

Untersuchungen zur Rolle von Ataxin-2 im zellulären mRNA-Metabolismus

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

Dipl.-Biol.(technisch orientiert) Ute Nonhoff

aus Wuppertal

April 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach

Disputation am: 16.10.2007

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Lehrach vom Max Planck Institut für Molekulare Genetik für die Aufgabenstellung, die Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. V. A. Erdmann von der Freien Universität Berlin möchte ich für seine Tätigkeit als Doktorvater danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Krobitsch für die exzellente Betreuung, die ständige Hilfsbereitschaft, die immerwährende Diskussionsbereitschaft, den Arbeitsplatz, das tolle Arbeitsklima und die gute Zeit in ihrer Arbeitsgruppe "Neurodegenerative Disorders".

Bei der Arbeitsgruppe "Neurodegenerative Disorders" bedanke ich mich besonders für die ständige Hilfsbereitschaft, das tolle Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit, die Diskussionskaffeepausen auf dem Balkon und die gute Zeit.

Ich bedanke mich ebenfalls herzlich bei Dr. I. Piccini und D. Balzereit für die Einführung in die Techniken der RNAi-Experimente und die gute Zusammenarbeit, sowie R. Lurz für die Einführung und die Betreuung am Konfokalen Mikroskop.

Mein spezieller Dank gilt meiner Familie für ihre andauernde Unterstützung während meines Studiums und der Zeit in Berlin. Ohne sie wäre Vieles nicht möglich gewesen.

Weiterhin gilt mein Dank auch einigen besonderen Freunden - sie wissen wer gemeint ist, und sie wissen auch warum.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Polyglutaminerkrankungen	1
1.2	Spinozerebellare Ataxie Typ 2	7
1.3	Biologische Funktion von ATXN2-Homologen	11
1.4	Zentrale zelluläre Strukturen des mRNA-Metabolismus	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.2	Methoden	39
2.3	Zellkultur	40
2.4	RNA-Interferenz	48
2.5	Immunfluoreszenz Analyse	52
3	Ergebnisse	57
3.1	Charakterisierung der Interaktion zwischen ATXN2 und PABP	57
3.2	Einfluss von unterschiedlichen Stress-Bedingungen auf die zelluläre Lokalisation von ATXN2	59
3.3	Besitzt ATXN2 eine Funktion beim funktionellen Zusammenspiel von SGs und P-bodies?	68
3.4	Einfluss eines veränderten ATXN2-Expressionslevels auf die Lokalisation und zelluläre Konzentration der Interaktionspartner DDX6 und PABP	74
3.5	Funktionelles Zusammenspiel von ATXN2 und T- bzw. L-Plastin	98

4	Diskussion	113
4.1	Rolle von ATXN2 im zellulären mRNA-Metabolismus	114
4.2	Zelluläre Konsequenzen eines veränderten Ataxin-2 Expressions- level als möglicher Pathomechanismus?	121
4.3	Störungen im zellulären mRNA-Metabolismus als potentieller Pa- thomechanismus in neurodegenerativen Erkrankungen	134
5	Zusammenfassung	137
6	Abstract	138

Literaturverzeichnis 141

7	Apendix	167
7.1	Lebenslauf	167
7.2	Publikationen	169
7.3	Selbstständigkeitserklärung	170
8	Abkürzungen	171

5 Zusammenfassung

Die Spinozerebellare Ataxie Typ 2 (SCA2) ist eine dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, die zur Familie der Polyglutaminerkrankungen gehört. Ausgelöst wird SCA2 durch eine Verlängerung einer CAG-Trinukleotidexpansion im *SCA2*-Gen, die für einen Polyglutaminbereich im Genprodukt Ataxin-2 (ATXN2) kodiert. Die zelluläre Funktion von ATXN2 ist bisher unbekannt, und die molekularen Mechanismen, welche zur Pathogenese der Erkrankung beitragen, sind noch nicht verstanden. Jedoch wurde in post mortem Gehirnen betroffener Menschen ein erhöhter ATXN2-Level festgestellt, was auf einen pathogenen Beitrag der ATXN2-Konzentration in der Krankheit weisen könnte.

