in diesem Fall den beobachteten C-Terminus-Foki entsprechen würden.

Diesbezüglich sind ferner auch o. g. Mikroskopie-Analysen (s. v. Abs.) interessant, die zeigten, dass die Ataxin-2-C-Terminus-Foki zwar mit PBP1-GFP kolokalisierten gleichzeitig aber keine Hefe-SG darstellten, und dass ihr Vorhandensein zudem die SG-Bildung störte. Diese Ergebnisse ließen nämlich darauf schließen, dass die C-Terminus-Foki in diesem Fall PBP1-GFP sequestriert und auf diese Weise die SG-Bildung inhibiert haben könnten. Dies ist hier deshalb interessant, da kürzlich postuliert wurde, dass intrinsisch ungeordnete Proteine wie z. B. prionogene Proteine toxische Effekte vermutlich hauptsächlich durch Retention diverser Faktoren in von ihnen gebildeten Proteinakkumulationen vermitteln.³¹⁴ Nimmt man also vernünftigerweise an, dass das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt seinen inhibitorischen Einfluss auf die SG-Bildung tatsächlich via PBP1-

Sequestrierung ausgeübt hat, wäre dies wiederum ein weiteres Indiz dafür, dass das C-terminale Spaltprodukt einen prionartigen Charakter besitzt.

In diesem Zusammenhang könnten darüber hinaus zudem Ergebnisse aus Untersuchungen zu toxischen Effekten des Hefe-Prion-Proteins RNQ1 in *S. cerevisiae* bedeutsam sein. Bei diesen konnte nämlich festgestellt werden, dass SPC42 in RNQ1-positiven, unlöslichen Proteinablagerungen sequestriert wird, was die Spindelbildung und die Zellteilung kompromittierte und dadurch zytotoxisch wirkte. Dieser Effekt konnte zudem durch Überexpression von SPC42 gemildert werden, was für seine Spezifität spricht.³¹⁵ Da nun in o. g. Mikroskopie-Studien wie erwähnt gezeigt werden konnte, dass die Ataxin-2-C-Terminus-Foki mit SPC42 kolokalisieren (s. Abs. 5.1.1.1.) könnte somit, vorausgesetzt der C-Terminus bildet tatsächlich prionartige Akkumulationen, ein ähnlicher SPC42-Sequestrierungsmechanismus zur toxischen Wirkung dieses Spaltprodukts beigetragen haben. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass wahrscheinlich insbesondere die effiziente Fokibildung des Ataxin-2-C-Terminus zu dessen starker zytotoxischer Wirkung in Hefezellen geführt haben könnte. Diesbezüglich sprechen die o. g. Ergebnisse außerdem dafür, dass die C-Terminus-Foki möglicherweise prionartigen Akkumulationen ähneln und ihre zytotoxischen Effekte dementsprechend analog zu prionartigen Proteinen (v. a. TDP-43) vermittelt haben könnten.

Ferner hatte sich bei den Untersuchungen in *S. cerevisiae* zudem herausgestellt, dass grundsätzlich beide Spaltprodukte zytoplasmatische Foki bilden können. Deshalb wurden die Spaltprodukte zusätzlich in HeLa-Zellen analysiert, um mehr über ihre Lokalisation und Fokibildung in einem humanen Zellsystem zu erfahren.

5.2. Studien zur subzellulären Lokalisation und zur Fokibildung zweier physiologischer Ataxin-2-Spaltprodukte in humanen Zellen

Wie beschrieben zeigte insbesondere das C-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt im Hefemodell deutliche toxische Effekte, eine hohe Fokibildungsneigung sowie Kolokalisation mit diversen Hefeproteinen, von denen viele auch humane Orthologe besitzen. Dem gegenüber war die Fokibildung des N-terminalen Spaltprodukts in Hefe offenbar abhängig von den experimentellen Bedingungen, so dass lediglich glucosereguliert exprimierter N-Terminus Foki bildete. Dennoch konnte somit demonstriert werden, dass beide Spaltprodukte in *S. cerevisiae* grundsätzlich zur Fokibildung fähig sind.

Aus diesem Grund wurden zusätzlich IF-Mikroskopiestudien in HeLa-Zellen unternommen, in denen überexprimierte, Myc-markierte Ataxin-2-Spaltprodukte hinsichtlich ihrer Fokibildung und Kolokalisation mit subzellulären Markern untersucht wurden.

5.2.1. Der Ataxin-2-C-Terminus bildet verschiedene Arten zytoplasmatischer Foki in HeLa-Zellen

Im Hinblick auf die Fokibildung des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts fiel zunächst besonders auf, dass dieses zwei morphologisch sehr unterschiedliche Arten zytoplasmatischer Fluoreszenzfoki in HeLa-Zellen bildete. So zeigte es einerseits in einem durch Arsenit-Stress erhöhbareren Anteil transfizierter Zellen relativ kleine, isometrische Foki die zudem mit TIAR kolokalisierten, was insgesamt dafür spricht, dass es sich dabei um SG gehandelt hat. In diesen Fällen entsprach die Fokibildung des C-Terminus somit der von vollständigem

Ataxin-2, welches bereits in früheren Studien sowie in den hier durchgeführten Untersuchungen als SG-Bestandteil in humanen Zellen identifiziert werden konnte (s. Abb. 4.13.).^{60,65,262}

Andererseits wurden jedoch ebenso filamentöse C-Terminus-Strukturen in einem von Stress unbeeinflussten Anteil der Spaltprodukt überexprimierenden HeLa-Zellen ($\approx 25\%$) detektiert, deren Existenz zudem mit ausbleibender SG-Assemblierung in den betroffenen Zellen assoziiert war. Die Filamentbildung war dabei ferner eine exklusive Eigenschaft des C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts, wodurch dieses sich sowohl von vollständigem Ataxin-2 als auch vom physiologischen Ataxin-2-N-Terminus unterschied.

Allerdings ähnelten die filamentösen C-Terminus-Foki aufgrund dieser Eigenschaften umso mehr jenen C-Terminus-Foki, die im *S. cerevisiae*-Modell beobachtet worden waren, da auch deren Bildung stressunabhängig war und zudem die Hefe-SG-Assemblierung störte (s. Abb. 4.8B). Diesbezüglich war außerdem interessant, dass in Kolokalisationsanalysen mit Markerproteinen subzellulärer Kompartimente eine Assoziation der C-Terminus-Filamente mit dem Mikrotubuli-Marker β -Tubulin in HeLa-Zellen erkannt werden konnte (s. Abb. 4.11). Diese Beobachtung stellte nämlich in gewisser Weise ebenfalls eine Parallele zu o. g. Ergebnissen der Untersuchungen zur subzellulären C-Terminus-Lokalisation in Hefe dar. Diese Aussage bezieht sich dabei auf die in Hefezellen festgestellte Kolokalisation der C-Terminus-Foki mit SPC42, das eine zentrale Komponente hefespezifischer Spindelpolkörper ist, die ihrerseits als die einzigen Mikrotubuli-Organisationszentren von Hefezellen gelten. Demzufolge kolokalisierten also sowohl die Filamente des Ataxin-2-C-Terminus in humanen Zellen als auch die in *S. cerevisiae* beobachteten C-Terminus-Foki mit Komponenten des Mikrotubuli-Netzwerks. Zusammengefasst lässt sich somit sagen, dass von den beiden Arten morphologisch unterscheidbarer Ataxin-2-C-Terminus-Foki, die in den HeLa-Zellen gebildet worden waren insbesondere die filamentösen Foki den in Hefezellen beobachteten C-Terminus-Foki relativ ähnlich waren.

Dies könnte zudem bedeuten, dass, sollte o. g. Hypothese zutreffen nach der v. a. die Foki des Ataxin-2-C-Terminus dessen Zytotoxizität in Hefezellen vermittelt haben könnten, auch die C-Terminus-Filamente in humanen Zellen ähnlich zellschädigend wirken könnten. Für eine derartige Wirkung der C-Terminus-Filamente spricht jedenfalls, dass deren Bildung in nahezu allen Fällen mit apoptotischen Zellveränderungen einherging.

So zeigten filamentbildende Zellen zum einen Anzeichen für Chromatinkondensation und in einigen Fällen zudem fragmentierte Nuklei. Zum anderen waren ihre Zellkörper oft arm an Filopodien und im Vergleich zu untransfizierten Zellen abgerundeter, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass diese Zellen apoptotisch waren. Dabei schien die Filamentisierung zudem ursächlich für die Apoptose oder zumindest ein sehr frühes apoptotisches Ereignis gewesen zu sein, was daraus geschlossen werden konnte, dass in einer äußerst geringen Anzahl filamentbildender Zellen keine bzw. noch keine der o. g. apoptotischen Merkmale festgestellt werden konnten. Insgesamt liegt daher die Vermutung nah, dass die Bildung der filamentösen Ataxin-2-C-Terminus-Strukturen in HeLa-Zellen pro-apoptotisch gewirkt haben könnte. Eine eingehende Charakterisierung der C-Terminus-Filamente wäre somit, besonders im Hinblick auf die o. g. Ähnlichkeiten zwischen ihnen und den C-Terminus-Foki in Hefezellen, vermutlich ein sehr vielversprechender Ansatz für zukünftige Experimente.

Es sei jedoch an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass der Ataxin-2-C-Terminus lediglich in etwa einem Viertel der überexprimierenden Zellen filamentöse Strukturen bildete. Die Filamentbildung war demzufolge nicht allein von der Spaltprodukt-Überexpression abhängig, was darauf hindeutet, dass sie von weiteren unbekanntem Faktoren beeinflusst wurde. Somit könnte auch deren Identifizierung ein sinnvolles Ziel für nachfolgende Untersuchungen bezüglich des physiologischen C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts sein.

Abgesehen von den grade beschriebenen Ergebnissen der IF-Mikroskopiestudien, die v. a. mit der Fokibildung des Ataxin-2-C-Terminus in Verbindung standen, konnte dabei jedoch noch eine weitere, von der Fokibildung unabhängige Beobachtung gemacht werden. Diesbezüglich hatte sich nämlich gezeigt, dass die bloße Überexpression des Ataxin-2-C-Terminus in den HeLa-Zellen zur Inhibition der Bildung von sowohl DDX6- als auch DCP1-positiven PB führte. Darin entsprach das Verhalten des Spaltprodukts somit dem von vollständigem Ataxin-2, das bei Überexpression ebenfalls die PB-Bildung inhibiert, wie eine frühere Studie bereits gezeigt hatte.⁶⁵

Insgesamt bleibt somit festzuhalten, dass sich überexprimierter Ataxin-2-C-Terminus in HeLa-Zellen häufig wie vollständiges Ataxin-2 verhielt, indem er z. B. mit TIAR-positiven SG kolokalisierte oder die PB-Bildung störte. Er war allerdings zudem in der Lage aufgrund noch unbekannter auslösender Faktoren in einigen Zellen filamentartige Strukturen auszubilden, die im Fall des vollständigen Proteins sowie des N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts nicht beobachtet wurden. Diese Filamente kolokalisierten dabei mit β -Tubulin und TIAR, verhinderten die SG-Bildung und waren zudem sehr häufig mit apoptotischen Zellveränderungen assoziiert, weshalb man annehmen kann, dass sie möglicherweise zellschädigende Effekte haben könnten.

5.2.2. Das N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt zeigte nukleäre Lokalisation und bildete zytoplasmatische Foki in HeLa-Zellen

Hinsichtlich der Lokalisationsanalysen des N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts war v. a. ein Ergebnis besonders bemerkenswert. Dies war die Beobachtung, dass der physiologische Ataxin-2-N-Terminus nicht nur zytoplasmatisch sondern zudem auch nukleär lokalisiert war, was auf einen für dieses Spaltprodukt spezifischen Kernimportmechanismus hinweist.

Dieser Befund war zunächst überraschend, da er in Kontrast zu Ergebnissen einer früheren IF-Mikroskopiestudie in der Säugerzelllinie COS-1 stand, bei der ebenfalls die Lokalisation des physiologischen Ataxin-2-N-Terminus untersucht wurde. Dort konnte nämlich weder für eine auf 58 Q-Repeats expandierte noch für eine nicht expandierte Variante des N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts nukleäre Lokalisation festgestellt werden.¹²¹ Zusätzlich wurde bisher in keiner Studie, in der funktionelle Ataxin-2-Domänen oder Sequenzmotive analysiert wurden, ein konventionelles nukleäres Lokalisationsignal (NLS), d. h. eine Kernimport-Erkennungssequenz im Ataxin-2 identifiziert.^{53,55,59,86,316}

Diesbezüglich gibt es jedoch einige Untersuchungen, die zumindest für eine prinzipiell mögliche Kernlokalisierung von vollständigem Ataxin-2 oder dessen N-Terminus sprechen. So konnte Ataxin-2 zum Beispiel bereits als transkriptioneller Koregulator von ZBRK1 identifiziert werden, und ließ sich ferner mit diesem aus nukleären HeLa-Zellextrakten ko-immunopräzipitieren. Zusätzlich wurde dabei auch mikroskopisch eine nukleäre Kolokalisation beider Proteine in humanen Osteosarkom- und HeLa-Zellen festgestellt.³¹⁷ Weitere Untersuchungen zeigten zudem, dass Ataxin-2 sowie sein PolyQ-tragender N-terminaler Proteinbereich in PC12-Zellen ebenfalls teilweise nukleär lokalisiert sein können, und dass dort außerdem ein Transport des Ataxin-2-N-Terminus in den Nukleus stattfindet.³¹⁸ Darüber hinaus konnte in *D. melanogaster* demonstriert werden, dass dAtx2 die Toxizität von pathogenem humanem Ataxin-1 beeinflusst, was dabei zudem von einer Relokalisation des Ataxin-2-Homologs in den Nukleus abhing.³¹⁹ Schließlich wiesen außerdem mikroskopische Untersuchungen von SCA2-Patientengewebe darauf hin, dass Ataxin-2 auch dort in einigen Zelltypen nukleär lokalisiert sein kann.¹⁰⁸

Da allerdings wie erwähnt im Ataxin-2 bislang keine konventionelle NLS-Sequenz identifiziert wurde, war unklar wie genau die N-terminalen Spaltprodukte in den Nukleus gelangt sein könnten. Dazu sei jedoch gesagt, dass das Vorhandensein eines NLS im Ataxin-2 seit der Veröffentlichung o. g. diesbezüglicher Studien nicht erneut evaluiert wurde, trotz dem währenddessen viele neue und optimierte, bioinformatische Anwendungen entwickelt wurden um NLS-Sequenzen vorauszusagen. Dies wurde deshalb hier nachgeholt, um mehr Klarheit über die Existenz von Kernimportsequenzen im Ataxin-2-Protein zu erhalten.

5.2.2.1. Identifikation einer unkonventionellen Kernimportsequenz im N-terminalen Ataxin-2-Abschnitt mittels eines NLS-Prognose-Werkzeugs

Zur Untersuchung der Ataxin-2-Proteinsequenz hinsichtlich möglicherweise noch unentdeckter, unkonventioneller NLS-Motive (s. v. Abs.), wurde hier das internetbasierte NLS-Prognose-Werkzeug NLStradamus genutzt. Dieses verwendet zur NLS-Voraussage ein Hidden-Markov-Modell, das grundsätzlich von zwei unterschiedlichen Sequenzmotiv-Zuständen ausgeht, d. h. einem basalen und einem NLS-artigen. Dabei ist letzterer v. a. durch einen hohen Lysin- und Asparagin-Anteil gekennzeichnet, einer Eigenschaft, die viele bekannte NLS-Motive gemeinsam haben, und die hier zur Bestimmung des NLS-Charakters der untersuchten Sequenzen diente. Außerdem sorgt die Einbeziehung eines variablen Grenzwertes in NLStradamus für ein Optimum an echt-positiven Ergebnissen, was in initialen NLS-Prognose-Studien bezüglich bekannter NLS-Sequenzen demonstriert worden war. Insgesamt war NLStradamus damit zur Prognose neuartiger NLS-Motive v. a. aufgrund seiner konsensussequenz-unabhängigen Grundlage anderen Anwendungen wie z. B. PSORT vorzuziehen.²⁷⁸

Die grafische Darstellung der Ergebnisse der NLStradamus-Prognose ist in Abb. 5.2. zu sehen, und man kann dort gut erkennen, dass insgesamt drei Ataxin-2-Sequenzmotive mit relativ großer Wahrscheinlichkeit als NLS fungieren könnten. Dies waren zum einen ein distal N-terminal gelegenes Motiv (AS: 29 – 45), das im Folgenden als preNLS1 (von engl. *predicted* NLS1) bezeichnet wird, sowie zwei zentral gelegene Sequenzmotive, die preNLS2 (AS: 583 – 598) und preNLS3 (AS: 621 – 632) genannt wurden. Dabei lagen die berechneten NLS-Wahrscheinlichkeiten von preNLS2 und preNLS3 allerdings nur leicht über dem gewählten Grenzwert von 0,6. Wohingegen die NLS-Wahrscheinlichkeit von preNLS1 relativ hoch war und maximal einen Wert von ca. 0,8 erreichte. Zudem befanden sich preNLS2 und preNLS3 im Bereich des hier auch untersuchten physiologischen Ataxin-2-C-Terminus, der in o. g. Experimenten nicht im Nukleus detektiert werden konnte (s. Abs. 4.2). Somit war davon auszugehen, dass diese Sequenzen *in vivo* nicht als NLS-Motive funktionell sind.

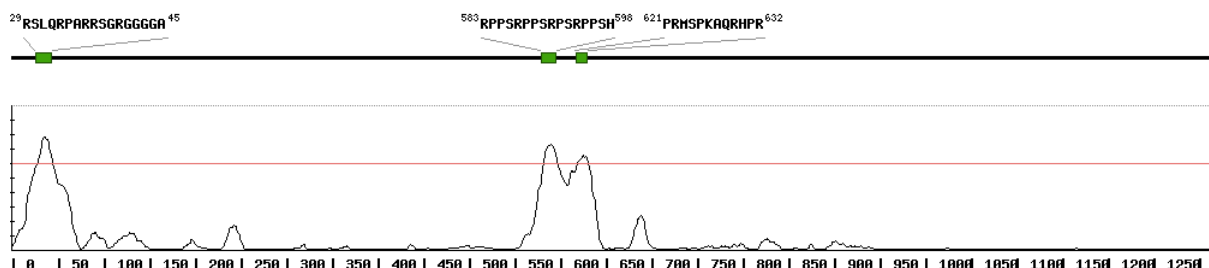


Abb. 5.2 Prognose mutmaßlicher Kernimportsequenzmotive im Ataxin-2 mit Hilfe der NLStradamus-Anwendung. Die Berechnungen beruhen auf einem statischen Zwei-Zustands-Hidden-Markov-Modell, wobei entsprechend der Software-Entwickler-Empfehlung zur Ergebnisoptimierung ein Prognosewahrscheinlichkeits-Grenzwert von 0,6 genutzt wurde (s. rote Linie). (Ordinate: Wahrscheinlichkeitswerte (eine Skaleneinheit entspricht 0,1); Abszisse: Aminosäure-Sequenzposition)

Demgegenüber war die hohe NLS-Wahrscheinlichkeit von preNLS1, die innerhalb der Sequenz des N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts lag, ein Indiz dafür, dass diese tatsächlich als NLS fungieren und als solche einen N-Terminus-Kernimport vermittelt haben könnte. Dies wäre damit eine plausible Erklärung für die beobachtete, nukleäre Lokalisation des physiologischen Ataxin-2-N-Terminus in o. g. Mikroskopieanalysen (s. Abs. 4.2).

Insgesamt lässt sich also festhalten, dass N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukte und möglicherweise auch vollständiges Ataxin-2 prinzipiell über die hier entdeckte preNLS1 durchaus in den Nukleus transportiert werden könnten. Außerdem wäre diesbezüglich denkbar, dass das preNLS1-Motiv im vollständigen Ataxin-2 sterisch blockiert sein und erst durch caspasevermittelte Spaltung zugänglich werden könnte. Dies würde auch erklären, warum nur der N-Terminus jedoch nicht vollständiges Ataxin-2 in o. g. Untersuchungen nukleär lokalisiert war (s. Abs. 4.2). Es sei jedoch betont, dass diese Hypothesen darauf basieren, dass preNLS1 *in vivo* tatsächlich als NLS-Motiv funktionell ist, was zunächst nachgewiesen werden müsste und sollte.

Der Grund für die festgestellte Relokalisation N-terminaler Ataxin-2-Spaltprodukte in den Nukleus, ist allerdings derzeit noch unklar. Er könnte jedoch möglicherweise im Schutz der Zelle vor potentiell zellschädigenden Einflüssen einer hypothetischen caspase-abhängigen Ataxin-2-Spaltung liegen. Es konnte nämlich bereits für einige andere PolyQ-Proteine gezeigt werden, dass diese mit Proteinen des Ubiquitin-Proteasom-Systems im Nukleus kolokalisieren und dort zudem auch proteasomal abgebaut werden, was entsprechend die zellschädigenden Effekte der PolyQ-Proteine reduziert. Dagegen, dass dies für nukleären Ataxin-2-N-Terminus zutrifft, spricht allerdings, dass in diesen Fällen mikroskopisch sichtbare nukleäre Foki detektiert wurden, in denen der proteasomale PolyQ-Protein-Abbau mutmaßlich stattfand.²²⁸ Eine Beobachtung die hier im Fall von nukleär lokalisiertem Ataxin-2-N-Terminus nicht gemacht werden konnte.

Unabhängig davon ob N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukte im Nukleus abgebaut werden oder nicht, könnte jedoch deren Kernimport, allein durch Minimierung der zytoplasmatischen N-Terminus-Konzentration, zellschützend wirken. Die hier durchgeführten Analysen zeigten nämlich, dass ausschließlich zytoplasmatisch lokalisierter N-Terminus Foki bildete und zelluläre Prozesse beeinflusste, was dafür spricht, dass mutmaßliche, zellschädigende Einflüsse hauptsächlich von zytoplasmatisch lokalisiertem N-Terminus vermittelt werden könnten. Eine Hypothese die auch von weiteren Ergebnissen der Mikroskopie-Analysen zur Lokalisation und Fokibildung des physiologischen Ataxin-2-N-Terminus unterstützt wird, die im Folgenden erörtert werden.