In dieser Arbeit konnte die Interaktion von ATXN2 mit zwei am mRNA-Metabolismus beteiligten Proteinen gezeigt werden. Zum einen assoziiert ATXN2 mit dem Poly(A)-Bindeprotein (PABP), welches bei der Translationsinitiation eine entscheidende Rolle spielt, und unter Stress-Bedingungen in sogenannten "Stress Granules" (SGs) lokalisiert. Diese zytoplasmatischen Strukturen stellen Orte der mRNA Lagerung und Selektion unter Stress-Bedingungen dar. Des Weiteren kann ATXN2 als ein weiteres Markerprotein der SGs angesehen werden, da es unter allen hier getesteten Stress-Bedingungen in diesen Strukturen lokalisiert. Weiterhin interagiert ATXN2 mit der DEAD/H-box RNA Helikase DDX6, welches ebenfalls eine Komponente von SGs darstellt und zusätzlich in P-bodies lokalisiert. In eukaryotischen P-bodies findet ein Haupt-mRNA-Degradationsweg statt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass veränderte ATXN2-Expressionslevel die Formation von SGs und P-bodies stören. Weiterhin gelang der Nachweis, dass die endogene ATXN2-Konzentration unter Stress-Bedingungen ansteigt und somit ATXN2 bei zellulären Stressantwort-Mechanismen eine Rolle spielen könnte. Weiterhin reguliert ATXN2 die intrazelluläre Konzentration seines Interaktionspartners PABP. Diese Daten implizieren, dass die zelluläre ATXN2-Konzentration einen wichtigen Faktor für die Formation von SGs und P-bodies darstellt, welches Hauptkompartimente in der Zelle für die Kontrolle und Regulation von mRNA-Abbau, Stabilität und Translation sind. Zusätzlich zu seiner of-

fensichtlich wichtigen Rolle im mRNA-Metabolismus, konnte die Funktion von ATXN2 in dieser Arbeit weiterhin mit Plastin-Proteinen in Zusammenhang gebracht werden. ATXN2 interagiert mit den Paralogen L- und T-Plastin, und eine Überexpression von ATXN2 führt zu einer Akkumulation von endogen exprimiertem T-Plastin. Da die Plastine einen wichtigen Faktor in der Aktin-Filament-Formation darstellen, legen diese Ergebnisse nahe, dass eine erhöhte ATXN2-Konzentration indirekt auf den Aktin-Metabolismus der Zelle einwirken kann. Auf Grund der hier vorgestellten Daten kann geschlossen werden, dass eine Erhöhung der zellulären ATXN2-Konzentration weitreichende Auswirkung auf die Homöostase von Zellen hat, die zur Pathogenese von SCA2 beitragen könnten.

6 Abstract

Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is a dominantly inherited neurodegenerative disorder, which belongs to the family of polyglutamine disorders. SCA2 is caused by a CAG trinucleotide expansion in the *SCA2* gene, which encodes for a polyglutamine stretch in the gene product ataxin-2 (ATXN2). The cellular function of this protein is not yet understood and the molecular mechanisms contributing to the pathogenesis of the disorder are not known to date. In post mortem brains of patients, an enhanced concentration of ATXN2 was discovered and this finding could point towards a role of elevated ATXN2-levels in the pathomechanism of the disease.

In this work, I was able to show that ATXN2 interacts with two proteins involved in the cellular mRNA metabolism. First, it associates with the poly(A)-binding protein (PABP), which is implicated in the translational initiation, and which localizes to the so called stress granules (SGs) under stress conditions. These cytoplasmic structures represent sites of mRNA triage, and ATXN2 seems to be another marker protein of these structures, since it localized to SGs under all tested stress conditions. Secondly, ATXN2 also interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6, which is a further component of SGs and additionally of P-bodies. Eukaryotic P-bodies represent the site of one central mRNA degradati-

on pathway. I was also able to show that altered ATXN2 levels interfere with the assembly of SGs and P-bodies. Additionally, the endogenous ATXN2 concentration increases under stress conditions and it is possible that ATXN2 is involved in cellular stress response mechanisms. Moreover, ATXN2 regulates the intracellular concentration of its interaction-partner PABP. These data imply that the cellular ATXN2 concentration is important for the assembly of SGs and P-bodies, which are main compartments for regulating and controlling mRNA degradation, stability and translation. In addition to its important role in mRNA metabolism, we could imply ATXN2 in plastin-associated pathways, because it interacts with the paralogs L- and T-plastin. Moreover an overexpression of ATXN2 leads to an accumulation of endogenous T-plastin in cells. Because plastin proteins are important for actin-filament formation, these data imply that elevated ATXN2 levels interfere indirectly with the actin metabolism of the cell. On the basis of the data presented in this work, it can be concluded that an increase in the cellular ATXN2 concentration interferes with the homeostasis of the cell, which is likely to contribute to the pathogenesis of SCA2.