5.2.2.2. Eine SCA2-pathogene PolyQ-Domänen-Expansion des Ataxin-2-N-Terminus beeinflusste dessen nukleo-zytoplasmatische Verteilung und dessen Fokibildung

Um bei den Mikroskopie-Untersuchungen der Ataxin-2-Spaltprodukte auch potentiell für die SCA2-Pathogenese relevante Effekte der Spaltproduktexpression zu erforschen, wurde in diesen, neben dem herkömmlichen Ataxin-2-N-Terminus, eine weitere expandierte N-Terminus-Isoform untersucht. Letztere trug dabei eine SCA2-pathogene Mutation in der PolyQ-Domäne, die damit auf eine Gesamtlänge von 79 CAG- bzw. Q-Repeats expandiert war, und es stellte sich heraus, dass diese sich in mehreren Eigenschaften deutlich vom nicht expandierten N-Terminus (22 Q-Repeats) unterschied.

Diesbezüglich zeigte z. B. bereits der Vergleich beider N-Terminus-Isoformen hinsichtlich ihrer subzellulären Verteilung, dass diese durch Expansion der PolyQ-Domäne beeinflusst wurde. So war der expandierte Ataxin-2-N-Terminus im Vergleich zur nicht expandierten Isoform häufiger ausschließlich zytoplasmatisch in den HeLa-Zellen lokalisiert. Ferner zeigte sich diesbezüglich, dass zudem der Anteil an Zellen mit exklusiv nukleär

lokalisiertem Ataxin-2-N-Terminus im Fall der expandierten Isoform kleiner war als im Fall der nicht expandierten Isoform. Zusammengefasst bedeutet das, dass die SCA2-pathogene PolyQ-Expansion im Ataxin-2-N-Terminus dessen nukleo-zytoplasmatisches Verteilungsverhältnis veränderte, wobei sie eine zytoplasmatische Lokalisation des Spaltprodukts begünstigte. Man könnte diesbezüglich auch sagen, die expandierte N-Terminus-Isoform mit 79 Q-Repeats tendierte eher zu zytoplasmatischer Lokalisation als dessen herkömmliche Variante mit 22 Q-Repeats in der PolyQ-Domäne.

Ein möglicher Grund für dieses unterschiedliche Lokalisationsverhalten könnte dabei zum Beispiel eine durch die PolyQ-Expansion des N-Terminus vermittelte Störung seines Kernimports gewesen sein, wofür möglicherweise auch das o. g. preNLS1-Sequenzmotiv, falls funktionell, wichtig sein könnte. Es müssten jedoch zunächst weitere Untersuchungen folgen, um genaueres über die Ursachen der Unterschiede in der nukleo-zytoplasmatischen Verteilung beider Ataxin-2-N-Terminus-Varianten sagen zu können. Dabei erscheint die Aufklärung dieser Zusammenhänge v. a. deshalb sinnvoll, da i167n den hier durchgeführten mikroskopischen Analysen auch festgestellt wurde, dass bestimmte Prozesse (s.u.) in HeLa-Zellen zwar von zytoplasmatisch nicht jedoch von nukleär lokalisiertem Ataxin-2-N-Terminus beeinflusst werden. So konnte diesbezüglich zum Beispiel festgestellt werden, dass die exogene N-Terminus-Expression in HeLa-Zellen eine Störung der Bildung arsenitinduzierter SG hervorrief. Dies zeigte sich darin, dass betroffene Zellen verglichen mit Kontrollzellen weniger TIAR-positive SG gebildet hatten, und das diese darüber hinaus ungewöhnlich klein waren. Der Effekt war dabei jedoch lediglich auf Zellen beschränkt, die zytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus aufwiesen, wohingegen die SG-Bildung in Zellen mit ausschließlich nukleär lokalisiertem N-Terminus der von untransfizierten Kontrollzellen entsprach.

Analog dazu war außerdem ein weiterer in o. g. Experimenten beobachteter zellulärer Effekt der Ataxin-2-N-Terminus-Expression von der subzellulären Spaltproduktlokalisierung abhängig. Dabei handelte es sich um eine Abschwächung des nukleären TDP-43-Fluoreszenzsignals, die ebenfalls ausschließlich in Zellen mit zytoplasmatisch lokalisiertem N-Terminus erkennbar war. Demgegenüber konnte in Zellen mit exklusiv nukleär lokalisiertem N-Terminus keine Änderung der TDP-43-Kernfluoreszenzintensität verglichen mit der nicht transfizierten Kontrollzellen festgestellt werden. Darüber hinaus war die Schwächung der TDP-43-Kernfluoreszenz in Zellen die ausschließlich zytoplasmatisch lokalisierten Ataxin-2-N-Terminus enthielten zusätzlich gegenüber Zellen erhöht die sowohl nukleären als auch zytoplasmatischen N-Terminus aufwiesen. Es sei hier jedoch betont, dass in Zellen mit reduziertem nukleären TDP-43-Signal diese Reduktion nicht mit einer Erhöhung der zytoplasmatischen TDP-43-Fluoreszenz einherging. Es gab demnach keinen Hinweis auf eine TDP-43-Misslokalisierung ins Zytoplasma, welche derzeit als Pathomechanismus für TDP-43-Proteinopathien diskutiert wird.^{153,320,321}

Insgesamt lässt sich also festhalten, dass die exogene Expression des N-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts in HeLa-Zellen erstens deren SG-Bildung störte und zweitens deren nukleäre TDP-43-Mengen herabregulierte, wofür in beiden Fällen zytoplasmatische Lokalisation des N-Terminus erforderlich war. Das bedeutete somit, dass diese Effekte indirekt auch durch o. g. PolyQ-Expansion des Ataxin-2-N-Terminus verstärkt wurden, da diese wie erwähnt die Neigung des N-Terminus erhöhte zytoplasmatisch zu lokalisieren.

Die PolyQ-Expansion des Ataxin-2-N-Terminus zeigte in o. g. Experimenten jedoch neben ihrem Einfluss auf dessen subzelluläre Verteilung noch einen weiteren Effekt, der dessen Fokibildung betraf. So konnte diesbezüglich eine durch die Expansionsmutation ausgelöste Verdopplung des Anteils fokibildender Zellen an der Gesamtmenge der N-Terminus exprimierenden Zellen festgestellt werden. Dies bezieht sich dabei auf die

Bildung relativ großer, amorpher und häufig perinukleär lokalisierter N-Terminus-Foki, die im Fall der auf 79 Q-Repeats expandierten Isoform in etwa zwei Drittel der exprimierenden Zellen beobachtet werden konnte. Die Fokibildungsneigung dieser Isoform übertraf damit zudem jene des vollständigen Ataxin-2-Proteins mit oder ohne PolyQ-Expansion, womit der expandierte Ataxin-2-N-Terminus insgesamt die am stärksten zur Fokibildung neigende unter den hier untersuchten Ataxin-2-Isoformen war.

Zusammengefasst führte die Expansion der PolyQ-Domäne des Ataxin-2-N-Terminus somit einerseits zu einem dramatischen Anstieg seiner zytoplasmatischen Fokibildung in HeLa-Zellen und andererseits zu einer Erhöhung seiner Tendenz zur zytoplasmatischen Lokalisation. Zuzüglich hatte letzterer Effekt einen indirekten fördernden Einfluss auf eine durch das N-terminale Ataxin-2-Spaltprodukt verursachte Störung der SG-Bildung sowie eine ebenfalls dadurch bedingte Reduktion der nukleären TDP-43-Proteinlevel.

Im Gegensatz dazu konnten keine derartigen Effekte beim Vergleich der zellulären Verteilung des vollständigen expandierten Ataxin-2 mit nicht expandiertem Ataxin-2 festgestellt werden. Zudem war dabei auch die Fokibildungsneigung im Fall der expandierten Isoform nur leicht erhöht gegenüber der nicht expandierten Form erhöht. Das bedeutet, dass die SCA2-pathogene Mutation in den hier durchgeführten Untersuchungen größere Auswirkungen auf das Verhalten des Ataxin-2-N-Terminus als auf das von vollständigem Ataxin-2 hatte. Es liegt daher die Vermutung nahe, falls sich o. g. Beobachtungen auch für humane Neuronen bestätigen lassen, dass die mutmaßlich caspasevermittelte Ataxin-2-Spaltung auch einen wichtigen Einfluss auf die SCA2-Pathogenese haben könnte. Dieser könnte dabei zudem über zelluläre Prozesse ablaufen, die zwar von den Ataxin-2-Spaltprodukten nicht aber von vollständigem Ataxin-2 beeinflusst werden, wie z. B. die hier festgestellte Reduktion der nukleären TDP-43-Menge.

Zusätzlich könnte diese Reduktion der TDP-43-Kernlevel durch den Ataxin-2-N-Terminus allerdings auch einen Einfluss auf die Pathogenese von TDP-43-Proteinopathien wie ALS oder FTLD haben. Unabhängig davon jedoch ob der Einfluss des Ataxin-2-N-Terminus auf TDP-43 pathogene Auswirkungen hat oder nicht, ist er letztlich ein erneuter Beweis dafür, dass Ataxin-2 und TDP-43 in Verbindung miteinander stehen, was bereits in früheren Studien erkannt worden war (s. n. Abs.). Diese Studien waren schließlich auch der Anlass dafür in dieser Arbeit auch Analysen hinsichtlich gemeinsamer, genetischer Regulatoren beider Proteine durchzuführen, was Thema des nächsten Abschnitts ist.

5.3. Identifikation zweier Komponenten des CCR4/NOT-Komplexes als gemeinsame Regulatoren von Ataxin-2 und TDP-43 in Hefe

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt konnten kürzlich bereits einige Verbindungen zwischen Ataxin-2 und dem ALS-Krankheitsprotein TDP-43 aufgedeckt werden. So wurde zum Beispiel fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen, dass TDP-43 ebenso wie Ataxin-2 eine SG-Komponente ist. Ferner konnte via RNA-Immunopräzipitation gekoppelter Tiefensequenzierung (RIP-seq) festgestellt werden, dass Ataxin-2-mRNA in kortikalen Neuronen von TDP-43 gebunden wird. Ebenfalls erwähnenswert ist diesbezüglich zudem ein kürzlich entdeckter Zusammenhang zwischen intermediär expandiertem Ataxin-2 (27 – 33 Q-Repeats) und einem gesteigerten ALS-Erkrankungsrisiko.^{60,153,190,210,211,322,323}

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde deshalb im Zuge dieser Arbeit versucht mit Hilfe des *S. cerevisiae*-Modellsystems gemeinsame Regulatoren von TDP-43 und Ataxin-2 zu identifizieren. Dazu wurden zwei Screens mit jeweils denselben 23 Hefe-Deletionsstämmen unternommen.

Der erste dieser Screens, der von Fr. C. Drescher im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt wurde, war dabei ein Screen auf synthetische Letalität, bei dem in diesem Fall geprüft wurde, ob in den einzelnen Deletionsstämmen bei exogener Expression von Ataxin-2 eine Wachstumshemmung der Hefezellen induziert wird, die im WT-Hefestamm nicht zu beobachten gewesen war.²⁸⁹ Beim zweiten Screen, der Teil der vorliegenden Arbeit war, handelte es sich hingegen um einen Toxizitätsmodifikator-Screen. Dementsprechend sollten damit optimalerweise Deletionen identifiziert werden, die einen Einfluss auf eine bereits zuvor im WT-Stamm beobachtete zytotoxische Wirkung der TDP-43-Expression haben, wobei dieser sowohl mitigierend als auch toxizitätsverstärkend sein konnte.^{265,287}

Ferner wurden für die Screens ausschließlich Deletionsstämme ausgewählt, die Deletionen einzelner Komponenten von Hefe-PB oder -SG trugen, und die zudem humane Orthologe besitzen mussten. Der Grund für diese Auswahl lag dabei v. a. in der Tatsache, dass sowohl Ataxin-2 als auch TDP-43 Bestandteile von SG sind (s. o.), und dass demzufolge insbesondere die gemeinsame Regulation beider Proteine dort stattfinden könnte, wofür naheliegenderweise v. a. SG-Komponenten in Frage kommen. Darüber hinaus war diesbezüglich zudem bekannt, dass SG und PB in Hefezellen miteinander kolokalisieren und ihre Bestandteile dynamisch miteinander austauschen können, weshalb auch Deletionsstämme mit Deletionen von PB-Komponenten untersucht wurden.^{99,183}

Die Ergebnisse der beiden Screens wurden schließlich verglichen, um auf diese Weise Gendeletionen zu identifizieren, die in den Hefezellen sowohl bei Expression von Ataxin-2 als auch TDP-43 wachstumshemmend wirken, da dies auf eine gemeinsame Regulation der Effekte beider Proteine durch das entsprechende deletierte Gen im WT-Stamm hinwies.

Letztendlich konnten auf diese Weise tatsächlich zwei Deletionen identifiziert werden, die in den Hefezellen sowohl Ataxin-2 vermittelte, synthetische Letalität hervorriefen als auch einen verstärkenden Einfluss auf die TDP-43-Toxizität hatten. Dabei handelte es sich um die Deletionen der für POP2 und CCR4 kodierenden Gene, was besonders deshalb interessant ist, da diese beiden Proteine gemeinsame Untereinheiten des zytoplasmatischen CCR4/NOT-Deadenylase-Komplexes sind.

Aus diesem Grund wurden die Effekte dieser beiden Deletionen auf das Wachstum Ataxin-2 exprimierender Hefezellen in Komplementationsanalysen näher untersucht, wodurch ihre Spezifität bestätigt werden konnte. Darüber hinaus zeigte sich diesbezüglich zudem, dass beide Deletionen auch die zytotoxischen Effekt der exogenen Expression des Ataxin-2-C-Terminus sowie dessen Fokibildung regulieren (s. Abs. 5.1.2.), was zusätzlich für die Spezifität der beobachteten Deletionseffekte hinsichtlich Ataxin-2 sprach.

Andererseits war ein Argument für die Spezifität der deletionsabhängigen Einflüsse auf die TDP-43-Toxizität die Beobachtung, dass sowohl POP2- als auch CCR4-Deletion auch fördernd auf die TDP-43-Aggregatbildung wirkten. Diese verstärkte Aggregatbildung von TDP-43 war dabei nämlich wahrscheinlich ursächlich oder zumindest mitverantwortlich für dessen deletionsabhängige Zytotoxizitätssteigerung, da den TDP-43-Aggregationen in Hefezellen bereits zytotoxische Wirkung nachgewiesen worden war.²⁶⁵

Eine mögliche Ursache für die dementsprechend in WT-Hefezellen hemmenden Einflüsse von insbesondere POP2 auf die TDP-43-Aggregatbildung könnte dabei in einer mutmaßlichen Beteiligung von POP2 an der zellulären Protein-Qualitätskontrolle liegen. Es konnte diesbezüglich nämlich bereits festgestellt werden, dass POP2 mit TCP1 (*tailless complex polypeptide 1*) interagiert, das als Chaperonin für die Kontrolle der Proteinfaltung im Zytoplasma zuständig ist. Noch wichtiger ist jedoch, dass für TCP1 bereits ein inhibierender Einfluss auf die Bildung von Htt-Aggregaten in humanen sowie neuronalen Mausezellen gezeigt werden konnte.

Die POP2-TCPI-Interaktion könnte demnach also auch für die beobachtete POP2-abhängige Regulation der TDP-43-Aggregat- oder Ataxin-2-C-Terminus-Fokibildung wichtig gewesen sein.^{324,325}

Es bleibt also festzuhalten, dass mit den Deadenylase-Untereinheiten POP2 und CCR4 zwei spezifische, gemeinsame Regulatoren von Ataxin-2 und TDP-43 im *S. cerevisiae*-Modellsystem identifiziert werden konnten. Dabei regulierten sowohl POP2 als auch CCR4 außerdem die TDP-43-Aggregation, was wahrscheinlich direkten Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von TDP-43 hatte. Denselben Einfluss hatten sie ferner auf die Fokibildung des hier untersuchten C-terminalen Ataxin-2-Spaltprodukts, wobei in diesem Fall jedoch ein Zusammenhang zu dessen zytotoxischen Wirkung nur vermutet werden kann.

Neben der gesteigerten Fokibildung hätte eine weitere potentielle Erklärung für die o. g. durch POP2- oder CCR4-Deletion ausgelösten Wachstumsstörungen von TDP-43 oder Ataxin-2 exprimierenden Hefezellen theoretisch jedoch auch eine deletionsabhängige Beeinträchtigung ihrer PB- oder SG-Bildung gewesen sein können. Dies ergab sich aus einer früheren Studie in denen bereits gezeigt worden war, dass sowohl POP2 als auch CCR4 Komponenten von Hefe-PB sind.¹⁷⁹

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden deshalb quantitativen Mikroskopieanalysen zur PB- und SG-Bildung stressbehandelter und unbehandelter Hefezellen des POP2 und CCR4-Deletionsstamms sowie des WT-Hefestamms durchgeführt. Allerdings konnte dabei keine deletionsabhängige Veränderung der PB- oder SG-Bildungseffizienz festgestellt werden, was anhand der Fokibildung des spezifischen PB-Markers EDC3 bzw. des SG-Markers PUB1 bestimmt wurde. Das bedeutet somit, dass eine Beeinflussung der PB- oder SG-Bildung als Ursache für die o. g. deletionsabhängige Verstärkung wachstumshemmender Effekte von Ataxin-2 oder TDP-43 ausschied. Zudem machten diese Analysen darüber hinaus deutlich, dass POP2 und CCR4 in Hefezellen weder für die SG- noch die PB-Bildung essentiell sind, was damit auch prinzipiell den Ergebnissen o. g. Studie entsprach.¹⁷⁹

Eine weitere Erklärung für die durch POP2- und CCR4-Deletion ausgelösten Effekte könnte darüber hinaus jedoch selbstverständlich auch eine funktionellen Störung bzw. Inhibition der CCR4/NOT-Deadenylase gewesen sein. Dieses Enzym, das die Deadenylierung von 3'-Poly(A)-Ketten an mRNA-Transkripten katalysiert, hat nämlich entscheidende Bedeutung für den Abbau eines Großteils der zytoplasmatischen mRNA. Dabei geht man derzeit davon aus, dass es Teil eines Deadenylierungsmechanismus ist, der grundsätzlich in 2 Phasen abläuft. Dabei katalysiert zunächst die PAN2/PAN3-Deadenylase die Deadenylierung eines Teil der 3'-Poly(A)-Sequenzen an mRNA-Transkripten, wobei diese jedoch nicht komplett entfernt werden. Den Abbau der restlichen Oligo(A)-Kette übernimmt daraufhin der CCR4/NOT-Komplex, was letztendlich geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamt-Deadenylierungsreaktion ist. Die CCR4/NOT-Deadenylase ist damit v. a. für den 3'-5'-gerichteten mRNA-Abbau von entscheidender Bedeutung, der im Anschluss an die Entfernung der Poly(A)-Sequenz durch das Exosom, einen Multiprotein-Komplex mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität vollendet wird.²⁹⁰

Ferner begünstigt Deadenylierung die Dekappierung von 5'-mRNA-Enden und damit auch den 5'-3'-mRNA-Abbau, und zudem konnte ihre Beteiligung an sekundären mRNA-Abbauwegen wie z. B. dem NMD (*nonsense mediated mRNA-decay*) oder dem miRNA (MikroRNA)-vermittelten mRNA-Abbau erkannt werden.²⁹⁰

Demzufolge könnten also die hier festgestellten, deletionsabhängigen Einflüsse auf Ataxin-2 bzw. TDP-43 exprimierende Hefezellen auf einem gestörten mRNA-Abbau beruhen. Dabei könnte einerseits der spezifische Abbau der Ataxin-2- oder TDP-43-mRNA-Transkripte direkt betroffen gewesen sein, was zu einem Anstieg ihrer zellulären Proteinlevel geführt und so die beobachteten Effekten ausgelöst haben könnte. Andererseits wäre

jedoch auch ein indirekter Mechanismus denkbar. Das bedeutet, es wäre auch möglich, dass der Abbau anderer mRNA-Transkripte durch die Deletionen gestört war, deren Expressionsprodukte wiederum Einfluss auf die Auswirkungen der TDP-43- und Ataxin-2-Expression in Hefezellen gehabt haben könnten.

Bei den folgenden Experimenten in humanen HeLa-Zellen sollte deshalb mittels quantitativer RT-PCR geklärt werden, ob dort der siRNA-Knockdown der POP2- und CCR4-Orthologe einen Effekt auf die Menge der Ataxin-2- oder TDP-43-mRNA-Transkripte hat

5.3.1. Der simultane siRNA-Knockdown von CNOT7 & CNOT8 in HeLa-Zellen erhöht deren Ataxin-2 mRNA-Level und hemmt ihre P-Body-Bildung sehr effizient.

Um zu erfahren ob TDP-43 oder Ataxin-2 in humanen Zellen ebenfalls von den humanen Orthologen von POP2 (CNOT7 und CNOT8) oder CCR4 (CNOT6 und CNOT6L) reguliert wird, sollte deren siRNA-Knockdown (Kd) in HeLa-Zellen analysiert werden. Im Fall von CNOT6 und CNOT6L konnte der Kd jedoch nicht validiert werden, wohingegen der CNOT7- und CNOT8-Kd mehrfach nachgewiesen werden konnte. So zeigten CNOT7/CNOT8-Doppel-Kd-Ansätze in qRT-PCR-Experimenten stark reduzierte CNOT7- und CNOT8-mRNA-Level. Ferner waren in Einzel-Kd-Ansätzen die CNOT7- und CNOT8-Proteingehalte herab reguliert, und schließlich zeigte sich zudem in mikroskopischen Analysen eine bereits zuvor beschriebene Inhibition der PB-Bildung infolge der Einzel- oder des Doppel-Kd von CNOT7 und/oder CNOT8, wobei der Doppel-Kd verglichen mit den Einzel-Kd erheblich stärker inhibierend wirkte.²⁹¹

Interessanterweise stellte sich in den qRT-PCR-Untersuchungen außerdem heraus, dass der CNOT7/ CNOT8-Doppel-Kd die Ataxin-2-mRNA-Transkriptmenge tatsächlich signifikant auf ca. 167% des Kontrollwertes steigerte. Demgegenüber zeigten diese Untersuchungen jedoch keine Kd-abhängige Regulation des TDP-43-Transkripts.

Zusammengefasst hatte somit die Identifizierung des Hefeproteins POP2 als funktioneller Ataxin-2-Regulator im *S. cerevisiae*-Modell letztendlich auch in humanen Zellen zur Entdeckung bisher unbekannter Ataxin-2-mRNA-Regulatoren geführt, nämlich den POP2-Orthologen CNOT7 bzw. CNOT8. Es blieb diesbezüglich allerdings offen, ob beide Paraloge an der Ataxin-2-Regulation beteiligt gewesen waren, oder ob nur eines der Paraloge dafür verantwortlich gewesen war, und falls letzteres zutreffen sollte, welches Paralog dies gewesen sein könnte. Neben diesem hier erstmals beobachteten, regulatorischen Einfluss von CNOT7 und/oder CNOT8 auf Ataxin-2 bestand jedoch zwischen diesen noch eine weitere Verbindung. So hatte sich in einem humanen Zellkulturmodell kürzlich gezeigt, dass der CNOT7 oder CNOT8 enthaltende CCR4/NOT-Deadenylase-Komplex (s. v. Abs.) direkt über seine CNOT1-Untereinheit an DDX6 binden kann, das seinerseits bereits als direkter Interaktionspartner von Ataxin-2 erkannt worden ist.^{65,295} Es bestand somit die Möglichkeit, dass Ataxin-2 und der Deadenylase-Komplex über DDX6 auch physisch miteinander verknüpft sein könnten. Daraus ergab sich die Vermutung, dass auch Ataxin-2 ähnlich dem CCR4/NOT-Enzymkomplex eine Funktion bei der Regulation des zellulären Transkriptoms ausüben könnte. Dagegen sprachen allerdings Transkriptomanalysen in einem *mAtx-2*-KO-Mausmodell, bei denen der Ataxin-2-Funktionsverlust in verschiedenen Mausgeweben nur geringen Einfluss auf das Maustranskriptom ausgeübt hatte. Es zeigte sich dabei jedoch auch, dass der *mAtx-2*-KO insbesondere Transkripte translationsrelevanter Proteine (z. B. Ribosomen-Untereinheiten oder Translations-Initiationsfaktoren) regulierte, was somit für eine Kontrollfunktion von Ataxin-2 bei der Proteintranslation sprach. Weitere Argumente für eine solche Funktion von Ataxin-2 sind zudem seine beobachtete Kollokalisierung

und Kofraktionierung mit Komponenten des rER, seine Assemblierung in Polysomen sowie damit zusammenhängend seine Interaktion mit dem translationsfördernden Protein PABP1.^{60,66,67,68,69,72}

Demzufolge war anzunehmen, dass sich regulatorische Effekte von Ataxin-2 eher auf das zelluläre Proteom als auf dessen Transkriptom auswirken. Dies waren letztlich die Gründe dafür in abschließenden Studien im Hefemodell massenspektrometrisch zu untersuchen, wie sich die Gendeletion des Ataxin-2-Hefe-Orthologs PBP1 auf die Zusammensetzung des Hefeproteoms auswirken. So sollten Hinweise auf spezifische durch PBP1 und somit möglicherweise auch durch Ataxin-2 regulierte zelluläre Prozesse, Komponenten (insbesondere auch PB- und SG-Proteine) oder molekularbiologische Funktionen gewonnen werden.

5.4. Einflüsse der PBP1-Gendeletion auf das Proteom von *S. cerevisiae*

Um zu erfahren, wie sich die Gendeletion des Ataxin-2-Hefe-Orthologs PBP1 auf die Proteomzusammensetzung von Hefezellen auswirkt, wurden hier Zellysate des WT-Hefestamms sowie zweier unterschiedlich generierter PBP1-Deletionsstämme (Δ PBP1-DB & -sm) via HPLC-gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Die so gewonnenen Daten wurden ferner einer labelfreien Quantifizierung unterzogen um die gemessenen Proteinmengen zu ermitteln. Die durchschnittlichen Ergebnisse dieser Messungen dienten schließlich zur Berechnung der relativen Mengen der einzelnen detektierten Proteine in den Deletionsstämmen bezogen auf den WT-Stamm. Ergab sich dabei für ein Protein eine deletionsabhängige Mengenänderung auf unter 67 % des WT-Wertes wurde dieses als abwärts reguliert angesehen. Dagegen wurden Proteine, deren relativen Mengen in den Deletionsstämmen auf mehr als 150 % des WT-Wertes angestiegen waren, als positiv reguliert betrachtet. Darüber hinaus wurden die in beiden PBP1-Deletionsstämmen als reguliert erkannten Proteine miteinander verglichen, um darunter jene zu identifizieren die in beiden Deletionsstämmen unidirektional auf- oder abwärts reguliert worden waren, was die Aussagekraft der Ergebnisse erhöhen sollte.

Auf diese Weise konnten insgesamt 108 Proteine erkannt werden, deren Mengen durch PBP1-Deletion aufwärts und 34 Proteine deren Mengen dadurch abwärts reguliert worden waren, was eine Gesamtzahl deletionsabhängig regulierter Proteine von 142 ergibt. Diesbezüglich sei erwähnt, dass bereits in früheren Hochdurchsatz-Untersuchungen genetische Interaktionspartner von PBP1 identifiziert werden konnten. Da die hier durchgeführten MS-Analysen jedoch spezifisch auf PBP1 ausgerichtet waren, bieten sie im Gegensatz zu o. g. Studien erstmals einen größeren und zudem den bisher größten Überblick über genetische Interaktoren von PBP1.^{296–305}

Abgesehen davon wurden die beiden Gruppen unidirektional regulierter Proteine außerdem Anreicherungsanalysen mit Hilfe der GO-Datenbank unterzogen. Dadurch konnte im Fall der via PBP1-Deletion abwärts regulierten Proteine eine signifikante Anreicherung von Faktoren der zellulären Hitze-Stressantwort festgestellt werden. Dabei handelte es sich um die Proteine HSP12, HSP26, HSP78, HSP104 sowie SSA4, deren Proteinexpression im WT-Stamm demzufolge durch PBP1 gefördert wird. Dieses Ergebnis weist somit klar auf eine regulatorische Funktion von PBP1 im Zusammenhang mit zellulärem Stress hin. Ferner ließ sich davon ausgehend vermuten, dass insbesondere o. g. Proteine regulatorische oder auch andere Funktionen von PBP1 im Zusammenhang mit zellulärem Stress unterstützen könnten, was daraus geschlossen wurde, dass PBP1 im WT-Hefestamm fördernd auf deren Expression wirkte.

Dies könnte z. B. auch die bekannte PBP1-Funktion als Verstärker der SG-Assemblierung in Hefe betreffen.⁹⁹ Eine detaillierte Auswertung der MS-Daten bezüglich PB- oder SG-Komponenten hatte nämlich deutlich

gemacht, dass HSP26 ebenso wie PBP1 eine SG-Komponente ist. Demnach könnte sich also der positive Einfluss von PBP1 auf die HSP26-Proteinexpression auch positiv auf die zelluläre SG-Bildung in *S. cerevisiae* auswirken.

Darüber hinaus ist von mindestens vier der fünf oben genannten, als angereichert identifizierten Proteine der Hitze-Stressantwort bekannt, dass sie Chaperon-Aktivität besitzen und dementsprechend eine wichtige Rolle bei der zellulären Protein-Qualitätskontrolle spielen. Das heißt, sie sorgen für Faltungskorrekturen naszierender Polypeptidketten oder fehlgefalteter, mitunter auch stressabhängig denaturierter Proteine, die notwendig sind um diese in ihre native Konformation zu überführen, und sie darin zu stabilisieren. Daraus folgt, dass die hier festgestellte PBP1-Regulation der Chaperon-Proteinexpression eine wichtige Bedeutung für die Protein-Qualitätskontrolle in Hefezellen haben könnte. Dabei weist die Tatsache, dass die o. g. PBP1-regulierten Chaperone als stressabhängig reguliert gelten zudem einmal mehr darauf hin, dass die PBP1-Funktion besonders in Stress-Situationen für die Hefezellen wichtig sein könnte.^{326,327,328,329} Trotzdem besteht natürlich die Möglichkeit, dass PBP1 eine derartige Funktion auch in nicht gestressten Zellen ausüben könnte. Für eine solche allgemeine Protein-Qualitätskontrollfunktion spräche jedenfalls, dass Ataxin-2 als humanes PBP1-Ortholog unter optimalen zellulären Wachstumsbedingungen am rER oder freien Polysomen lokalisiert ist, an denen auch Chaperone hauptsächlich aktiv sind.^{68, 69} Diesbezüglich ist allerdings noch unklar, ob auch PBP1 in Hefe mit dem ER oder Ribosomen in Verbindung steht, jedoch wäre zumindest seine Interaktion mit dem PAB1-Protein ein Argument für eine solche Verbindung.⁶¹ Ebenso wenig ist zudem bekannt, ob neben der hier beobachteten, genetischen Verbindung zwischen PBP1 und den Hitzeschock-Proteinen überhaupt eine Interaktion zwischen ihnen auf Proteinebene existiert. Hierzu sei jedoch erwähnt, dass für SSA-Proteine bereits physische Interaktion mit PAB1 nachgewiesen werden konnte, so dass eine PAB1-vermittelte Interaktion zwischen SSA-Chaperonen und PBP1 durchaus vorstellbar wäre.³³⁰ Insgesamt bleibt somit diesbezüglich festzuhalten, dass PBP1 durch positive Regulation der o. g. Chaperone in optimal wachsenden Zellen an der zellulären Protein-Qualitätskontrolle beteiligt ist, was zudem auch in gestressten der Fall sein könnte.

Zusätzlich könnte die vom PBP1-Gen vermittelte Regulation von SSA4 und HSP104 allerdings auch im Hinblick auf pathologische Prozesse bedeutsam sein. Es hatte sich nämlich gezeigt, dass speziell diese beiden Chaperone nicht nur fehlgefaltete Proteine reparieren können sondern zudem in der Lage sind Aggregate solcher Proteine aufzulösen, d. h. zu disaggregieren, wobei sie vermutlich auch direkt miteinander interagieren. Diese Vermutung basiert dabei auf *in vitro*-Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass das SSA4-Homolog SSA1 (beide Mitglieder der HSP70-Chaperonfamilie) gemeinsam mit HSP104 (und dem HSP40-Protein Ydj1) die Disaggregation physiologischer, stressabhängiger Proteinaggregate vermittelt.^{331,332} Noch wichtiger ist in diesem Zusammenhang jedoch vermutlich, dass für beide Chaperone in Hefe-Analysen bereits mildernde Einflüsse auf Toxizität bzw. Aggregation des Htt-Exon1-Proteinabschnitts demonstriert werden konnten. Ferner konnte auch in einem transgenen HSP104-Mausmodell ein inhibierender Einfluss auf die Bildung pathogener Htt-Aggregate in kortikalen Zellen sowie verbessertes Überleben der Tiere vermittelt durch HSP104-Expression festgestellt werden.^{258,333} Nimmt man also, ausgehend von o. g. MS-Analysen an, dass auch das Ataxin-2-Gen ähnlich seinem Hefe-Ortholog die Expression disaggregierender Chaperone reguliert, könnte sich eine solche Regulation sowohl auf die Pathogenese von SCA2 als auch auf jene von z. B. Chorea Huntington auswirken. Dazu sei jedoch gesagt, dass in tierischen Zellen kein HSP104-Ortholog existiert, so dass diesbezüglich zunächst geklärt werden müsste, ob ähnliche Disaggregase-Chaperone dort überhaupt vorkommen.

Im Hinblick auf den erwähnten regulierenden Einfluss von HSP104 auf Aggregatbildung und Toxizität des Htt-Exon1-Proteinabschnitts in Hefe, sei außerdem erwähnt, dass dieser auch vom Prionstatus der Zellen abhängig gewesen ist. Außerdem fand man heraus, dass dafür eine durch HSP104 vermittelte Regulation des Hefe-Prion-Proteins RNQ1 bedeutsam ist, und schließlich konnte auch für weitere Hefe-Prion-Proteine (z. B. Ure2/Ure3 oder SUP35) deren Regulation durch HSP104 demonstriert werden.^{266,334,335,336,337} Dies ist besonders in Anbetracht dessen interessant, dass in den hier durchgeführten MS-Analysen auch eine durch PBP1-Deletion verursachte Reduktion der RNQ1-Proteinlevel festgestellt werden konnte. Das bedeutet somit zusammengefasst, dass eine weitere, mögliche Funktion von PBP1 in *S. cerevisiae* eine durch dessen Einfluss auf die zellulären HSP104-, SSA4- und RNQ1-Mengen vermittelte Regulation der Hefe-Prion-Aggregation bzw. -Disaggregation sein könnte, da diese drei Proteine zentrale Komponenten derartiger Prozesse in Hefe sind.

Neben diesem spezifischen, fördernden Einfluss von PBP1 auf Chaperone bzw. Hefe-Prion-Protein regulierende Proteine ließen die MS-Studien allerdings insgesamt auf einen allgemein eher inhibierenden Einfluss von PBP1 auf die Proteinbiosynthese in *S. cerevisiae* schließen. Dies ergab sich daraus, dass in diesen Analysen durch PBP1-Deletion ungefähr dreimal mehr Proteine aufwärts als abwärts regulierten worden war (s. Abb. 4.25).

Diesbezüglich konnten ferner auch unter den deletionsabhängig aufwärts regulierten Proteinen mit Hilfe der GO-Datenbank spezifische Anreicherungen bestimmter Proteine identifiziert werden, bei denen es sich in diesem Fall um Komponenten katalytischer Komplexe handelte. Dabei viel v. a. auf, dass von diesen 26 Proteinen allein elf in Zusammenhang mit der Transkription oder deren Regulation stehen. Dies betraf zum einen Untereinheiten der RNA-Polymerasen 1 und 3 (HPR1, RET1, RPA49, RPB8, RPC31), Transkriptionsfaktoren (TAF6 & TAF9), einen Chromatin-Remodellierungsfaktor (CHD1) sowie zwei Acetyltransferase-Proteine (MAK31, NAT5) und eine Methyltransferase (SDC1). Dabei beeinflussen letztere vier Proteine die Transkription insbesondere durch Regulation der Chromatinzugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren (z. B. über Histon-Acetylierungen), während die ersten sieben Proteine aktiv am Transkriptionsprozess beteiligt sein können. Zusammengefasst spricht dies somit für eine wichtige Funktion von PBP1 als Inhibitor der Transkription, wobei allerdings unklar blieb, ob dieser Einfluss die Expression spezifischer Gene reguliert oder sich eher auf die globale Transkription auswirkt. Letzteres ist jedoch aufgrund o. g. Studien im *ATXN2*-Knockout-Mausmodell eher unwahrscheinlich, da gezeigt wurde, dass zumindest der Funktionsverlust von mAtx-2 nur wenig Einfluss das Maustranskriptom hatte.⁷²

Die o. g. Transferase-Proteine gehörten darüber hinaus zudem einer Gruppe von insgesamt sieben derartigen enzymatischen Proteinen an. Die restlichen vier Transferase-Proteine PMT4, MNN1, HOC1 und GPI16 haben jedoch keinen erkennbaren Bezug zu transkriptionellen Prozessen. Vielmehr sind sie als Proteine oder Proteinbestandteile von Mannosyl- oder Glycosyltransferasen (PMT4, MNN1, HOC1) bzw. einer GPI-Transamidase (GPI16) Teil der ER- bzw. GA-abhängigen Proteinprozessierungs-Maschinerie, die der Übertragung von Kohlehydratketten auf Proteine sowie der Verankerung von Membranproteinen in ER- bzw. Zellmembran dient. Diese Ergebnisse weisen also darauf hin, dass PBP1 im WT-Stamm Faktoren ER- bzw. GA-abhängiger, kotranslationaler Proteinmodifikationsprozesse negativ reguliert. Da zudem für das Ataxin-2-Protein in humanen Zellen bereits gezeigt wurde, dass dieses sowohl mit dem ER als auch dem GA in Verbindung steht, könnte dies ferner auch auf eine aktive Beteiligung des PBP1-Proteins an derartigen kotranslationalen Proteinmodifikationen hinweisen.^{69, 119}

Insgesamt sprechen die proteomischen Analysen somit für eine regulatorische Funktion von PBP1 in *S. cerevisiae*, die insbesondere für die zelluläre Protein-Qualitätskontrolle, kotranslationale Protein-Modifikationsprozesse, die Gentranskription sowie die zelluläre Stressantwort wichtig ist.

6. Zusammenfassung

Spinocerebelläre Ataxie 2 (SCA2) ist eine autosomal-dominant vererbare neurodegenerative Erkrankung, die v. a. von einem progressiven Bewegungskordinations-Kontrollverlust und atrophischen Veränderungen des Kleinhirns sowie des Rückenmarks gekennzeichnet ist. Ferner gehört sie zu den PolyQ-Erkrankungen und ist mit pathogenen CAG-Repeat-Expansionsmutationen des Ataxin-2-Gens assoziiert. Über den SCA2-Pathomechanismus ist bisher jedoch nur wenig bekannt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass zwei proteolytisch prozessierte Ataxin-2-Spaltprodukte (N- und C-Terminus) dabei eine Rolle spielen könnten, deren zellbiologischen Eigenschaften jedoch noch weitgehend unbekannt sind.

Deshalb wurden entsprechende rekombinante Ataxin-2-Spaltprodukte in dieser Arbeit mit Hilfe des *S. cerevisiae*-Zellmodellsystem näher untersucht. Diesbezüglich wurden einerseits Wachstumstests durchgeführt, um zu erfahren ob die Spaltprodukte zytotoxische Effekte vermitteln können, und andererseits wurde in mikroskopischen Studien die Fokibildung und subzelluläre Lokalisation der Spaltprodukte analysiert. Diese Untersuchungen zeigten, dass zwar der Ataxin-2-C-Terminus, nicht jedoch dessen N-Terminus, in *S. cerevisiae* zytotoxische Effekte vermittelt. Zudem konnte dabei festgestellt werden, dass der C-Terminus im Vergleich zum N-Terminus sehr viel stärker zur Bildung mikroskopisch sichtbarer Foki neigte. Dies führte zu der Hypothese, dass die Foki des C-Terminus dessen Zytotoxizität in Hefe vermittelt haben könnten, die zudem durch die Beobachtung unterstützt wurde, dass sowohl Fokibildung als auch Zytotoxizität des C-Terminus durch die Einzeldelationen der Hefegene POP2 oder CCR4 signifikant verstärkt wurden.

Interessanterweise zeigten ähnliche hier durchgeführte Untersuchungen zu Zytotoxizität und Bildung zellschädigender Aggregate des mit Ataxin-2 in Verbindung stehenden TDP-43-Proteins, dass auch diese durch POP2 und CCR4-Deletion verstärkt wurden. Ferner ergaben diesbezüglich durchgeführte Sequenzalignment, dass eine 85 Aminosäure lange Ataxin-2-Region signifikante Ähnlichkeit mit einem großen Teil der prionartigen Domäne des TDP-43 besitzt. Insgesamt ließ dies vermuten, dass die Ataxin-2-C-Terminus-Foki ähnlich den TDP-43-Aggregaten entstehen, und dass für deren Bildung sowie für deren mutmaßlich zytotoxischen Eigenschaften prionartige Mechanismen verantwortlich sein könnten.

Da Ataxin-2 sowie sein Hefe-Ortholog PBP1 zudem als Stress-Granula (SG)-Komponenten bekannt sind, wurde auch geprüft, ob es sich bei den beobachteten C-Terminus-Foki um SG gehandelt haben könnte. Dabei zeigte sich einerseits, dass die C-Terminus-Foki mit dem SG-Marker PBP1 kolokalisierten, andererseits beeinflusste jedoch weder Stress noch der SG-Assemblierungsinhibitor Cycloheximid ihre Entstehung. Daraus ließ sich schließen, dass die C-Terminus-Foki kein Hefe-SG waren. Außerdem wurde festgestellt, dass die Bildung herkömmlicher SG durch C-Terminus-Expression gehemmt wird. Insgesamt ließ dies vermuten, dass die C-Terminus-Foki möglicherweise durch PBP1-Sequestrierung die SG-Bildung inhibiert haben könnten.

Weitere Untersuchungen zur Fokibildung und Lokalisation der Spaltprodukte in HeLa-Zellen wiesen ferner darauf hin, dass auch im humanen Modellsystem insbesondere der Ataxin-2-C-Terminus zellschädigende Wirkung haben könnte. Dabei hatte sich nämlich gezeigt, dass durchschnittlich etwa ein Viertel der C-Terminus exprimierenden Zellen filamentartige C-Terminus-Strukturen bildete, und dass nahezu alle dieser Zellen zudem mikroskopisch sichtbare Apoptosemerkmale aufwiesen. Im Gegensatz dazu traf dies auf die restlichen C-Terminus exprimierenden Zellen nicht zu, die ähnlich selten Apoptosemerkmale zeigten wie Kontrollzellen, was insgesamt vermuten ließ, dass filamentisierter C-Terminus pro-apoptotisch wirken könnte. Zudem konnten weitere Parallelen zwischen den Filamenten des C-Terminus in HeLa-Zellen und dessen Foki in Hefezellen

entdeckt werden. So kolokalisierten beide Strukturen mit Komponenten des Mikrotubuli-Netzwerks, und ferner führte die C-Terminus-Filamentbildung in HeLa-Zellen ähnlich der Expression bzw. Fokibildung des C-Terminus in Hefezellen zur Inhibition der SG-Bildung.

Die transiente Expression des Ataxin-2-N-Terminus bewirkte hingegen keine mikroskopisch sichtbaren, apoptosespezifischen Veränderungen in den HeLa-Zellen. Abgesehen davon hatte dieses Spaltprodukt allerdings, anders als vollständiges Ataxin-2 oder dessen C-Terminus, die bemerkenswerte Eigenschaft sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus der Zellen lokalisiert zu sein. Deshalb wurde die Ataxin-2-Sequenz hier auch hinsichtlich unkonventioneller Kernimport-Sequenzmotive untersucht, wobei ein bisher unbekanntes, mutmaßliches Kernimportsignal im Ataxin-2-N-Terminus identifiziert wurde, welches entsprechend für dessen nukleäre Transport verantwortlich gewesen sein könnte. Diesbezüglich konnte außerdem festgestellt werden, dass zytoplasmatische Lokalisation des N-Terminus Grundbedingung für eine durch dessen Expression verursachte Reduktion der nukleären TDP-43-Level sowie eine dadurch ausgelöste Störung der SG-Bildung war. Ferner konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine N-Terminus-Variante mit pathogener PolyQ-Expansion (mit 79 Q-Repeats) häufiger zytoplasmatisch lokalisiert war als die entsprechende nicht expandierte Isoform (mit 22 Q-Repeats). Das bedeutet somit, dass die Mutation indirekt Einfluss auf o. g. Effekte der N-Terminus-Expression hatte. Zusätzlich hatte sie jedoch außerdem einen drastischen, fördernden Effekt auf die Bildung zytoplasmatischer N-Terminus-Foki, was dazu führte, dass der expandierte N-Terminus nicht nur häufiger Foki bildet als dessen nicht expandierte Variante sondern auch als vollständiges Ataxin-2 mit derselben Repeatexpansion. Es wird daher angenommen, dass möglicherweise ähnliche expansionsmutationsabhängige Effekte auch für die SCA2-Pathogenese bedeutsam sein könnten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es ferner mit Hilfe gerichteter Hefe-Deletionsbank-Screens gemeinsame, genetische Regulatoren von Ataxin-2 und TDP-43 zu identifizieren. Dabei ergab sich, dass die Deletionen der Deadenylase-Proteine POP2 und CCR4 spezifischen Einfluss auf die Effekte der TDP-43- sowie der Ataxin-2-Expression in Hefe hatten. Anschließende Untersuchungen in HeLa-Zellen zeigten zudem, dass der siRNA-Doppel-Knockdown der humanen POP2-Orthologe CNOT7 und CNOT8 das Ataxin-2-Transkriptlevel erhöht. Letztendlich führten die Hefe-Screens somit zur erfolgreichen Identifikation von CNOT7 und/oder CNOT8 als Regulatoren der Ataxin-2-Expression in humanen Zellen.

Schließlich wurden außerdem Proteomstudien in *S. cerevisiae* unternommen, um mehr über die weitgehend unbekannt Funktion des Ataxin-2-Hefe-Orthologs PBP1 zu erfahren. Diese ließen erkennen, dass PBP1 insbesondere bestimmte Proteine der zellulären Hitze-Stressantwort (v. a. Chaperone) positiv regulierte, die insbesondere für die Protein-Qualitätskontrolle der Zelle von Bedeutung sind, was somit deutlich für eine spezifische PBP1-Funktion bei der intrazellulären Stressantwort spricht. Insgesamt betrachtet hatte PBP1 dennoch hauptsächlich negativen regulatorischen Einfluss auf das Hefe-Proteom. Dabei waren zudem unter den negativ regulierten Proteinen v. a. Komponenten katalytischer Komplexe angereichert, bei denen es sich hauptsächlich um transkriptionsrelevante Komplexe sowie um einige, für ER- bzw. Golgi-Apparat-vermittelte Protein-Modifikationsprozesse bedeutsame, Transferasen handelte. Das bedeutet zusammengefasst, dass PBP1 in *S. cerevisiae* eine wichtige Funktion als indirekter Regulator der Gentranskription, kotranslatationaler Proteinmodifikationen sowie der Protein-Qualitätskontrolle ausübt.

7. Summary

Spinocerebellar Ataxia 2 (SCA2) is an autosomal dominant hereditary neurodegenerative disorder, which is mainly characterized by a progressive loss of control of coordinated movements as well as atrophic changes in the cerebellum and the spine. It belongs to the so called PolyQ-diseases and is associated with pathogenic CAG-repeat expansion mutations in the Ataxin-2 gene. The SCA2-pathomechanism is not well understood, but there are hints, that two proteolytically processed Ataxin-2 cleavage products (N- and C-terminus) might be involved in it. However, their cellbiological properties are largely unknown.

Therefore respective, recombinant Ataxin-2 cleavage products were analyzed in this work employing the *S. cerevisiae* cellular model system. In this regard, on the one hand growth assays were performed to reveal, if the cleavage products are able to mediate cytotoxic effects, and on the other hand microscopic studies were conducted to analyze their foci formation and subcellular localization. These experiments showed, that the C-terminus of Ataxin-2, but not its N-terminus mediated cytotoxicity in yeast. In addition it could be noted, that the C-terminal cleavage product was much more prone to form microscopically visible foci than its N-terminal counterpart. This led to the Hypothesis, that the foci of the C-terminal cleavage product might have been a reason for its cytotoxic effect in yeast, which was further supported by the observation, that both cytotoxicity and foci formation of the C-terminus were significantly enhanced by single deletions of the yeast genes POP2 and CCR4.

Interestingly similar studies regarding cytotoxicity and formation of toxic aggregates of the TDP-43 protein, which has recently been shown to be linked to Ataxin-2, demonstrated, that those were also both enhanced by the deletion of POP2 or CCR4. Furthermore sequence alignments performed in this context revealed, that a 85 amino acid region within the Ataxin-2 C-terminus has significant similarity to a large proportion of the prion-like domain of TDP-43. Together these results suggested, that the foci of the Ataxin-2 C-terminus were formed akin to the TDP-43 aggregates, and that their formation as well as their putative cytotoxic properties could depend on prion-like mechanisms.

Since Ataxin-2 and its yeast ortholog PBP1 are additionally known as components of Stress granules (SG), it was also investigated here, whether the detected C-terminus foci could have been SG or not. Referring to this it was shown on the one hand, that the C-terminus foci colocalize with the yeast SG-marker PBP1, but on the other hand neither stress nor the SG assembly inhibitor cycloheximide had an influence on their formation. This led to the conclusion, that the C-terminus foci have not been yeast SG. Moreover it was noted, that the formation of canonical SG was inhibited by C-terminus expression. Taken together these results suggested, that the C-terminus foci could probably have impaired SG-formation by means of PBP1-sequestration.

In addition further investigations performed in HeLa-cells concerning foci formation and localization of the Ataxin-2 cleavage products indicated, that, also in this human model system, it was particularly the Ataxin-2 C-terminus, which seemed to have detrimental effects on the cells. This was concluded, since it has been observed, that a significant part of the C-terminus expressing cells formed filamentous C-terminus foci, and that almost all of these cells showed microscopically detectable, apoptotic signs. In contrast, this did not apply to the remaining C-terminus expressing cells, which exhibited apoptotic signs as rarely as control cells. Altogether this led to the assumption that filamentous Ataxin-2 C-terminus might act in a pro-apoptotic way. Besides this further parallels between the C-terminus filaments in HeLa-cells and its foci in yeast cells had also been discovered. This refers to the observations, that both structures co-localized with components of the microtubule

network and that C-terminus filament formation in HeLa-cells inhibited SG formation similar to its expression and probably also its foci-formation in yeast.

Conversely the transient expression of the Ataxin-2 N-Terminus did not result in any detectable apoptotic changes in the HeLa-cells. However this cleavage product, in contrast to full-length Ataxin-2 or its C-terminus, had the remarkable property to be localized not only in the cytoplasm but also in the cells nuclei. Therefore the Ataxin-2 sequence was additionally checked for unconventional nuclear import sequence motifs leading to the identification of a previously unknown, putative nuclear import signal located at the Ataxin-2 N-Terminus, which could consequently be involved in the nuclear import of the N-Terminus. In this regard it could further be noted, that cytoplasmic localization of the N-terminus was an essential prerequisite for some effects mediated by its expression, namely a reduction of the nuclear TDP-43-levels as well as a deficient SG formation. Furthermore it could also be shown, that a mutant variant of the N-Terminus carrying a pathogenic PolyQ-expansion (with 79 Q-repeats) was more likely to be localized cytoplasmically than its unexpanded counterpart (with 22 Q-repeats). This means that the mutation did also have an indirect influence on the above mentioned effects of the N-Terminus expression. But apart from this, the mutation also had a drastic enhancing effect on the formation of cytoplasmic N-Terminus foci, which led to the situation, that the degree of foci formation in case of the expanded N-terminus not only exceeded that of the unexpanded N-Terminus but also that of a full-length Ataxin-2 variant with the same expansion mutation. Hence, it can be assumed, that similar expansion mutation dependent effects might probably be important for SCA2-pathogenesis as well.

Another aim of this work was further to identify common genetic regulators of Ataxin-2 and TDP-43 in targeted yeast deletion library screens. These revealed that the deletions of the two deadenylase proteins POP2 and CCR4 had a specific impact on the effects mediated by expression of either Ataxin-2 or TDP-43 in yeast cell. Moreover subsequent studies in HeLa-cells showed that the double-siRNA-Knockdown of the human POP2 orthologs CNOT7 and CNOT8 led to a raise in the amount of Ataxin-2 transcripts. Hence the yeast screens eventually resulted in the successful identification of CNOT7 and/or CNOT8 as a regulator of Ataxin-2 gene expression in human cells.

Finally proteomic studies were also conducted in *S. cerevisiae*, to explore the largely unknown function of the Ataxin-2 yeast ortholog PBP1. These studies indicated, that PBP1 particularly up-regulated certain proteins connected to the cellular heat stress response (mainly chaperones), that are especially important for the cells protein quality control, which clearly emphasized that PBP1 has a function in cellular stress response pathways. Despite this, PBP1 altogether rather had a negative than a positive regulatory influence on the yeast proteome. Regarding this it is further noteworthy, that, also among the down-regulated proteins, a specific protein enrichment could be detected, which in this case was related to catalytical complex proteins. These mostly referred to transcription relevant complexes as well as some transferases with functions in ER- or Golgi-Apparatus-mediated protein modification processes. Taken together this means, that PBP1 has an important function as an indirect regulator of gene transcription, co-translational protein modification as well as protein quality control processes in *S. cerevisiae*.

8. Literaturverzeichnis

1. Klockgether, T. & Paulson, H. Milestones in ataxia. *Mov. Disord.* **26**, 1134–1141 (2011).
2. Rüb, U. *et al.* Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog. Neurobiol.* **104**, 38–66 (2013).
3. Magaña, J. J., Velázquez-Pérez, L. & Cisneros, B. Spinocerebellar ataxia type 2: clinical presentation, molecular mechanisms, and therapeutic perspectives. *Mol. Neurobiol.* **47**, 90–104 (2013).
4. *Scientific American molecular neurology.* (Scientific American, 1998).
5. Hoffner, G. & Djian, P. Monomeric, Oligomeric and Polymeric Proteins in Huntington Disease and Other Diseases of Polyglutamine Expansion. *Brain Sci.* **4**, 91–122 (2014).
6. Gispert, S. *et al.* Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1. *Nat. Genet.* **4**, 295–299 (1993).
7. 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.* **14**, 277–284 (1996).
8. Pulst, S.-M. *et al.* Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat. Genet.* **14**, 269–276 (1996).
9. 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.* **14**, 285–291 (1996).
10. Yu, F. *et al.* Positive Selection of a Pre-Expansion CAG Repeat of the Human SCA2 Gene. *PLoS Genet.* **1**, e41 (2005).
11. Andrés, A. M., Lao, O., Soldevila, M., Calafell, F. & Bertranpetit, J. Dynamics of CAG repeat loci revealed by the analysis of their variability. *Hum. Mutat.* **21**, 61–70 (2003).
12. Mao, R. *et al.* Childhood-onset ataxia: testing for large CAG-repeats in SCA2 and SCA7. *Am. J. Med. Genet.* **110**, 338–345 (2002).
13. Geschwind, D. H., Perlman, S., Figueroa, C. P., Treiman, L. J. & Pulst, S. M. 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.* **60**, 842–850 (1997).
14. Stevanin, G. *et al.* Screening for proteins with polyglutamine expansions in autosomal dominant cerebellar ataxias. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1887–1892 (1996).
15. Giunti, P. *et al.* The role of the SCA2 trinucleotide repeat expansion in 89 autosomal dominant cerebellar ataxia families. *Brain* **121**, 459–467 (1998).
16. Klockgether, T. *et al.* The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain* **121**, 589–600 (1998).
17. Cancel, G. *et al.* Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: a study of 32 families. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 709–715 (1997).
18. Giunti, P. *et al.* Molecular and clinical study of 18 families with ADCA type II: evidence for genetic heterogeneity and de novo mutation. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 1594–1603 (1999).
19. Babovic-Vuksanovic, D., Snow, K., Patterson, M. C. & Michels, V. V. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA 2) in an infant with extreme CAG repeat expansion. *Am. J. Med. Genet.* **79**, 383–387 (1998).
20. Velázquez-Pérez, L. *et al.* A comprehensive review of spinocerebellar ataxia type 2 in Cuba. *Cerebellum Lond. Engl.* **10**, 184–198 (2011).
21. Pulst, S.-M. in *GeneReviews*(®) (eds Pagon, R. A. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1993).
22. Wadia, N. H. & Swami, R. K. A NEW FORM OF HEREDO-FAMILIAL SPINOCEREBELLAR DEGENERATION WITH SLOW EYE MOVEMENTS (NINE FAMILIES). *Brain* **94**, 359–374 (1971).
23. Basu, P. *et al.* Analysis of CAG repeats in SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 and DRPLA loci in spinocerebellar ataxia patients and distribution of CAG repeats at the SCA1, SCA2 and SCA6 loci in nine ethnic populations of eastern India. *Hum. Genet.* **106**, 597–604 (2000).
24. Tan, E. K. *et al.* Spinocerebellar ataxia in Singapore: predictive features of a positive DNA test? *Eur. Neurol.* **44**, 168–171 (2000).

25. Tang, B. *et al.* Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. *Arch. Neurol.* **57**, 540–544 (2000).
26. Mori, M., Adachi, Y., Kusumi, M. & Nakashima, K. A genetic epidemiological study of spinocerebellar ataxias in Tottori prefecture, Japan. *Neuroepidemiology* **20**, 144–149 (2001).
27. Watanabe, H. *et al.* Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Japanese patients and clinical characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Clin. Genet.* **53**, 13–19 (1998).
28. Sasaki, H., Yabe, I., Yamashita, I. & Tashiro, K. Prevalence of triplet repeat expansion in ataxia patients from Hokkaido, the northernmost island of Japan. *J. Neurol. Sci.* **175**, 45–51 (2000).
29. Soong, B. W. Hereditary spinocerebellar ataxias: number, prevalence, and treatment prospects. *Hong Kong Med. J. Xianggang Yi Xue Za Zhi Hong Kong Acad. Med.* **10**, 229–230 (2004).
30. Hsieh, M. *et al.* Identification of the spinocerebellar ataxia type 7 mutation in Taiwan: application of PCR-based Southern blot. *J. Neurol.* **247**, 623–629 (2000).
31. Storey, E. *et al.* Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia. *Am. J. Med. Genet.* **95**, 351–357 (2000).
32. Brusco, A. *et al.* Molecular Genetics of Hereditary Spinocerebellar Ataxia: Mutation Analysis of Spinocerebellar Ataxia Genes and CAG/CTG Repeat Expansion Detection in 225 Italian Families. *Arch. Neurol.* **61**, 727 (2004).
33. Pareyson, D. *et al.* Clinical and molecular studies of 73 Italian families with autosomal dominant cerebellar ataxia type I: SCA1 and SCA2 are the most common genotypes. *J. Neurol.* **246**, 389–393 (1999).
34. Filla, A. *et al.* Relative frequencies of CAG expansions in spinocerebellar ataxia and dentatorubropallidoluysian atrophy in 116 Italian families. *Eur. Neurol.* **44**, 31–36 (2000).
35. Leggo, J. *et al.* Analysis of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6, dentatorubral-pallidoluysian atrophy, and Friedreich's ataxia genes in spinocerebellar ataxia patients in the UK. *J. Med. Genet.* **34**, 982–985 (1997).
36. Pujana, M. A. *et al.* Spinocerebellar ataxias in Spanish patients: genetic analysis of familial and sporadic cases. The Ataxia Study Group. *Hum. Genet.* **104**, 516–522 (1999).
37. Schöls, L. *et al.* Spinocerebellar ataxia type 2. Genotype and phenotype in German kindreds. *Arch. Neurol.* **54**, 1073–1080 (1997).
38. Riess, O. *et al.* SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients. *Neurogenetics* **1**, 59–64 (1997).
39. Silveira, I. *et al.* Analysis of SCA1, DRPLA, MJD, SCA2, and SCA6 CAG repeats in 48 Portuguese ataxia families. *Am. J. Med. Genet.* **81**, 134–138 (1998).
40. van de Warrenburg, B. P. C. *et al.* Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* **58**, 702–708 (2002).
41. Moseley, M. L. *et al.* Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology* **51**, 1666–1671 (1998).
42. Erichsen, A. K., Koht, J., Stray-Pedersen, A., Abdelnoor, M. & Tallaksen, C. M. E. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. *Brain* **132**, 1577–1588 (2009).
43. Alonso, E. *et al.* Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **22**, 1050–1053 (2007).
44. Estrada, R., Galarraga, J., Orozco, G., Nodarse, A. & Auburger, G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2): morphometric analyses in 11 autopsies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **97**, 306–310 (1999).
45. Park, H., Kim, H.-J. & Jeon, B. S. Parkinsonism in Spinocerebellar Ataxia. *BioMed Res. Int.* **2015**, 125273 (2015).
46. Aguiar, J. *et al.* Identification of the physiological promoter for spinocerebellar ataxia 2 gene reveals a CpG island for promoter activity situated into the exon 1 of this gene and provides data about the origin of the nonmethylated state of these types of islands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 315–318 (1999).

47. Scoles, D. R. *et al.* ETS1 regulates the expression of ATXN2. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 5048–5065 (2012).
48. Sahba, S., Nechiporuk, A., Figueroa, K. P., Nechiporuk, T. & Pulst, S. M. Genomic structure of the human gene for spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) on chromosome 12q24.1. *Genomics* **47**, 359–364 (1998).
49. Affaitati, A., de Cristofaro, T., Feliciello, A. & Varrone, S. Identification of alternative splicing of spinocerebellar ataxia type 2 gene. *Gene* **267**, 89–93 (2001).
50. Huynh, D. P., Del Bigio, M. R., Ho, D. H. & Pulst, S.-M. Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. *Ann. Neurol.* **45**, 232–241 (1999).
51. The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* **43**, D204–D212 (2015).
52. Albrecht, M., Golatta, M., Wüllner, U. & Lengauer, T. Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3: Analysis of ataxins 2 and 3. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3155–3170 (2004).
53. Neuwald, A. F. & Koonin, E. V. Ataxin-2, global regulators of bacterial gene expression, and spliceosomal snRNP proteins share a conserved domain. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **76**, 3–5 (1998).
54. Khusial, P., Plaag, R. & Zieve, G. W. LSm proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 522–528 (2005).
55. Meunier, C. *et al.* Cloning and characterization of a family of proteins associated with Mpl. *J. Biol. Chem.* **277**, 9139–9147 (2002).
56. Satterfield, T. F., Jackson, S. M. & Pallanck, L. J. A Drosophila homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation. *Genetics* **162**, 1687–1702 (2002).
57. Nechiporuk, T. *et al.* The mouse SCA2 gene: cDNA sequence, alternative splicing and protein expression. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1301–1309 (1998).
58. Kiehl, T. R., Shibata, H. & Pulst, S. M. The ortholog of human ataxin-2 is essential for early embryonic patterning in *C. elegans*. *J. Mol. Neurosci. MN* **15**, 231–241 (2000).
59. Albrecht, M. & Lengauer, T. Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 129–138 (2004).
60. Ralser, M. *et al.* An Integrative Approach to Gain Insights into the Cellular Function of Human Ataxin-2. *J. Mol. Biol.* **346**, 203–214 (2005).
61. Mangus, D. A., Amrani, N. & Jacobson, A. Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly (A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7383–7396 (1998).
62. Ciosk, R. ATX-2, the *C. elegans* ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline. *Development* **131**, 4831–4841 (2004).
63. Kozlov, G. *et al.* Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly (A)-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4409–4413 (2001).
64. Kozlov, G., Safaee, N., Rosenauer, A. & Gehring, K. Structural Basis of Binding of P-body-associated Proteins GW182 and Ataxin-2 by the Mlle Domain of Poly(A)-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **285**, 13599–13606 (2010).
65. 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* **18**, 1385–1396 (2007).
66. Kühn, U. & Wahle, E. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1678**, 67–84 (2004).
67. Mangus, D. A., Evans, M. C. & Jacobson, A. Poly (A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* **4**, 1 (2003).
68. Satterfield, T. F. Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2523–2532 (2006).
69. van de Loo, S., Eich, F., Nonis, D., Auburger, G. & Nowock, J. Ataxin-2 associates with rough endoplasmic reticulum. *Exp. Neurol.* **215**, 110–118 (2009).
70. Tadauchi, T., Inada, T., Matsumoto, K. & Irie, K. Posttranscriptional Regulation of HO Expression by the Mkt1-Pbp1 Complex. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3670–3681 (2004).

71. Damrath, E. *et al.* ATXN2-CAG42 Sequesters PABPC1 into Insolubility and Induces FBXW8 in Cerebellum of Old Ataxic Knock-In Mice. *PLoS Genet.* **8**, e1002920 (2012).
72. Fittschen, M. *et al.* Genetic ablation of ataxin-2 increases several global translation factors in their transcript abundance but decreases translation rate. *neurogenetics* **16**, 181–192 (2015).
73. Shibata, H., Huynh, D. P. & Pulst, S. M. A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1303–1313 (2000).
74. Jin, Y. A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J.* **22**, 905–912 (2003).
75. Skipper, M., Milne, C. A. & Hodgkin, J. Genetic and molecular analysis of fox-1, a numerator element involved in *Caenorhabditis elegans* primary sex determination. *Genetics* **151**, 617–631 (1999).
76. Nicoll, M., Akerib, C. C. & Meyer, B. J. X-chromosome-counting mechanisms that determine nematode sex. *Nature* **388**, 200–204 (1997).
77. Usha, N. & Shashidhara, L. S. Interaction between Ataxin-2 Binding Protein 1 and Cubitus-interruptus during wing development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **341**, 389–399 (2010).
78. Lim, J. *et al.* A Protein–Protein Interaction Network for Human Inherited Ataxias and Disorders of Purkinje Cell Degeneration. *Cell* **125**, 801–814 (2006).
79. Gehman, L. T. *et al.* The splicing regulator Rbfox1 (A2BP1) controls neuronal excitation in the mammalian brain. *Nat. Genet.* **43**, 706–711 (2011).
80. Lee, J.-A., Tang, Z.-Z. & Black, D. L. An inducible change in Fox-1/A2BP1 splicing modulates the alternative splicing of downstream neuronal target exons. *Genes Dev.* **23**, 2284–2293 (2009).
81. 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.* **49**, (2004).
82. Waldherr, M. *et al.* A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast. *Curr. Genet.* **24**, 301–306 (1993).
83. McCann, C. *et al.* The Ataxin-2 protein is required for microRNA function and synapse-specific long-term olfactory habituation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, E655–E662 (2011).
84. Mangus, D. A., Smith, M. M., McSweeney, J. M. & Jacobson, A. Identification of Factors Regulating Poly(A) Tail Synthesis and Maturation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4196–4206 (2004).
85. Mangus, D. A. *et al.* Positive and Negative Regulation of Poly(A) Nuclease. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5521–5533 (2004).
86. Ralser, M. Ataxin-2 and huntingtin interact with endophilin-A complexes to function in plastin-associated pathways. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2893–2909 (2005).
87. Gallop, J. L. *et al.* Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J.* **25**, 2898–2910 (2006).
88. Ringstad, N., Nemoto, Y. & De Camilli, P. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 8569–8574 (1997).
89. Nonis, D. *et al.* Ataxin-2 associates with the endocytosis complex and affects EGF receptor trafficking. *Cell. Signal.* **20**, 1725–1739 (2008).
90. Lastres-Becker, I. *et al.* Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1465–1481 (2008).
91. Kiehl, T.-R. *et al.* Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 17–24 (2006).
92. Dunn, C. D. & Jensen, R. E. Suppression of a defect in mitochondrial protein import identifies cytosolic proteins required for viability of yeast cells lacking mitochondrial DNA. *Genetics* **165**, 35–45 (2003).
93. Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. & Sugimoto, A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr. Biol.* **11**, 171–176 (2001).
94. Gönczy, P. *et al.* Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* **408**, 331–336 (2000).
95. Maine, E. M., Vought, V. E., Springer, D. & Hansen, D. *Caenorhabditis elegans* atx-2 Promotes Germline Proliferation and the Oocyte Fate. *Genetics* **168**, 817–830 (2004).

96. Salvi, J. S. *et al.* Roles for Pbp1 and Caloric Restriction in Genome and Lifespan Maintenance via Suppression of RNA-DNA Hybrids. *Dev. Cell* **30**, 177–191 (2014).
97. Wiedemeyer, R., Westermann, F., Wittke, I., Nowock, J. & Schwab, M. Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene* **22**, 401–411 (2003).
98. Lastres-Becker, I. *et al.* Mammalian ataxin-2 modulates translation control at the pre-initiation complex via PI3K/mTOR and is induced by starvation. *Biochim. Biophys. Acta* **1862**, 1558–1569 (2016).
99. Buchan, J. R., Muhlrads, D. & Parker, R. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **183**, 441–455 (2008).
100. Nihei, Y., Ito, D. & Suzuki, N. Roles of Ataxin-2 in Pathological Cascades Mediated by TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) and Fused in Sarcoma (FUS). *J. Biol. Chem.* **287**, 41310–41323 (2012).
101. Swisher, K. D. & Parker, R. Localization to, and Effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on Stress Granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **5**, e10006 (2010).
102. Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M. & Finch, J. T. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 5355–5358 (1994).
103. Lunke, A. & Mandel, J. L. Polyglutamines, nuclear inclusions and neurodegeneration. *Nat. Med.* **3**, 1201–1202 (1997).
104. Seidel, K. *et al.* Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **124**, 1–21 (2012).
105. Ross, C. A. Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron* **19**, 1147–1150 (1997).
106. Koyano, S., Iwabuchi, K., Yagishita, S., Kuroiwa, Y. & Uchihara, T. Paradoxical absence of nuclear inclusion in cerebellar Purkinje cells of hereditary ataxias linked to CAG expansion. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **73**, 450–452 (2002).
107. Koyano, S. *et al.* Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study. *Neurosci. Lett.* **273**, 117–120 (1999).
108. Koyano, S. *et al.* Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2. *Ann. Neurol.* **47**, 550 (2000).
109. Uchihara, T. *et al.* Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias--triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **102**, 149–152 (2001).
110. Huynh, D. P., Figueroa, K., Hoang, N. & Pulst, S. M. Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat. Genet.* **26**, 44–50 (2000).
111. Pang, J. T. *et al.* Neuronal intranuclear inclusions in SCA2: a genetic, morphological and immunohistochemical study of two cases. *Brain* **125**, 656–663 (2002).
112. 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.* **392**, 202–206 (2006).
113. Hansen, S. T., Meera, P., Otis, T. S. & Pulst, S. M. Changes in Purkinje cell firing and gene expression precede behavioral pathology in a mouse model of SCA2. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 271–283 (2013).
114. Cendelin, J. From mice to men: lessons from mutant ataxic mice. *Cerebellum Ataxias* **1**, (2014).
115. Liu, J. *et al.* Deranged Calcium Signaling and Neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxia Type 2. *J. Neurosci.* **29**, 9148–9162 (2009).
116. Bezprozvanny, I. Role of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in Pathogenesis of Huntington's Disease and Spinocerebellar Ataxias. *Neurochem. Res.* **36**, 1186–1197 (2011).
117. Huynh, D. P., Nguyen, D. T., Pulst-Korenberg, J. B., Brice, A. & Pulst, S.-M. Parkin is an E3 ubiquitin-ligase for normal and mutant ataxin-2 and prevents ataxin-2-induced cell death. *Exp. Neurol.* **203**, 531–541 (2007).

118. Turnbull, V. J. *et al.* Different ataxin-2 antibodies display different immunoreactive profiles. *Brain Res.* **1027**, 103–116 (2004).
119. Huynh, D. P. Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1485–1496 (2003).
120. Hart, M. P. & Gitler, A. D. ALS-Associated Ataxin 2 PolyQ Expansions Enhance Stress-Induced Caspase 3 Activation and Increase TDP-43 Pathological Modifications. *J. Neurosci.* **32**, 9133–9142 (2012).
121. Ng, H., Pulst, S.-M. & Huynh, D. P. Ataxin-2 mediated cell death is dependent on domains downstream of the polyQ repeat. *Exp. Neurol.* **208**, 207–215 (2007).
122. Yokoshi, M. *et al.* Direct Binding of Ataxin-2 to Distinct Elements in 3' UTRs Promotes mRNA Stability and Protein Expression. *Mol. Cell* **55**, 186–198 (2014).
123. 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.* **9**, 1753–1758 (2000).
124. Pereira, F. S. *et al.* ATXN3, ATXN7, CACNA1A, and RAI1 Genes and Mitochondrial Polymorphism A10398G Did Not Modify Age at Onset in Spinocerebellar Ataxia Type 2 Patients from South America. *Cerebellum Lond. Engl.* (2015). doi:10.1007/s12311-015-0666-8
125. Chattopadhyay, B. *et al.* Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. *Neurosci. Lett.* **345**, 93–96 (2003).
126. Simon, D. K. *et al.* Mitochondrial Complex I Gene Variant Associated With Early Age at Onset in Spinocerebellar Ataxia Type 2. *Arch. Neurol.* **64**, 1042 (2007).
127. Velázquez-Pérez, L. *et al.* Oral zinc sulphate supplementation for six months in SCA2 patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurochem. Res.* **36**, 1793–1800 (2011).
128. Ristori, G. *et al.* Riluzole in cerebellar ataxia: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Neurology* **74**, 839–845 (2010).
129. Chang, Y.-K. *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation ameliorates motor function deterioration of spinocerebellar ataxia by rescuing cerebellar Purkinje cells. *J Biomed Sci* **18**, 54 (2011).
130. Asada, A. *et al.* Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates and induces the degradation of ataxin-2. *Neurosci. Lett.* **563**, 112–117 (2014).
131. Nagai, Y. *et al.* Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1253–1259 (2003).
132. Popiel, H. A., Nagai, Y., Fujikake, N. & Toda, T. Protein transduction domain-mediated delivery of QBP1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in vivo. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **15**, 303–309 (2007).
133. Zhang, X. *et al.* A potent small molecule inhibits polyglutamine aggregation in Huntington's disease neurons and suppresses neurodegeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 892–897 (2005).
134. Matilla-Dueñas, A. *et al.* Cellular and molecular pathways triggering neurodegeneration in the spinocerebellar ataxias. *Cerebellum Lond. Engl.* **9**, 148–166 (2010).
135. Rimoldi, M., Servadio, A. & Zimarino, V. Analysis of heat shock transcription factor for suppression of polyglutamine toxicity. *Brain Res. Bull.* **56**, 353–362 (2001).
136. Kieran, D. *et al.* Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat. Med.* **10**, 402–405 (2004).
137. Shults, C. W. Coenzyme Q10 in neurodegenerative diseases. *Curr. Med. Chem.* **10**, 1917–1921 (2003).
138. Ravikumar, B. *et al.* Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* **36**, 585–595 (2004).
139. Ryu, H., Rosas, H. D., Hersch, S. M. & Ferrante, R. J. The therapeutic role of creatine in Huntington's disease. *Pharmacol. Ther.* **108**, 193–207 (2005).
140. Xia, H. *et al.* RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat. Med.* **10**, 816–820 (2004).

141. Rodriguezlebron, E., Denovanwright, E., Nash, K., Lewin, A. & Mandel, R. Intrastratial rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Mol. Ther.* **12**, 618–633 (2005).
142. Machida, Y. *et al.* rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 190–197 (2006).
143. Wang, Y.-L. *et al.* Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci. Res.* **53**, 241–249 (2005).
144. Caplen, N. J. *et al.* Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 175–184 (2002).
145. Scholefield, J. *et al.* Design of RNAi Hairpins for Mutation-Specific Silencing of Ataxin-7 and Correction of a SCA7 Phenotype. *PLoS ONE* **4**, e7232 (2009).
146. Hu, J. *et al.* Allele-specific silencing of mutant huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs. *Nat. Biotechnol.* **27**, 478–484 (2009).
147. Simon-Sanchez, J. *et al.* Analysis of SCA-2 and SCA-3 repeats in Parkinsonism: evidence of SCA-2 expansion in a family with autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **382**, 191–194 (2005).
148. Yamashita, C. *et al.* Evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **35**, 1779.e17-21 (2014).
149. Charles, P. *et al.* Are interrupted SCA2 CAG repeat expansions responsible for parkinsonism? *Neurology* **69**, 1970–1975 (2007).
150. Kim, J.-M. *et al.* Importance of low-range CAG expansion and CAA interruption in SCA2 Parkinsonism. *Arch. Neurol.* **64**, 1510–1518 (2007).
151. Wang, C. *et al.* Linkage analysis and whole-exome sequencing exclude extra mutations responsible for the parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia-2. *Neurobiol. Aging* **36**, 545.e1-7 (2015).
152. Fallon, L. *et al.* A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nat. Cell Biol.* **8**, 834–842 (2006).
153. Elden, A. C. *et al.* Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* **466**, 1069–1075 (2010).
154. Sun, Z. *et al.* Molecular Determinants and Genetic Modifiers of Aggregation and Toxicity for the ALS Disease Protein FUS/TLS. *PLoS Biol.* **9**, e1000614 (2011).
155. Pulst, S.-M. *et al.* Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain* **128**, 2297–2303 (2005).
156. Lessing, D. & Bonini, N. M. Polyglutamine genes interact to modulate the severity and progression of neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS Biol* **6**, e29 (2008).
157. Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. & Izaurralde, E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 9–22 (2007).
158. Bashkurov, V. I., Scherthan, H., Solinger, J. A., Buerstedde, J.-M. & Heyer, W.-D. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J. Cell Biol.* **136**, 761–773 (1997).
159. Teixeira, D., Parker, R., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A. & Brengues, M. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* **11**, 371–382 (2005).
160. Sheth, U. & Parker, R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805–808 (2003).
161. Cougot, N., Babajko, S. & Séraphin, B. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* **165**, 31–40 (2004).
162. Brengues, M., Teixeira, D. & Parker, R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**, 486–489 (2005).
163. Buchan, J. R. mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol.* **11**, 1019–1030 (2014).
164. Garneau, N. L., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 113–126 (2007).

165. Mitchell, S. F. & Parker, R. Principles and Properties of Eukaryotic mRNPs. *Mol. Cell* **54**, 547–558 (2014).
166. Fenger-Grøn, M., Fillman, C., Norrild, B. & Lykke-Andersen, J. Multiple Processing Body Factors and the ARE Binding Protein TTP Activate mRNA Decapping. *Mol. Cell* **20**, 905–915 (2005).
167. Chu, C.-Y. & Rana, T. M. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* **4**, e210 (2006).
168. Behm-Ansmant, I. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* **20**, 1885–1898 (2006).
169. Liu, J. *et al.* A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1261–1266 (2005).
170. Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. & Parker, R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 719–723 (2005).
171. Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J. & Parker, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* **20**, 515–524 (2006).
172. Wilczynska, A., Weil, D., Aigueperse, C., Kress, M. & Dautry, F. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* **118**, 981–992 (2005).
173. Collier, J. & Parker, R. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* **122**, 875–886 (2005).
174. Gowrishankar, G. *et al.* Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. *Biol. Chem.* **387**, 323–327 (2006).
175. Nicholson, P. *et al.* Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **67**, 677–700 (2010).
176. Yu, J. H., Yang, W.-H., Gulick, T., Bloch, K. D. & Bloch, D. B. Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA N. Y. N* **11**, 1795–1802 (2005).
177. Yang, Z. *et al.* GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J. Cell Sci.* **117**, 5567–5578 (2004).
178. Decker, C. J., Teixeira, D. & Parker, R. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **179**, 437–449 (2007).
179. Teixeira, D. & Parker, R. Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2274–2287 (2007).
180. Jonas, S. & Izaurralde, E. The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev.* **27**, 2628–2641 (2013).
181. King, O. D., Gitler, A. D. & Shorter, J. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Res.* **1462**, 61–80 (2012).
182. Toombs, J. A. *et al.* De novo design of synthetic prion domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 6519–6524 (2012).
183. Mitchell, S. F., Jain, S., She, M. & Parker, R. Global analysis of yeast mRNPs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 127–133 (2012).
184. Kedersha, N., Ivanov, P. & Anderson, P. Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem. Sci.* **38**, 494–506 (2013).
185. Anderson, P. & Kedersha, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 141–150 (2008).
186. Nover, L., Scharf, K. D. & Neumann, D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1648–1655 (1983).
187. Harding, H. P. *et al.* Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**, 1099–1108 (2000).
188. Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. & Anderson, P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **147**, 1431–1442 (1999).

189. Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081–1086 (2011).
190. Dewey, C. M. *et al.* TDP-43 Is Directed to Stress Granules by Sorbitol, a Novel Physiological Osmotic and Oxidative Stressor. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1098–1108 (2011).
191. Buchan, J. R., Yoon, J.-H. & Parker, R. Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **124**, 228–239 (2011).
192. Hofmann, S., Cherkasova, V., Bankhead, P., Bukau, B. & Stoecklin, G. Translation suppression promotes stress granule formation and cell survival in response to cold shock. *Mol. Biol. Cell* **23**, 3786–3800 (2012).
193. Kedersha, N. *et al.* Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* **169**, 871–884 (2005).
194. Bartoli, K. M., Bishop, D. L. & Saunders, W. S. The Role of Molecular Microtubule Motors and the Microtubule Cytoskeleton in Stress Granule Dynamics. *Int. J. Cell Biol.* **2011**, 1–9 (2011).
195. Hoyle, N. P., Castelli, L. M., Campbell, S. G., Holmes, L. E. A. & Ashe, M. P. Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *J. Cell Biol.* **179**, 65–74 (2007).
196. Anderson, P. & Kedersha, N. Stressful initiations. *J. Cell Sci.* **115**, 3227–3234 (2002).
197. Buchan, J. R. & Parker, R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell* **36**, 932–941 (2009).
198. Mollet, S. *et al.* Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4469–4479 (2008).
199. Arimoto, K., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Saito, H. & Takekawa, M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1324–1332 (2008).
200. Kim, W. J., Back, S. H., Kim, V., Ryu, I. & Jang, S. K. Sequestration of TRAF2 into Stress Granules Interrupts Tumor Necrosis Factor Signaling under Stress Conditions. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2450–2462 (2005).
201. Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I. & Filipowicz, W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**, 1111–1124 (2006).
202. Papadopoulou, C., Ganou, V., Patrino-Georgoula, M. & Gualis, A. HuR-hnRNP interactions and the effect of cellular stress. *Mol. Cell. Biochem.* **372**, 137–147 (2013).
203. Wek, S. A., Zhu, S. & Wek, R. C. The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4497–4506 (1995).
204. McEwen, E. *et al.* Heme-regulated Inhibitor Kinase-mediated Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Inhibits Translation, Induces Stress Granule Formation, and Mediates Survival upon Arsenite Exposure. *J. Biol. Chem.* **280**, 16925–16933 (2005).
205. Srivastava, S. P., Kumar, K. U. & Kaufman, R. J. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 2416–2423 (1998).
206. Kedersha, N. *et al.* Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA^{Met})-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell* **13**, 195–210 (2002).
207. Williams, B. R. Signal integration via PKR. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2001**, re2 (2001).
208. Kedersha, N. *et al.* Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **151**, 1257–1268 (2000).
209. Hua, Y. & Zhou, J. Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules. *FEBS Lett.* **572**, 69–74 (2004).
210. Colombrita, C. *et al.* TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J. Neurochem.* **111**, 1051–1061 (2009).

211. Liu-Yesucevitz, L. *et al.* Tar DNA Binding Protein-43 (TDP-43) Associates with Stress Granules: Analysis of Cultured Cells and Pathological Brain Tissue. *PLoS ONE* **5**, e13250 (2010).
212. McDonald, K. K. *et al.* TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1400–1410 (2011).
213. Gilks, N. *et al.* Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5383–5398 (2004).
214. Grousl, T. *et al.* Robust heat shock induces eIF2 -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **122**, 2078–2088 (2009).
215. Thomas, M. G., Tosar, L. J. M., Desbats, M. A., Leishman, C. C. & Boccaccio, G. L. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J. Cell Sci.* **122**, 563–573 (2009).
216. Martel, C. *et al.* Multimerization of Staufen1 in live cells. *RNA* **16**, 585–597 (2010).
217. Cherkasov, V. *et al.* Coordination of translational control and protein homeostasis during severe heat stress. *Curr. Biol. CB* **23**, 2452–2462 (2013).
218. Buchan, J. R., Kolaitis, R.-M., Taylor, J. P. & Parker, R. Eukaryotic Stress Granules Are Cleared by Autophagy and Cdc48/VCP Function. *Cell* **153**, 1461–1474 (2013).
219. Anderson, P. RNA granules. *J. Cell Biol.* **172**, 803–808 (2006).
220. Hüttelmaier, S. *et al.* Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**, 512–515 (2005).
221. Park, H. Y. *et al.* Visualization of Dynamics of Single Endogenous mRNA Labeled in Live Mouse. *Science* **343**, 422–424 (2014).
222. Zeitelhofer, M. *et al.* Dynamic Interaction between P-Bodies and Transport Ribonucleoprotein Particles in Dendrites of Mature Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* **28**, 7555–7562 (2008).
223. Thomas, M. G. *et al.* Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol. Biol. Cell* **16**, 405–420 (2005).
224. Keene, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 533–543 (2007).
225. Kato, M. *et al.* Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell* **149**, 753–767 (2012).
226. Han, T. W. *et al.* Cell-free Formation of RNA Granules: Bound RNAs Identify Features and Components of Cellular Assemblies. *Cell* **149**, 768–779 (2012).
227. Rajgor, D. & Shanahan, C. M. RNA granules and cytoskeletal links. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1206–1210 (2014).
228. von Mikecz, A. Pathology and function of nuclear amyloid: Protein homeostasis matters. *Nucleus* **5**, 311–317 (2014).
229. Eisenberg, D. & Jucker, M. The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell* **148**, 1188–1203 (2012).
230. Ramaswami, M., Taylor, J. P. & Parker, R. Altered Ribostasis: RNA-Protein Granules in Degenerative Disorders. *Cell* **154**, 727–736 (2013).
231. Aguzzi, A. & Calella, A. M. Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases. *Physiol. Rev.* **89**, 1105–1152 (2009).
232. Johnson, B. S. *et al.* TDP-43 Is Intrinsically Aggregation-prone, and Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked Mutations Accelerate Aggregation and Increase Toxicity. *J. Biol. Chem.* **284**, 20329–20339 (2009).
233. Bentmann, E. *et al.* Requirements for Stress Granule Recruitment of Fused in Sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43). *J. Biol. Chem.* **287**, 23079–23094 (2012).
234. Kim, H. J. *et al.* Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* **495**, 467–473 (2013).
235. Ling, S.-C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Converging Mechanisms in ALS and FTD: Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* **79**, 416–438 (2013).

236. Wolozin, B. Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **7**, 56–56 (2012).
237. Vanderweyde, T. *et al.* Contrasting Pathology of the Stress Granule Proteins TIA-1 and G3BP in Tauopathies. *J. Neurosci.* **32**, 8270–8283 (2012).
238. Bosco, D. A. *et al.* Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4160–4175 (2010).
239. Vanderweyde, T., Youmans, K., Liu-Yesucevitz, L. & Wolozin, B. Role of Stress Granules and RNA-Binding Proteins in Neurodegeneration: A Mini-Review. *Gerontology* **59**, 524–533 (2013).
240. Waelter, S. *et al.* Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1393–1407 (2001).
241. Thomas, M., Alegre-Abarrategui, J. & Wade-Martins, R. RNA dysfunction and aggregopathy at the centre of an amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia disease continuum. *Brain* **136**, 1345–1360 (2013).
242. Fornai, F. *et al.* Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2052–2057 (2008).
243. Zhang, X. *et al.* mTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* **10**, 588–602 (2014).
244. Liu-Yesucevitz, L. *et al.* Local RNA Translation at the Synapse and in Disease. *J. Neurosci.* **31**, 16086–16093 (2011).
245. Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett.* **399**, 344–349 (1996).
246. Hoover, B. R. *et al.* Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron* **68**, 1067–1081 (2010).
247. Alami, N. H. *et al.* Axonal Transport of TDP-43 mRNA Granules Is Impaired by ALS-Causing Mutations. *Neuron* **81**, 536–543 (2014).
248. Goggin, K., Beaudoin, S., Grenier, C., Brown, A.-A. & Roucou, X. Prion protein aggresomes are poly(A)⁺ ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1783**, 479–491 (2008).
249. Kim, H.-J. *et al.* Therapeutic modulation of eIF2 α phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models. *Nat. Genet.* **46**, 152–160 (2013).
250. Ritson, G. P. *et al.* TDP-43 Mediates Degeneration in a Novel Drosophila Model of Disease Caused by Mutations in VCP/p97. *J. Neurosci.* **30**, 7729–7739 (2010).
251. Parker, S. J. *et al.* Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates. *Neurochem. Int.* **60**, 415–424 (2012).
252. Lavut, A. & Raveh, D. Sequestration of Highly Expressed mRNAs in Cytoplasmic Granules, P-Bodies, and Stress Granules Enhances Cell Viability. *PLoS Genet.* **8**, e1002527 (2012).
253. Boyce, M. *et al.* A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **307**, 935–939 (2005).
254. Guevara-García, M., Gil-del Valle, L., Velásquez-Pérez, L. & García-Rodríguez, J. C. Oxidative stress as a cofactor in spinocerebellar ataxia type 2. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* **17**, 84–89 (2012).
255. Adibhatla, R. M. & Hatcher, J. F. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 125–169 (2010).
256. Jiang, H.-Y. *et al.* Phosphorylation of the Subunit of Eukaryotic Initiation Factor 2 Is Required for Activation of NF- κ B in Response to Diverse Cellular Stresses. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5651–5663 (2003).
257. Masuda, K., Marasa, B., Martindale, J. L., Halushka, M. K. & Gorospe, M. Tissue- and age-dependent expression of RNA-binding proteins that influence mRNA turnover and translation. *Aging* **1**, 681 (2009).

258. Krobitsch, S. & Lindquist, S. Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 1589–1594 (2000).
259. Muchowski, P. J., Ning, K., D'Souza-Schorey, C. & Fields, S. Requirement of an intact microtubule cytoskeleton for aggregation and inclusion body formation by a mutant huntingtin fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 727–732 (2002).
260. Ehrnhoefer, D. E., Sutton, L. & Hayden, M. R. Small Changes, Big Impact: Posttranslational Modifications and Function of Huntingtin in Huntington Disease. *The Neuroscientist* **17**, 475–492 (2011).
261. Duennwald, M. L. Polyglutamine misfolding in yeast: Toxic and protective aggregation. *Prion* **5**, 285–290 (2011).
262. Günther, A. Funktionelle Charakterisierung von Ataxin-2 Isoformen und Prozessierungsprodukten (Masterarbeit, unveröffentlicht). (2013).
263. Huh, W.-K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691 (2003).
264. Mumberg, D., Müller, R. & Funk, M. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5767 (1994).
265. Johnson, B. S., McCaffery, J. M., Lindquist, S. & Gitler, A. D. A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 6439–6444 (2008).
266. Meriin, A. B. *et al.* Huntingtin toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J. Cell Biol.* **157**, 997–1004 (2002).
267. Raynes, R. *et al.* The SIRT1 Modulators AROS and DBC1 Regulate HSF1 Activity and the Heat Shock Response. *PLoS ONE* **8**, e54364 (2013).
268. Welzel, F. *et al.* FOX-2 Dependent Splicing of Ataxin-2 Transcript Is Affected by Ataxin-1 Overexpression. *PLoS ONE* **7**, e37985 (2012).
269. Wang, X., Spandidos, A., Wang, H. & Seed, B. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1144–D1149 (2012).
270. Welzel, F. Untersuchungen zur Rolle von Fox-2 in den Spinozerebellären Ataxien Typ 2 und Typ 1. (Freie Universität Berlin, 2011).
271. Shoemaker, D. D., Lashkari, D. A., Morris, D., Mittmann, M. & Davis, R. W. Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nat. Genet.* **14**, 450–456 (1996).
272. Cox, J. *et al.* Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **13**, 2513–2526 (2014).
273. Tyanova, S. *et al.* Proteomic maps of breast cancer subtypes. *Nat. Commun.* **7**, 10259 (2016).
274. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
275. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* **43**, D447–D452 (2015).
276. The Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res.* **43**, D1049–D1056 (2015).
277. Mi, H., Poudel, S., Muruganujan, A., Casagrande, J. T. & Thomas, P. D. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **44**, D336–D342 (2016).
278. Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provar, N. & Moses, A. M. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* **10**, 202 (2009).
279. Li, W. *et al.* The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* **43**, W580–W584 (2015).
280. Huang, X. & Miller, W. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* **12**, 337–357 (1991).

281. Winderickx, J. *et al.* Protein folding diseases and neurodegeneration: Lessons learned from yeast. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1783**, 1381–1395 (2008).
282. Outeiro, T. F. & Lindquist, S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science* **302**, 1772–1775 (2003).
283. Bonanomi, M., Visentin, C., Invernizzi, G., Tortora, P. & Regonesi, M. E. The Toxic Effects of Pathogenic Ataxin-3 Variants in a Yeast Cellular Model. *PLOS ONE* **10**, e0129727 (2015).
284. Greenfield, J. P., Xu, H., Greengard, P., Gandy, S. & Seeger, M. Generation of the Amyloid- β Peptide N Terminus in *Saccharomyces cerevisiae* Expressing Human Alzheimer's Amyloid- β Precursor Protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 33843–33846 (1999).
285. Bagriantsev, S. & Liebman, S. Modulation of A β 42 low-n oligomerization using a novel yeast reporter system. *BMC Biol.* **4**, 1 (2006).
286. Bharadwaj, P., Waddington, L., Varghese, J. & Macreadie, I. G. A new method to measure cellular toxicity of non-fibrillar and fibrillar Alzheimer's A β using yeast. *J. Alzheimers Dis. JAD* **13**, 147–150 (2008).
287. Armakola, M., Hart, M. P. & Gitler, A. D. TDP-43 toxicity in yeast. *Methods* **53**, 238–245 (2011).
288. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 231–241 (2008).
289. Drescher, C. Untersuchungen zur Expression von Ataxin-2 in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Masterarbeit, unveröffentlicht). (2013).
290. Chen, C.-Y. A. & Shyu, A.-B. Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2**, 167–183 (2011).
291. Mittal, S., Aslam, A., Doidge, R., Medica, R. & Winkler, G. S. The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4–Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence. *Mol. Biol. Cell* **22**, 748–758 (2011).
292. Aslam, A., Mittal, S., Koch, F., Andrau, J.-C. & Winkler, G. S. The Ccr4–NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3840–3850 (2009).
293. Pfaffl, M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* **1**, 92–5 (2004).
294. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
295. Rouya, C. *et al.* Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *RNA* **20**, 1398–1409 (2014).
296. Costanzo, M. *et al.* The genetic landscape of a cell. *Science* **327**, 425–431 (2010).
297. Wilmes, G. M. *et al.* A genetic interaction map of RNA-processing factors reveals links between Sem1/Dss1-containing complexes and mRNA export and splicing. *Mol. Cell* **32**, 735–746 (2008).
298. Hoppins, S. *et al.* A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J. Cell Biol.* **195**, 323–340 (2011).
299. Douglas, A. C. *et al.* Functional Analysis With a Barcoder Yeast Gene Overexpression System. *Genes Genomes Genet.* **2**, 1279–1289 (2012).
300. Decourty, L. *et al.* Linking functionally related genes by sensitive and quantitative characterization of genetic interaction profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5821–5826 (2008).
301. Vembar, S. S., Jonikas, M. C., Hendershot, L. M., Weissman, J. S. & Brodsky, J. L. J Domain Co-chaperone Specificity Defines the Role of BiP during Protein Translocation. *J. Biol. Chem.* **285**, 22484–22494 (2010).
302. Figley, M. D., Bieri, G., Kolaitis, R.-M., Taylor, J. P. & Gitler, A. D. Profilin 1 Associates with Stress Granules and ALS-Linked Mutations Alter Stress Granule Dynamics. *J. Neurosci.* **34**, 8083–8097 (2014).

303. Armakola, M. *et al.* Inhibition of RNA lariat debranching enzyme suppresses TDP-43 toxicity in ALS disease models. *Nat. Genet.* **44**, 1302–1309 (2012).
304. Pan, X. *et al.* A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **124**, 1069–1081 (2006).
305. Stirling, P. C. *et al.* The Complete Spectrum of Yeast Chromosome Instability Genes Identifies Candidate CIN Cancer Genes and Functional Roles for ASTRA Complex Components. *PLoS Genet.* **7**, e1002057 (2011).
306. Cohen, M., Stutz, F. & Dargemont, C. Deubiquitination, a New Player in Golgi to Endoplasmic Reticulum Retrograde Transport. *J. Biol. Chem.* **278**, 51989–51992 (2003).
307. Bentley, N. J., Fitch, I. T. & Tuite, M. F. The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast Chichester Engl.* **8**, 95–106 (1992).
308. Neumann, M. *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **314**, 130–133 (2006).
309. Mason, R. P. & Giorgini, F. Modeling Huntington disease in yeast: Perspectives and future directions. *Prion* **5**, 269–276 (2011).
310. Collinge, J. & Clarke, A. R. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* **318**, 930–936 (2007).
311. Dubey, J., Ratnakaran, N. & Koushika, S. P. Neurodegeneration and microtubule dynamics: death by a thousand cuts. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).
312. Kato, K., Yamamoto, Y. & Izawa, S. Severe ethanol stress induces assembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **28**, 339–347 (2011).
313. Smith, T. F. & Waterman, M. S. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* **147**, 195–197 (1981).
314. Vavouri, T., Semple, J. I., Garcia-Verdugo, R. & Lehner, B. Intrinsic Protein Disorder and Interaction Promiscuity Are Widely Associated with Dosage Sensitivity. *Cell* **138**, 198–208 (2009).
315. Treusch, S. & Lindquist, S. An intrinsically disordered yeast prion arrests the cell cycle by sequestering a spindle pole body component. *J. Cell Biol.* **197**, 369–379 (2012).
316. Jiménez-López, D. & Guzmán, P. Insights into the evolution and domain structure of ataxin-2 proteins across eukaryotes. *BMC Res. Notes* **7**, 453 (2014).
317. 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.* **20**, 104–114 (2011).
318. Tarlac, V. *et al.* Inclusion formation by ataxins -1, -2, -3, and -7. *Int. J. Neurosci.* **117**, 1289–1314 (2007).
319. Al-Ramahi, I. *et al.* dAtaxin-2 Mediates Expanded Ataxin-1-Induced Neurodegeneration in a *Drosophila* Model of SCA1. *PLoS Genet.* **3**, e234 (2007).
320. Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* **19**, R46–R64 (2010).
321. Ito, D. & Suzuki, N. Conjoint pathologic cascades mediated by ALS/FTLD-U linked RNA-binding proteins TDP-43 and FUS. *Neurology* **77**, 1636–1643 (2011).
322. Sephton, C. F. *et al.* Identification of Neuronal RNA Targets of TDP-43-containing Ribonucleoprotein Complexes. *J. Biol. Chem.* **286**, 1204–1215 (2011).
323. Hart, M. P., Brettschneider, J., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q. & Gitler, A. D. Distinct TDP-43 pathology in ALS patients with ataxin 2 intermediate-length polyQ expansions. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **124**, 221–230 (2012).
324. Krogan, N. J. *et al.* Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**, 637–643 (2006).
325. Tam, S., Geller, R., Spiess, C. & Frydman, J. The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1155–1162 (2006).
326. Werner-Washburne, M., Becker, J., Kosic-Smithers, J. & Craig, E. A. Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *J. Bacteriol.* **171**, 2680–2688 (1989).

327. Haslbeck, M. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* **18**, 6744–6751 (1999).
328. Praekelt, U. M. & Meacock, P. A. HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of structure, regulation and function. *MGG Mol. Gen. Genet.* **223**, 97–106 (1990).
329. Sanchez, Y. & Lindquist, S. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**, 1112–1115 (1990).
330. Horton, L. E., James, P., Craig, E. A. & Hensold, J. O. The yeast hsp70 homologue Ssa is required for translation and interacts with Sis1 and Pab1 on translating ribosomes. *J. Biol. Chem.* **276**, 14426–14433 (2001).
331. Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A. & Lindquist, S. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**, 475–478 (1994).
332. Glover, J. R. & Lindquist, S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40. *Cell* **94**, 73–82 (1998).
333. Vacher, C. Overexpression of yeast hsp104 reduces polyglutamine aggregation and prolongs survival of a transgenic mouse model of Huntington’s disease. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3425–3433 (2005).
334. Gokhale, K. C., Newnam, G. P., Sherman, M. Y. & Chernoff, Y. O. Modulation of Prion-dependent Polyglutamine Aggregation and Toxicity by Chaperone Proteins in the Yeast Model. *J. Biol. Chem.* **280**, 22809–22818 (2005).
335. Patino, M. M., Liu, J. J., Glover, J. R. & Lindquist, S. Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science* **273**, 622–626 (1996).
336. Moriyama, H., Edskes, H. K. & Wickner, R. B. [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8916–8922 (2000).
337. Kryndushkin, D. S., Engel, A., Edskes, H. & Wickner, R. B. Molecular Chaperone Hsp104 Can Promote Yeast Prion Generation. *Genetics* **188**, 339–348 (2011).

9. Abkürzungen

A2L	Ataxin-2-Like Protein
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
AG	Arbeitsgruppe
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AS	Aminosäure(n)
bzw.	beziehungsweise
cAtx2	Ataxin-2-Ortholog in <i>C. elegans</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHX	Cycloheximid
d. h.	das heißt
dAtx2	Ataxin-2-Ortholog in <i>D. melanogaster</i>
DB	Datenbank
FTLD(-T)(-tau)	Frontotemporallappen-Degeneration (TDP-43 assoziiert)(tau-assoziiert)
GA	Golgi-Apparat
Gal	Galaktose
GFP	Grün fluoreszierendes Protein(-Tag)
Glc	Glucose
GO	<i>Gene Ontology</i>
gt	Ziege
H	Histidin
HK	Huntington-Krankheit
Htt	Huntingtin
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
(k)bp	(Kilo-)Basenpaare
Kd	siRNA-Knockdown(s)
kDa	Kilo-Dalton
KO	Gen-Knockout
LSm	<i>Like-Sm</i>
LSm-AD	<i>Like-Sm</i> -assoziierte Domäne
m	Maus
mAtx-2	Ataxin-2-Ortholog in <i>M. musculus</i>
mCh	mCherry(-Tag)
miRNA	Mikro-RNA
mRNA	messenger RNA(s)
mRNP	messenger Ribonukleoprotein-Partikel
MS	Massenspektrometrie

MTOZ	Mikrotubuli-Organisationszentrum
NIE	Neuronale intranukleäre Einschlüsse
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA-decay</i> (Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau)
NTG	Neuronale Transport-Granula
o. g.	oben genannt(-e), (-er), (-es)
OD₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
(p)DNA	(Plasmid-)Desoxyribonukleinsäure
PABP	Poly(A)-Bindepotein
PAM2	Poly(A)-Bindepotein-Interaktionsmotiv
PB	P-Body/ P-Bodies
PBP1	Poly(A)-Bindepotein bindendes Protein 1 (<i>Ataxin-2</i> -Ortholog in <i>S. cerevisiae</i>)
(qRT-)PCR	(quantitative Reverse Transkriptase-)Polymerase Kettenreaktion
(r)ER	(raues) Endoplasmatisches Retikulum
rb	Kaninchen
RBP	RNA-Bindepotein
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RRM	<i>RNA-recognition motif</i> (-Erkennungsmotiv)
RS	Redstar™-Fluoreszenz-Tag
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SG	Stress-Granula
siRNA	<i>small interfering</i> (kleine interferierende) RNA(s)
TRE	Trinukleotid-Repeat-Erkrankungen
u. a.	unter anderem
U	Uracil
UTR	Untranslatierte Region
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
Y2H	<i>Yeast-2-Hybrid</i> (Hefe-Zwei-Hybrid)

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, 12. Dezember 2016

Gunnar Seidel

Anhang 1 MS-Daten

Tab. A1a Liste der allein im Δ BPB1-DB-Deletionsstamm abwärts regulierten Proteine

Δ BPB1-DB/BY4741 (abwärts regulierte Proteine; LFQ-Quotient < 0,67)		
Gen-Symbol	Gen-Name	LFQ-Quotient
ACH1	Acetyl-CoA hydrolase	0,183
AIM3	Altered inheritance of mitochondria protein 3	0,590
AIM9	Altered inheritance of mitochondria protein 9, mitochondrial	0,580
ARC18	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	0,444
BLM10	Proteasome activator BLM10	0,216
BNI4	Protein BNI4	0,643
CIT1	Citrate synthase, mitochondrial	0,669
CYC1	Cytochrome c iso-1	0,551
CYT1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	0,524
DBP9	ATP-dependent RNA helicase DBP9	0,599
DDI1	DNA damage-inducible protein 1	0,631
DDP1	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase DDP1	0,619
DDR48	Stress protein DDR48	0,570
DFG5	Mannan endo-1,6-alpha-mannosidase DFG5	0,521
DIP2	U3 small nucleolar RNA-associated protein 12	0,615
DLD1	D-lactate dehydrogenase [cytochrome] 1, mitochondrial	0,586
DSS4	Protein DSS4	0,494
DUG2	Probable di- and tripeptidase DUG2	0,623
EMC2	ER membrane protein complex subunit 2	0,635
FDC1	Ferulic acid decarboxylase 1	0,565
GCY1	Protein GCY	0,639
GLK1	Glucokinase-1	0,642
GPH1	Glycogen phosphorylase	0,617
GRE2	NADPH-dependent methylglyoxal reductase GRE2	0,545
GUT2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	0,519
HEF3	Elongation factor 3B	0,575
HLJ1	Protein HLJ1	0,527
HMG1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1	0,601
HSP104	Heat shock protein 104	0,575
HSP12	12 kDa heat shock protein	0,586
HSP150	Cell wall mannoprotein HSP150	0,604
HSP26	Heat shock protein 26	0,401
HSP42	Heat shock protein 42	0,386
HSP78	Heat shock protein 78, mitochondrial	0,289
IVY1	Protein IVY1	0,509
KEL1	Kelch repeat-containing protein 1	0,616
KXD1	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit KXD1	0,608
MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	0,617
MED4	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 4	0,483
MIC17	Mitochondrial intermembrane space cysteine motif-containing protein MIC17	0,441
MKC7	Aspartic proteinase MKC7	0,461
MLS1	Malate synthase 1, glyoxysomal	0,222
NAS2	Probable 26S proteasome regulatory subunit p27	0,458
NDI1	Rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	0,567
NMA111	Pro-apoptotic serine protease NMA111	0,593
NUP159	Nucleoporin NUP159	0,630
NUT2	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 10	0,361
OM45	Mitochondrial outer membrane protein OM45	0,303
OMP1	5-oxoprolinase	0,635
PAM16	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM16	0,489
PBS2	MAP kinase kinase PBS2	0,653
PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	0,112
PHO3	Constitutive acid phosphatase	0,556
PHO5	Repressible acid phosphatase	0,269
PRE4	Proteasome subunit beta type-7	0,655
PST1	Cell wall mannoprotein PST1	0,498
PUF6	Pumilio homology domain family member 6	0,608
RIM1	Single-stranded DNA-binding protein RIM1, mitochondrial	0,589
RNQ1	[PIN+] prion protein RNQ1	0,321
ROK1	ATP-dependent RNA helicase ROK1	0,649
RPL30	60S ribosomal protein L30	0,670
RPL31B	60S ribosomal protein L31-B	0,548
RPL39	60S ribosomal protein L39	0,466
RPL42B	60S ribosomal protein L42-B;60S ribosomal protein L42-A	0,357

ΔPBP1-DB/BY4741 (abwärts regulierte Proteine; LFQ-Quotient < 0,67) Fortsetzung		
RPP1A	60S acidic ribosomal protein P1-alpha	0,181
RPS30B	40S ribosomal protein S30-B;40S ribosomal protein S30-A	0,514
RPS5	40S ribosomal protein S5	0,649
RRP3	ATP-dependent rRNA helicase RRP3	0,651
RTN2	Reticulon-like protein 2	0,614
RUB1	NEDD8-like protein RUB1	0,502
SAP190	SIT4-associating protein SAP190	0,633
SDH1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	0,651
SDH2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	0,461
SEC65	Signal recognition particle subunit SEC65	0,644
SEC7	Protein transport protein SEC7	0,549
SIA1	Protein SIA1	0,656
SKN7	Transcription factor SKN7	0,587
SLK19	Kinetochores protein SLK19	0,587
SNF5	SWI/SNF chromatin-remodeling complex subunit SNF5	0,629
SQT1	Ribosome assembly protein SQT1	0,522
SRN2	Protein SRN2	0,440
SSA4	Heat shock protein SSA4	0,667
SVL3	Styryl dye vacuolar localization protein 3	0,492
Tat-D	Deoxyribonuclease Tat-D	0,580
TDA3	Putative oxidoreductase TDA3	0,663
TMT1	Trans-aconitate 3-methyltransferase	0,355
TSL1	Trehalose synthase complex regulatory subunit TSL1	0,613
UBC4	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 4	0,496
UTP7	U3 small nucleolar RNA-associated protein 7	0,608
VAN1	Mannan polymerase I complex VAN1 subunit	0,566
VPS60	Vacuolar protein-sorting-associated protein 60	0,661
VTS1	Protein VTS1	0,656
XRN1	5-3 exoribonuclease 1	0,623
YCL042W	Putative uncharacterized protein YCL042W	0,439
YDL124W	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase	0,613
YFR006W	Uncharacterized peptidase YFR006W	0,653
YFR016C	Uncharacterized protein YFR016C	0,649
YGL159W	Uncharacterized protein YGL159W	0,607
YGP1	Protein YGP1	0,300
YLR146W-A	Coiled-coil domain-containing protein YLR146W-A	0,457
YOP1	Protein YOP1	0,309
YOR052C	AN1-type zinc finger protein YOR052C	0,659
YOR238W	Uncharacterized protein YOR238W	0,539
YPL199C	Smr domain-containing protein YPL199C	0,616
YPR036W-A	Uncharacterized protein YPR036W-A	0,335
YPR114W	Uncharacterized TLC domain-containing protein YPR114W	0,629
ZTA1	Probable quinone oxidoreductase	0,492

Tab. A1b Liste der allein im ΔPBP1-DB-Deletionsstamm aufwärts regulierten Proteine

ΔPBP1-DB/BY4741 (aufwärts regulierte Proteine; > 1,5)		
Gen-Symbol	Gen-Name	LFQ-Quotient
ACO2	Probable aconitate hydratase 2	1,642
ADA2	Transcriptional adapter 2	1,794
ADE12	Adenylosuccinate synthetase	1,525
AIM29	Altered inheritance rate of mitochondria protein 29	1,775
ALT1	Probable alanine aminotransferase, mitochondrial	1,540
APS3	AP-3 complex subunit sigma	3,596
ARG8	Acetylornithine aminotransferase, mitochondrial	1,693
ARP5	Actin-related protein 5	1,881
ARP7	Actin-related protein 7	1,741
ATP11	Protein ATP11, mitochondrial	1,602
BNA1	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	1,899
BNA5	Kynureninase	1,817
BOI1	Protein BOB1	2,007
BRE5	UBP3-associated protein BRE5	1,571
BUD22	Bud site selection protein 22	1,619
BUL1	Ubiquitin ligase-binding protein BUL1	1,594
CAB3	Coenzyme A biosynthesis protein 3	1,578
CAB4	Phosphopantetheine adenylyltransferase	1,722
CAD1	AP-1-like transcription activator YAP2	2,447
CAF20	Cap-associated protein CAF20	2,808
CCP1	Cytochrome c peroxidase, mitochondrial	1,686
CDC34	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-34 kDa	2,129

ΔPBP1-DB/BY4741 (aufwärts regulierte Proteine; > 1,5) Fortsetzung

CDC73	Cell division control protein 73	2,235
CDC8	Thymidylate kinase	2,706
YJL171C	Cell wall protein YJL171C	1,533
CFT1	Protein CFT1	1,785
CHD1	Chromo domain-containing protein 1	2,347
CHS1	Chitin synthase 1	2,095
CHZ1	Histone H2A.Z-specific chaperone CHZ1	1,977
CIR2	Probable electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	1,711
CKB2	Casein kinase II subunit beta	2,163
CLC1	Clathrin light chain	1,511
CMS1	Protein CMS1	1,812
CNA1	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit A1	1,596
COA4	Cytochrome oxidase assembly factor 4	1,735
COF1	Cofilin	1,773
COQ5	2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase, mitochondrial	1,525
CRP1	Cruciform DNA-recognizing protein 1;CRP1 short N-terminal subpeptide;CRP1 short C-terminal subpeptide	1,733
CSE1	Importin alpha re-exporter	1,514
CSR1	Phosphatidylinositol transfer protein CSR1	1,774
CTR9	RNA polymerase-associated protein CTR9	1,910
DCP2	mRNA-decapping enzyme subunit 2	1,569
DFM1	DER1-like family member protein 1	2,384
DIB1	Spliceosomal protein DIB1	1,834
DIM1	Dimethyladenosine transferase	2,021
DNF1	Phospholipid-transporting ATPase DNF1	1,993
DPH2	Diphthamide biosynthesis protein 2	1,516
DUT1	Deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase	1,529
DYN2	Dynein light chain 1, cytoplasmic	2,527
ECM14	Putative metalloproteinase ECM14	1,654
ELC1	Elongin-C	2,266
EMG1	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1	2,012
EMP47	Protein EMP47	1,662
EMW1	Essential for maintenance of the cell wall protein 1	1,548
ENA1	Sodium transport ATPase 1	1,748
END3	Actin cytoskeleton-regulatory complex protein END3	1,620
ENP1	Essential nuclear protein 1	2,063
ENP2	Ribosome biogenesis protein ENP2	1,912
ERG1	Squalene monooxygenase	1,999
ERG2	C-8 sterol isomerase	2,150
ERG27	3-keto-steroid reductase	1,599
ERG5	Cytochrome P450 61	2,065
ESF2	Pre-rRNA-processing protein ESF2	2,124
FAA4	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	1,559
FAR8	Factor arrest protein 8	2,416
GCD10	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6	1,599
GCD7	Translation initiation factor eIF-2B subunit beta	2,205
GDT1	GCR1-dependent translation factor 1	1,673
GIR2	Protein GIR2	1,991
GLT1	Glutamate synthase [NADH]	1,627
GNP1	High-affinity glutamine permease	1,743
GOS1	Golgi SNAP receptor complex member 1	1,609
GPI16	GPI transamidase component GPI16	1,947
GPM3	Phosphoglycerate mutase 3	1,909
GRH1	GRASP65 homolog protein 1	1,695
HBS1	Elongation factor 1 alpha-like protein	1,600
HEM13	Coproporphyrinogen-III oxidase	2,297
HEM3	Porphobilinogen deaminase	1,537
HGH1	FAM203 family protein HGH1	2,150
HOC1	Putative glycosyltransferase HOC1	2,421
HOG1	Mitogen-activated protein kinase HOG1	1,705
HOS3	Histone deacetylase HOS3	2,482
HPR1	THO complex subunit HPR1	2,398
IMD2	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 2	2,432
IRC25	Proteasome chaperone 3	1,661
JJJ3	Diphthamide biosynthesis protein 4	1,505
JSN1	Protein JSN1	1,748
KAP104	Importin subunit beta-2	1,633
KCS1	Inositol hexakisphosphate kinase 1	1,896
LAC1	Sphingosine N-acyltransferase LAC1	1,573
LEU1	3-isopropylmalate dehydratase	1,928

ΔPBP1-DB/BY4741 (aufwärts regulierte Proteine; > 1,5) Fortsetzung

LEU9	2-isopropylmalate synthase 2, mitochondrial	2,463
MAK31	N-alpha-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit	1,577
MEH1	Protein MEH1	2,220
MET16	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	1,776
MIT1	Transcriptional regulator MIT1	1,526
MKT1	Protein MKT1	2,026
MNN11	Probable alpha-1,6-mannosyltransferase MNN11	1,597
MRPL13	54S ribosomal protein L13, mitochondrial	1,520
NAT5	N-terminal acetyltransferase A complex subunit NAT5	1,674
NMD3	60S ribosomal export protein NMD3	1,560
NOC3	Nucleolar complex-associated protein 3	1,524
NOP10	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	2,344
NOP13	Nucleolar protein 13	1,510
NOP53	Ribosome biogenesis protein NOP53	1,527
NOT5	General negative regulator of transcription subunit 5	1,807
NPA3	GTPase NPA3	1,830
NRP1	Asparagine-rich protein	2,344
OAC1	Mitochondrial oxaloacetate transport protein	2,067
PCC1	Polarized growth chromatin-associated controller 1	1,603
PEP8	Carboxypeptidase Y-deficient protein 8	1,815
PET191	Mitochondrial protein PET191	2,124
PFY1	Profilin	1,500
PHO86	Inorganic phosphate transporter PHO86	1,641
PHO91	Low-affinity phosphate transporter PHO91	1,627
PLP2	Phosducin-like protein 2	2,016
PMT4	Dolichyl-phosphate-mannose--protein mannosyltransferase 4	2,441
POF1	Promoter of filamentation protein 1	1,558
POM152	Nucleoporin POM152	1,661
ARG5,6	Protein ARG5,6, mitochondrial;N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase;Acetylglutamate kinase	1,672
PRS5	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 5	1,711
PUF4	Pumilio homology domain family member 4	1,894
PXL1	Paxillin-like protein 1	1,510
RCL1	RNA 3-terminal phosphate cyclase-like protein	2,998
REG1	Resistance to glucose repression protein 1	1,509
RET1	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2	1,569
RFA1	Replication factor A protein 1	1,865
RIO2	Serine/threonine-protein kinase RIO2	1,815
RIP1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	1,712
RPA49	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA49	1,768
RPB8	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3	1,684
RPC10	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC4	2,019
RPC19	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC2	1,677
RPC31	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC7	1,608
RPC53	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC4	1,758
RPN9	26S proteasome regulatory subunit RPN9	1,534
RPO31	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1	1,627
RPS31	Ubiquitin-40S ribosomal protein S31	1,500
RRS1	Regulator of ribosome biosynthesis	1,847
RRT2	Diphthamide biosynthesis protein RRT2	3,028
RTF1	RNA polymerase-associated protein RTF1	1,943
SAC1	Phosphoinositide phosphatase SAC1	1,700
SAP185	SIT4-associating protein SAP185	1,599
SAR1	Small COPII coat GTPase SAR1	1,505
SDA1	Protein SDA1	1,530
SDC1	COMPASS component SDC1	2,182
SEC14	SEC14 cytosolic factor	1,580
SEC28	Coatmer subunit epsilon	1,554
SEE1	N-lysine methyltransferase SEE1	2,299
SFT2	Protein transport protein SFT2	1,956
SGN1	RNA-binding protein SGN1	1,600
SKN1	Beta-glucan synthesis-associated protein SKN1	1,673
SKY1	Serine/threonine-protein kinase SKY1	1,859
SNF7	Vacuolar-sorting protein SNF7	1,739
SOL2	6-phosphogluconolactonase-like protein 2	1,680
SPE4	Spermine synthase	1,813
SPP41	Protein SPP41	1,599
SRP68	Signal recognition particle subunit SRP68	1,720
SRP72	Signal recognition particle subunit SRP72	1,574
SSO1	Protein SSO1	2,399

ΔPBP1-DB/BY4741 (aufwärts regulierte Proteine; > 1,5) Fortsetzung		
STE20	Serine/threonine-protein kinase STE20	1,575
STE4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta	1,805
STP3	Zinc finger protein STP3	1,782
SUS1	Protein SUS1	1,538
SWD2	COMPASS component SWD2	1,807
TAF14	Transcription initiation factor TFIID subunit 14	2,350
TAF6	Transcription initiation factor TFIID subunit 6	2,315
TAF9	Transcription initiation factor TFIID subunit 9	1,506
TCB1	Tricalbin-1	1,516
TDA10	Probable ATP-dependent kinase TDA10	1,799
TED1	Protein TED1	1,752
TGL1	Sterol esterase TGL1	2,126
THI80	Thiamine pyrophosphokinase	1,612
TIF6	Eukaryotic translation initiation factor 6	1,645
TIM8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM8	1,681
TOM5	Mitochondrial import receptor subunit TOM5	2,124
TOM7	Mitochondrial import receptor subunit TOM7	1,708
TOP1	DNA topoisomerase 1	2,533
TPM2	Tropomyosin-2	1,524
TRS31	Trafficking protein particle complex subunit 31	1,713
TRS33	Trafficking protein particle complex subunit 33	1,717
TY1B-MR1	Transposon Ty1-MR1 Gag-Pol polyprotein;Capsid protein	1,618
TY1B-PR1	Transposon Ty1-PR1 Gag-Pol polyprotein;Capsid protein	1,585
UBC9	SUMO-conjugating enzyme UBC9	1,753
UBX5	UBX domain-containing protein 5	1,625
YBR056W	Uncharacterized glycosyl hydrolase YBR056W	1,503
URA8	CTP synthase 2	1,518
URH1	Uridine nucleosidase	2,043
UTP18	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18	1,528
VMA22	Vacuolar ATPase assembly protein VMA22	1,539
VMA7	V-type proton ATPase subunit F	1,665
VPS51	Vacuolar protein sorting-associated protein 51	1,680
VTA1	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1	2,544
WTM1	Transcriptional modulator WTM1	1,654
YAE1	Uncharacterized protein YAE1	1,613
YBL036C	UPF0001 protein YBL036C	2,084
YBL081W	Uncharacterized protein YBL081W	2,225
YCP4	Flavoprotein-like protein YCP4	1,663
YCR076C	Uncharacterized protein YCR076C	2,109
YCR090C	UPF0587 protein YCR090C	1,531
YDL086W	Putative carboxymethylenebutenolidase	1,599
YDL121C	Uncharacterized protein YDL121C	1,807
YER156C	UPF0160 protein YER156C	1,523
YET3	Endoplasmic reticulum transmembrane protein 3	1,509
YFH1	Fratxin homolog, mitochondrial;Fratxin homolog intermediate form	1,713
YGR169C-A	Uncharacterized protein YGR169C-A	1,552
YGR266W	Uncharacterized protein YGR266W	1,668
YIL108W	Putative zinc metalloproteinase YIL108W	1,540
YJL132W	Uncharacterized protein YJL132W	1,632
YLR413W	Cell membrane protein YLR413W	1,536
YME1	Mitochondrial inner membrane i-AAA protease supercomplex subunit YME1	2,002
YMR178W	Uncharacterized protein YMR178W	1,625
YNL208W	Uncharacterized protein YNL208W	1,575
YPK1	Serine/threonine-protein kinase YPK1	1,669
YPK9	Vacuolar cation-transporting ATPase YPK9	1,801
YPR172W	Pyridoxamine 5-phosphate oxidase homolog	2,420
YVH1	Tyrosine-protein phosphatase YVH1	2,037
ZEO1	Protein ZEO1	1,529

Tab. A2a Liste der allein im ΔPBP1-sm-Deletionsstamm abwärts regulierten Proteine

ΔPBP1-sm/BY4741 (abwärts regulierte Proteine; LFQ-Quotient < 0,67)		
Gen-Symbol	Gen-Name	LFQ-Quotient
AAC1	ADP,ATP carrier protein 1	0,258
ADI1	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	0,550
AIM9	Altered inheritance of mitochondria protein 9, mitochondrial	0,453
ALD3	Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] 2	0,507
APE2	Aminopeptidase 2, mitochondrial	0,660
ATP1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	0,616
ATP15	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	0,535

ΔPBP1-sm/BY4741 (abwärts regulierte Proteine; LFQ-Quotient < 0,67) Fortsetzung		
ATP4	ATP synthase subunit 4, mitochondrial	0,554
BDH1	Diacetyl reductase [(R)-acetoin forming]	0,656
BLM10	Proteasome activator BLM10	0,357
BNA3	Probable kynurenine--oxoglutarate transaminase BNA3	0,627
BNA6	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	0,475
BUD4	Bud site selection protein 4	0,667
BUR6	Negative cofactor 2 complex subunit alpha	0,572
CAR1	Arginase	0,575
CIT1	Citrate synthase, mitochondrial	0,474
CLA4	Serine/threonine-protein kinase CLA4	0,661
CMK2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	0,349
COX12	Cytochrome c oxidase subunit 6B	0,498
COX4	Cytochrome c oxidase subunit 4, mitochondrial	0,601
COX6	Cytochrome c oxidase subunit 6, mitochondrial	0,601
CYT1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	0,260
DDR48	Stress protein DDR48	0,333
DLD1	D-lactate dehydrogenase [cytochrome] 1, mitochondrial	0,272
DOG2	2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase 2	0,531
DOT6	Transcriptional regulatory protein DOT6	0,651
DSE4	Endo-1,3(4)-beta-glucanase 1	0,663
DUG1	Cys-Gly metallodipeptidase DUG1	0,664
ECM29	Proteasome component ECM29	0,552
EMI2	Putative glucokinase-2	0,515
ENO1	Enolase 1	0,623
ERJ5	ER-localized J domain-containing protein 5	0,623
EXG1	Glucan 1,3-beta-glucosidase I/II	0,583
FMP21	Protein FMP21, mitochondrial	0,634
FYV8	Protein FYV8	0,488
GIS2	Zinc finger protein GIS2	0,441
GLC3	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	0,420
GLK1	Glucokinase-1	0,404
GTT1	Glutathione S-transferase 1	0,522
HEF3	Elongation factor 3B	0,476
HOR2	(DL)-glycerol-3-phosphatase 2	0,627
HRB1	Protein HRB1	0,639
HSP104	Heat shock protein 104	0,400
HSP12	12 kDa heat shock protein	0,261
HSP150	Cell wall mannoprotein HSP150	0,608
HSP26	Heat shock protein 26	0,151
HSP78	Heat shock protein 78, mitochondrial	0,153
HXK1	Hexokinase-1	0,480
HXT7	High-affinity hexose transporter HXT6	0,495
IDP1	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	0,627
IVY1	Protein IVY1	0,618
KEL1	Kelch repeat-containing protein 1	0,570
KGD2	Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	0,528
LAP4	Vacuolar aminopeptidase 1	0,291
LCL2	Long chronological lifespan protein 2	0,597
LSM1	Sm-like protein LSM1	0,603
LSP1	Sphingolipid long chain base-responsive protein LSP1	0,494
LYS9	Saccharopine dehydrogenase [NADP(+), L-glutamate-forming]	0,646
MDH2	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	0,552
MLS1	Malate synthase 1, glyoxysomal	0,019
MPD1	Protein disulfide-isomerase MPD1	0,582
MRH1	Protein MRH1	0,507
MSC1	Meiotic sister chromatid recombination protein 1	0,245
NADPH-dependent alpha-keto amide reductase	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase	0,520
NCE102	Non-classical export protein 2	0,556
OPI1	Transcriptional repressor OPI1	0,640
PAR32	Protein PAR32	0,611
PBI2	Protease B inhibitor 2	0,531
PDR16	Phosphatidylinositol transfer protein PDR16	0,424
PET9	ADP,ATP carrier protein 2	0,606
PGM2	Phosphoglucomutase-2	0,278
PHB1	Prohibitin-1	0,663
PHO11	Acid phosphatase PHO11	0,365
PHO84	Inorganic phosphate transporter PHO84	0,597

ΔPBP1-sm/BY4741 (abwärts regulierte Proteine; LFQ-Quotient < 0,67) Fortsetzung		
PNC1	Nicotinamidase	0,474
POS5	NADH kinase POS5, mitochondrial	0,478
PRE2	Proteasome subunit beta type-5	0,636
PST1	Cell wall mannoprotein PST1	0,308
PTC5	Protein phosphatase 2C homolog 5	0,661
QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	0,532
QCR7	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	0,375
RIM1	Single-stranded DNA-binding protein RIM1, mitochondrial	0,595
RNQ1	[PIN+] prion protein RNQ1	0,406
RPL15B	60S ribosomal protein L15-B	0,463
RPL25	60S ribosomal protein L25	0,595
RPL39	60S ribosomal protein L39	0,461
RPL4B	60S ribosomal protein L4-B	0,623
RPP1A	60S acidic ribosomal protein P1-alpha	0,318
RPS13	40S ribosomal protein S13	0,668
RPS15	40S ribosomal protein S15	0,573
RPS29A	40S ribosomal protein S29-A	0,511
RPS30B	40S ribosomal protein S30-B;40S ribosomal protein S30-A	0,435
RPS5	40S ribosomal protein S5	0,601
RTC3	Restriction of telomere capping protein 3	0,472
SDH1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	0,355
SEC7	Protein transport protein SEC7	0,569
SFB3	SED5-binding protein 3	0,665
SFH1	Chromatin structure-remodeling complex subunit SFH1	0,619
SKN7	Transcription factor SKN7	0,640
SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	0,527
SOL4	6-phosphogluconolactonase 4	0,457
SSA4	Heat shock protein SSA4	0,606
STF2	ATPase-stabilizing factor 15 kDa protein	0,488
STH1	Nuclear protein STH1/NPS1	0,618
SWA2	Auxilin-like clathrin uncoating factor SWA2	0,627
SXM1	Importin beta SMX1	0,545
TDA3	Putative oxidoreductase TDA3	0,607
TDH1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	0,427
TFS1	Carboxypeptidase Y inhibitor	0,317
TIF6	Eukaryotic translation initiation factor 6	0,653
TMA17	Translation machinery-associated protein 17	0,592
TOP2	DNA topoisomerase 2	0,641
TPS1	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 56 kDa subunit	0,494
TPS2	Trehalose-phosphatase	0,483
TPS3	Trehalose synthase complex regulatory subunit TPS3	0,663
TSL1	Trehalose synthase complex regulatory subunit TSL1	0,234
UTP20	U3 small nucleolar RNA-associated protein 20	0,636
VTC1	Vacuolar transporter chaperone 1	0,600
VTC3	Vacuolar transporter chaperone 3	0,659
XRN1	5-3 exoribonuclease 1	0,580
YCR075W-A	Uncharacterized protein YCR075W-A	0,650
YLR257W	Uncharacterized protein YLR257W	0,496
YMR124W	Uncharacterized protein YMR124W	0,567
YNR034W-A	Uncharacterized protein YNR034W-A	0,106
YOP1	Protein YOP1	0,457
YOR238W	Uncharacterized protein YOR238W	0,496
YPR010C-A	UPF0495 protein YPR010C-A	0,485
YPR091C	Uncharacterized PH domain-containing protein YPR091C	0,609
ZTA1	Probable quinone oxidoreductase	0,458

Tab. A2b Liste der allein im ΔPBP1-sm-Deletionsstamm aufwärts regulierten Proteine

ΔPBP1-sm/BY4741 (aufwärts regulierte Proteine; > 1,5)		
Gen-Symbol	Gen-Name	LFQ-Quotient
AAH1	Adenine deaminase	1,522
ABF1	ARS-binding factor 1	1,562
ABZ1	Aminodeoxychorismate synthase	1,611
ABZ2	Aminodeoxychorismate lyase	1,643
ACB1	Acyl-CoA-binding protein	1,551
ADE12	Adenylosuccinate synthetase	1,603
AHP1	Peroxiredoxin type-2	1,860
AIM29	Altered inheritance rate of mitochondria protein 29	1,555
ALT1	Probable alanine aminotransferase, mitochondrial	1,567
AMD1	AMP deaminase	2,007

ΔPBP1-sm/BY4741 (aufwärts regulierte Proteine; > 1,5) Fortsetzung

AML1	N(6)-adenine-specific DNA methyltransferase-like 1	1,514
APL5	AP-3 complex subunit delta	1,502
APS3	AP-3 complex subunit sigma	2,069
ARD1	N-terminal acetyltransferase A complex catalytic subunit ARD1	1,664
ARP5	Actin-related protein 5	1,924
ARP7	Actin-related protein 7	1,638
AVL9	Late secretory pathway protein AVL9	1,876
BCP1	Protein BCP1	1,763
BOI1	Protein BOB1	2,630
BRE5	UBP3-associated protein BRE5	1,799
BUD22	Bud site selection protein 22	1,615
CAB4	Phosphopantetheine adenylyltransferase	1,886
CAD1	AP-1-like transcription activator YAP2	1,566
CAF20	Cap-associated protein CAF20	2,015
CAP1	F-actin-capping protein subunit alpha	2,040
CCC1	Protein CCC1	1,591
CDC10	Cell division control protein 10	1,560
CDC34	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-34 kDa	2,724
CDC9	DNA ligase 1	1,508
CHD1	Chromo domain-containing protein 1	1,819
CHZ1	Histone H2A.Z-specific chaperone CHZ1	2,581
CIR2	Probable electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	1,520
CLC1	Clathrin light chain	1,821
CMS1	Protein CMS1	1,930
CNA1	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit A1	1,939
CNS1	Hsp70/Hsp90 co-chaperone CNS1	2,072
COA4	Cytochrome oxidase assembly factor 4	1,852
CPA1	Carbamoyl-phosphate synthase arginine-specific small chain	1,681
CPR7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP7	1,551
CRP1	Cruciform DNA-recognizing protein 1;CRP1 short N-terminal subpeptide;CRP1 short C-terminal subpeptide	1,561
CYB5	Cytochrome b5	1,999
DAP2	Dipeptidyl aminopeptidase B	1,522
DBP6	ATP-dependent RNA helicase DBP6	2,041
DCP2	mRNA-decapping enzyme subunit 2	1,824
DEF1	RNA polymerase II degradation factor 1	1,649
DIB1	Spliceosomal protein DIB1	2,871
DID4	DOA4-independent degradation protein 4	1,726
DJP1	DnaJ-like protein 1	1,823
DLD3	D-lactate dehydrogenase [cytochrome] 3	1,595
DNF1	Phospholipid-transporting ATPase DNF1	1,610
DPH5	Diphthine synthase	1,702
DYN2	Dynein light chain 1, cytoplasmic	2,778
ECM2	Pre-mRNA-splicing factor SLT11	1,557
EMC1	ER membrane protein complex subunit 1	1,533
EMG1	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1	2,244
EMW1	Essential for maintenance of the cell wall protein 1	1,895
ENA1	Sodium transport ATPase 1	2,421
ENP1	Essential nuclear protein 1	1,946
ENP2	Ribosome biogenesis protein ENP2	1,938
ENT1	Epsin-1	1,554
ERG2	C-8 sterol isomerase	1,951
ERG5	Cytochrome P450 61	1,619
ERG8	Phosphomevalonate kinase	2,169
ERP1	Protein ERP1	1,625
ERV1	Mitochondrial FAD-linked sulfhydryl oxidase ERV1	1,843
ERV29	ER-derived vesicles protein ERV29	1,555
ESF2	Pre-rRNA-processing protein ESF2	1,938
FAP7	Adenylate kinase isoenzyme 6 homolog FAP7	1,797
FSH2	Family of serine hydrolases 2	1,806
FUR1	Uracil phosphoribosyltransferase	1,509
GCD14	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit TRM61	1,751
GET1	Golgi to ER traffic protein 1	1,780
GNP1	High-affinity glutamine permease	1,780
GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] 2, mitochondrial	2,637
GPI16	GPI transamidase component GPI16	1,934
GPM3	Phosphoglycerate mutase 3	3,504
GPX2	Glutathione peroxidase 2	1,744
GRX5	Monothiol glutaredoxin-5, mitochondrial	1,820
GRX8	Glutaredoxin-8	1,844

ΔPBP1-sm/BY4741 (aufwärts regulierte Proteine; > 1,5) Fortsetzung

HBS1	Elongation factor 1 alpha-like protein	2,283
HEM13	Coproporphyrinogen-III oxidase	2,551
HGH1	FAM203 family protein HGH1	1,519
HIS6	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase	1,882
HOC1	Putative glycosyltransferase HOC1	2,124
HPR1	THO complex subunit HPR1	1,613
HRI1	Protein HRI1	1,799
HUB1	Ubiquitin-like modifier HUB1	1,601
HXT3	Low-affinity glucose transporter HXT3	1,698
IFA38	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	1,903
ILV3	Dihydroxy-acid dehydratase, mitochondrial	1,510
IMD2	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 2	4,191
IMP4	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP4	1,725
IRC24	Benzil reductase ((S)-benzoin forming) IRC24	1,554
IRC25	Proteasome chaperone 3	2,195
ISY1	Pre-mRNA-splicing factor ISY1	1,780
JJ3	Diphthamide biosynthesis protein 4	2,333
KEL3	Kelch repeat-containing protein 3	1,700
KTR1	Alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1	1,684
LEU1	3-isopropylmalate dehydratase	1,836
LEU9	2-isopropylmalate synthase 2, mitochondrial	2,308
LIA1	Deoxyhypusine hydroxylase	1,649
LOG family protein YJL055W	LOG family protein YJL055W	1,538
LTP1	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	2,050
MAK21	Ribosome biogenesis protein MAK21	1,838
MAK31	N-alpha-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit	3,148
MAS2	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	1,739
MKT1	Protein MKT1	2,258
MNN11	Probable alpha-1,6-mannosyltransferase MNN11	2,630
MOG1	Nuclear import protein MOG1	1,523
MRPL13	54S ribosomal protein L13, mitochondrial	1,659
MSC3	Meiotic sister-chromatid recombination protein 3	1,520
MTR2	mRNA transport regulator MTR2	1,767
NAN1	NET1-associated nuclear protein 1	1,517
NAT5	N-terminal acetyltransferase A complex subunit NAT5	2,675
NGG1	Chromatin-remodeling complexes subunit NGG1	1,817
NOP10	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	2,471
NOP53	Ribosome biogenesis protein NOP53	2,086
NOP8	60S ribosome subunit biogenesis protein NOP8	1,598
NPA3	GTPase NPA3	2,178
NRP1	Asparagine-rich protein	2,009
OAC1	Mitochondrial oxaloacetate transport protein	3,059
OCA1	Putative tyrosine-protein phosphatase OCA1	1,530
OSM1	Osmotic growth protein 1	1,957
OST1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	1,766
PEP8	Carboxypeptidase Y-deficient protein 8	1,894
PEX19	Peroxisomal membrane protein import receptor PEX19	1,634
PEX30	Peroxisomal membrane protein PEX30	1,529
PFY1	Profilin	1,530
PLP2	Phosducin-like protein 2	2,254
PMT2	Dolichyl-phosphate-mannose--protein mannosyltransferase 2	1,660
PMT4	Dolichyl-phosphate-mannose--protein mannosyltransferase 4	1,994
POF1	Promoter of filamentation protein 1	2,606
POL5	DNA polymerase V	1,567
POM152	Nucleoporin POM152	1,550
PPT1	Serine/threonine-protein phosphatase T	1,564
PPX1	Exopolyphosphatase	1,853
PRS5	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 5	1,787
PUF4	Pumilio homology domain family member 4	1,801
PUP1	Proteasome subunit beta type-2	1,962
PWP1	Periodic tryptophan protein 1	1,690
RBA50	RNA polymerase II-associated protein RBA50	2,390
RBK1	Probable ribokinase	1,990
RCL1	RNA 3-terminal phosphate cyclase-like protein	2,603
REE1	Regulation of enolase protein 1	1,514
REH1	Zinc finger protein REH1	1,505
RET1	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2	2,597
RET3	Coatomer subunit zeta	1,701

ΔPBP1-sm/BY4741 (aufwärts regulierte Proteine; > 1,5) Fortsetzung

REX4	RNA exonuclease 4	2,034
RFA1	Replication factor A protein 1	1,767
RLP7	Ribosome biogenesis protein RLP7	1,669
RNR2	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain 1	1,716
RNR4	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain 2	1,763
RPA34	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA34	1,648
RPA43	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA43	1,621
RPA49	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA49	1,565
RPB3	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3	1,654
RPB8	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3	1,759
RPC31	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC7	1,583
RPE1	Ribulose-phosphate 3-epimerase	1,619
RPF1	Ribosome production factor 1	1,770
RRP4	Exosome complex component RRP4	1,614
RRP9	Ribosomal RNA-processing protein 9	1,673
RRS1	Regulator of ribosome biosynthesis	2,336
RRT2	Diphthamide biosynthesis protein RRT2	3,218
RTT102	Regulator of Ty1 transposition protein 102	1,654
SCP1	Transgelin	1,523
SDA1	Protein SDA1	2,089
SDC1	COMPASS component SDC1	2,549
SDO1	Ribosome maturation protein SDO1	2,440
SEC14	SEC14 cytosolic factor	1,705
SEC28	Coatomer subunit epsilon	1,545
SEE1	N-lysine methyltransferase SEE1	1,576
SER3	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 1	1,893
SEY1	Protein SEY1	1,594
SFT2	Protein transport protein SFT2	2,517
SIA1	Protein SIA1	2,094
SKI8	Antiviral protein SKI8	1,613
SKN1	Beta-glucan synthesis-associated protein SKN1	1,688
SKY1	Serine/threonine-protein kinase SKY1	2,028
SNF7	Vacuolar-sorting protein SNF7	2,121
SPE4	Spermine synthase	3,027
SPT4	Transcription elongation factor SPT4	1,911
SRB6	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 22	2,384
SRB7	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 21	1,569
STE18	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	1,872
STE20	Serine/threonine-protein kinase STE20	1,969
STE24	CAAX prenyl protease 1	1,729
SUB1	RNA polymerase II transcriptional coactivator SUB1	1,747
SUN4	Septation protein SUN4	1,965
TAF1	Alpha N-terminal protein methyltransferase 1	1,611
TAF10	Transcription initiation factor TFIID subunit 10	1,735
TAF6	Transcription initiation factor TFIID subunit 6	1,924
TAF9	Transcription initiation factor TFIID subunit 9	1,533
Tat-D	Deoxyribonuclease Tat-D	1,813
TDA10	Probable ATP-dependent kinase TDA10	2,071
TED1	Protein TED1	1,601
THR1	Homoserine kinase	1,601
TIM13	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM13	1,541
TIM50	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	1,702
TOM5	Mitochondrial import receptor subunit TOM5	2,168
TOP1	DNA topoisomerase 1	2,117
TOS1	Protein TOS1	1,696
TPM1	Tropomyosin-1	1,737
TPM2	Tropomyosin-2	1,660
TRM5	tRNA (guanine(37)-N1)-methyltransferase	1,751
TRS33	Trafficking protein particle complex subunit 33	1,683
TRX1	Thioredoxin-1	1,518
TY1B-LR4	Transposon Ty1-LR4 Gag-Pol polyprotein;Capsid protein;Ty1 protease;Integrase;Reverse transcriptase/ribonuclease H	1,633
TY1B-MR1	Transposon Ty1-MR1 Gag-Pol polyprotein;Capsid protein;Ty1 protease;Integrase;Reverse transcriptase/ribonuclease H;	1,668
TY1B-PR1	Transposon Ty1-PR1 Gag-Pol polyprotein;Capsid protein;Ty1 protease;Integrase;Reverse transcriptase/ribonuclease H	2,367
UBC9	SUMO-conjugating enzyme UBC9	1,911
UBX7	UBX domain-containing protein 7	1,508
YLR179C	Uncharacterized protein YLR179C	1,526
YOR021C	Uncharacterized protein YOR021C	1,566

ΔPBP1-sm/BY4741 (aufwärts regulierte Proteine; > 1,5) Fortsetzung

URA5	Orotate phosphoribosyltransferase 1	1,847
URA6	Uridylate kinase	1,830
UTH1	Protein UTH1	1,765
UTP15	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15	1,538
UTP18	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18	1,948
UTP21	U3 small nucleolar RNA-associated protein 21	1,524
UTP8	U3 small nucleolar RNA-associated protein 8	1,550
VAM7	Vacuolar morphogenesis protein 7	1,744
VAN1	Mannan polymerase I complex VAN1 subunit	3,351
VMA7	V-type proton ATPase subunit F	1,815
VPS24	Vacuolar protein-sorting-associated protein 24	2,189
VPS27	Vacuolar protein sorting-associated protein 27	1,744
VTA1	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1	2,279
XPT1	Xanthine phosphoribosyltransferase 1	2,048
YAE1	Uncharacterized protein YAE1	1,669
YBL036C	UPF0001 protein YBL036C	1,834
YBT1	ATP-dependent bile acid permease	1,628
YCF1	Metal resistance protein YCF1	1,696
YCH1	CDC25-like phosphatase YCH1	1,738
YCK1	Casein kinase I homolog 1	1,629
YCL042W	Putative uncharacterized protein YCL042W	1,664
YCR076C	Uncharacterized protein YCR076C	1,500
YCR087C-A	UPF0743 protein YCR087C-A	1,677
YDL121C	Uncharacterized protein YDL121C	1,517
YER156C	UPF0160 protein YER156C	1,680
YET3	Endoplasmic reticulum transmembrane protein 3	1,537
YFH1	Frataxin homolog, mitochondrial;Frataxin homolog intermediate form	2,335
YGL101W	HD domain-containing protein YGL101W	1,505
YHR127W	Uncharacterized protein YHR127W	1,843
YLR126C	Putative glutamine amidotransferase YLR126C	1,652
YLR413W	Cell membrane protein YLR413W	1,690
YME1	Mitochondrial inner membrane i-AAA protease supercomplex subunit YME1	1,640
YML6	54S ribosomal protein Yml6, mitochondrial	2,111
YNL010W	Uncharacterized phosphatase YNL010W	1,660
YOR283W	Broad-specificity phosphatase YOR283W	1,586
YOR304C-A	Uncharacterized protein YOR304C-A	2,208
YPR127W	Putative pyridoxal reductase	1,653
YPT52	GTP-binding protein YPT52	1,567
YPT7	GTP-binding protein YPT7	1,531
YVH1	Tyrosine-protein phosphatase YVH1	2,185
ZPR1	Zinc finger protein ZPR1	1,692
ZRT3	Zinc-regulated transporter 3	1,512

Anhang 2 Sequenzalignments

Paarweise Sequenzalignments (Smith-Waterman A.) (Matrix: EBLOSUM62, Gap_penalty: 10.0, Extend_penalty: 0.5)

```
# 1: Ataxin-2
# 2: TDP-43
# Length: 154
# Identity:      35/154 (22.7%)
# Similarity:    52/154 (33.8%)
# Gaps:          38/154 (24.7%)
# Score: 57.0

Ataxin-2      239 GRGSISSGLE-FVSHNPPSEATFPVARTSPSGGTWSSVVGVPRLSPKT      287
      |...|...|: .:|:|...|...:.....|:|...|
TDP-43        245 GEDLIIKGISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGG-----              278

Ataxin-2      288 HRPRSP----RQNSIGNTPSGPV-LASPQAGIIPTEAVAMPPIAASPTPA      332
      :| .|. .|...|:|...| .|:|. .| . . . .|...|.|. .|
TDP-43        279 ----NPGGFGNQGGFGNSRGGGAGLGNQGS---NMGGGMNFGAFSINPA      321

Ataxin-2      333 SPASNRAVTPSSEAKDSRL-QDQRQNSPAGNKEN-----IKPNETSPSFS      376
      ..|:..|...|...|...| .|. .|:..|:|...| .:|:| :|.
TDP-43        322 MMAAAQAALQSSWGMGMLASQQNQSGPSPGNNQNGMQREPNQ---AFG      368

Ataxin-2      377 KAEN      380
      ...|
TDP-43        369 SGNN      372
```

276 – 404 = prionartige Domäne (PrLD) (King *et al.*; Platz 10)

```
# 1: Ataxin-2
# 2: Prion
# Length: 49
# Identity:      13/49 (26.5%)
# Similarity:    22/49 (44.9%)
# Gaps:          0/49 ( 0.0%)
# Score: 50.0

Ataxin-2      621 SAAGPIAATPPAYSTQYVAYSPOQFPNQPLVQHVPHYQSQHPHYSPV      669
      ||...||...:|...:|...:.....|...:.....|:|:|...|:|...|
Prion         132 SAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYVYRPMDEYSNQNNFVHDCV      180
```

23 – 230 = Prion Domäne

```
# 1: Ataxin-2
# 2: FUS_HUMAN
# Length: 210
# Identity:      50/210 (23.8%)
# Similarity:    65/210 (31.0%)
# Gaps:          68/210 (32.4%)
# Score: 91.5

Ataxin-2      636 TQYVAYSPOQFPNQPLVQHVPHYQSQHPH---VYSPVIQGNARMMAPPTH      682
      ||...|...:|...:|...: .|...|: .|...|...
FUS_HUMAN      7  TQQATQSYGAYPTQPGQY--SQSSQPYGQSYSGYSQST-----              45

Ataxin-2      683 AQPLVSSSATQYGAHEQTHAMYACPKLPYNKETSPPSYFAISTGSLAQQ      732
      ...|...|...:|...:| .|...:|...| .|...|...
FUS_HUMAN      46  DTSGYGQSSYSSYGQSNT-----GYGTQSTPQGYG--STGGYGSS      84

Ataxin-2      733 YAHPNATLHPHTPHQPSPATPTGQQSQHG-GSHPAPSPVQHHQHQAQA      781
      |...:|...|...| .|...|...:|...:|...
FUS_HUMAN      85  -----QSSQSSYGQSSYPGYGQPAPSSSTSGSYGSSSSQS      119

Ataxin-2      782 LHLASPOQSAIYHAGLAPTPPSMTPASNTQSPQNSFPAAQQTVFTIHPS      831
      .....| .|...|...:|...:| .|...|...
FUS_HUMAN      120 SSYGQPQ-----SGSYSQQPSYGGQQQ-----S      142

Ataxin-2      832 HVQPAYTNPP      841
      :|. . . .|...|
FUS_HUMAN      143 YGQQQSYNPP      152
```

1 – 237= PrLD (King *et al.*; Platz 1)

1: Ataxin-2
2: EWSR1
Length: 219
Identity: 56/219 (25.6%)
Similarity: 77/219 (35.2%)
Gaps: 47/219 (21.5%)
Score: 124.0

Ataxin-2	525	SFSQPKPS-TTPTSRRPQAQPSPSM-VGHQQPT--PVYTQPVCFAPNMMY	570
		: : ... : : : :: ...	
EWSR1	69	SYGQPPTGYTTPAPQAYSQPVQGYGTGAYDTTATVTTTQASYAAQSY	118
Ataxin-2	571	PVPVSPGVQPLYP-----IPMTMPVNVQAKTYRAVP-----NMP	604
		: : ... : : : :: ...	
EWSR1	119	-----GTQPAYPAYGQQPAATAPTRPQDGNK-PTETSQPQSSSTGGYNQP	161
Ataxin-2	605	QQRQDQHHQSAMMHPASAAGPPIAATPPAY-----STQYVAYSQQFPN	648
		... : : ... : ... : ... : ... : ... : ... : ... : ...	
EWSR1	162	SLGYGQSNYSYPQVPGSYPMPVTA-PPSYPTSYSSSTQPTSVDQSSYSQ	210
Ataxin-2	649	QPLVQHVPHYQSQHPHVSPVIQGNARMMAPPTHQPLVSSSATQYGAH	698
		: : ... : ... : ... : ... : ... : ... : ... : ...	
EWSR1	211	QNTYGGPSSYGGQ-----SSYGGQSSYGGQPPTSYPP-----QTGSY	247
Ataxin-2	699	EQTHAMYACPKLPYNKETS	717
		. : : : : ... : : : :	
EWSR1	248	SQAPSQYSQQSSSYGQQSS	266

1 - 280= PrLD (King et.al.; Platz 3)

1: Ataxin-2
2: TIA-1
Length: 345
Identity: 74/345 (21.4%)
Similarity: 111/345 (32.2%)
Gaps: 79/345 (22.9%)
Score: 72.0

Ataxin-2	364	ENIKPN-ETSPSFSKAENKGISPVVSEHRKQIDDLKKFKNDFRLQPSSTS	412
		: : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ...	
TIA-1	74	KEVKVNWATTPSSQKDTSS-STVVSTQRSQ-DHFHVFVGD--LSPEITT	119
Ataxin-2	413	ESMDQLLNKNREGEKSRDLIKDIEPSAK-----DSFIENSS	449
		: : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ...	
TIA-1	120	EDIKAAFAPFGRISDAR-VVKDMATGKSKGYGFVSFFNKWDAENAIQQMG	168
Ataxin-2	450	SNCTSG-----SSKPNSPSISPSILSNTHEHKGPEVTSQGVQTSSPA	491
		... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ...	
TIA-1	169	GQWLGGRRIRTNWATRKPAP--KSTYESNTKQLSYDEVVNQ----SSPS	212
Ataxin-2	492	-----CKQEKDDKEEKKDAAEQVRKSTLNPNAKEFNPRFSQPKPSTTPT	536
		: : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ...	
TIA-1	213	NCTVYC-----GGVTSGLTEQLMRQTFSPFGQIMEIRVFPDKGYSFVRF	256
Ataxin-2	537	SPRPQAQPS-----PSMVGH-----QQPTPVYTQPVCFAPNMMYPVPV	574
		: : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ...	
TIA-1	257	NSHESAHAIVSVNGTTIEGHVVVKCYWGKETLDMINPVQQNQIGYPQPY	306
Ataxin-2	575	SPGVQPLYPIPMTPMPVNVQAKTYRAVPN-----MPQRQDQHHQSAM	616
		... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ...	
TIA-1	307	GQWQG-WYG-----NAQQIGQYMPNGWQVPAYGMYGQAWNQQGFNQ	347
Ataxin-2	617	MHPASAAGPPIAATPPAYSTQYVAYSQQFPNQPLVQHVPHYQSQ	661
		... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ... : : ...	
TIA-1	348	QSSAPWMPGPNYGVQPPQ-----GQNGSMLPNQPSGYRVAGYETQ	386

292 - 386 PrLD (King et.al.; Platz 11)

```
# 1: Ataxin-2
# 2: TIAR
# Length: 132
# Identity: 28/132 (21.2%)
# Similarity: 40/132 (30.3%)
# Gaps: 30/132 (22.7%)
# Score: 73.5
```

```
Ataxin-2      67 EEEKYTAVQRNSSEREHGSINTRENKYIPPGQRNREVISWGSGRQNSPRM 116
      |...:.|..|:..|||:.....|..|...|:.....|..|...
TIAR          268 ESAAHAIVSVNGTTIEGHVVKCYWGKESPDMTKNFQQVDYSQWGQWSQVY 317

Ataxin-2      117 GQPGSGSMPSRSTSHSTDFNPNVSGSDQRVNVG-----GVPWPSPCP 157
      |.|          ....|:..|| |.|.....
TIAR          318 GNP-----QQYGYMANGWQVPPYGVYGGPWNQQGF 348

Ataxin-2      158 SPSSRPPSRYQSGPNSLPPRAATPTRPPSRPP 189
      .....|:..:..|...||:..| |..||
TIAR          349 GVDQSPSAAWMGGFQAQPPQQAAP--PPVIPP 378
```

301-392= PrLD (King et al.; Platz 26)

LALIGN Paarweises Alignment

Parameters: PAM120 matrix (12:-8), open/ext: -10/-2

The best non-identical alignments are: ls-w bits E(1) % id % sim alen
TDP-43 Q13148.1 (414) 46 24.1 0.02 0.278 0.700 90

>>>Ataxin-2-CT, 913 aa vs lalign-I20161105-004127-0314-67425539-oy.bsequence library
>>>TDP-43

Waterman-Eggert score: 46; 24.1 bits; **E(1) < 0.02**
27.8% identity (70.0% similar) in 90 aa overlap (295-380:286-372)

```
Ataxin-2-CT   300      310      320      330      340      350      360      370      380
QNSIGNTPSG-PVLASPAQAGIIPTEAVAMPIPAASPTPASASNRAVTPSSEAKDSRLQDQR-QNSPAGNKEN--IKPNETSPSFSKAEN
:.....: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:
TDP-43        290      300      310      320      330      340      350      360      370
QGGFGNSRGGGAGLGNNGQSNM--GGGMNFGAFSINPAMMAAQAALQSSWGMMLASQQNQSGPSSGNNQNGNMQRPNQAFSGSNN
```