

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Interaktion zwischen ATXN2 und PABP

In Zusammenarbeit mit Dr. Mario Albrecht (MPI für Bioinformatik, Saarbrücken) wurde auf der Basis bioinformatischer Analysen, ein Hefeinteraktionsnetzwerk für Pbp1, dem Hefehomolog des humanen ATXN2, erstellt (siehe Abbildung 3) [69]. Da in der Arbeitsgruppe eine strukturelle und funktionelle Verwandtschaft von ATXN2 und Pbp1 festgestellt und belegt wurde, ließ dieser Befund die Vermutung zu, dass die im Netzwerk dargestellten Interaktionen auf das humane System übertragen werden können. Mit Hilfe des "Yeast-2-Hybrid-Systems" konnte in einem ersten Versuchsansatz die dargestellte Interaktion zwischen Pbp1 und Pab1, dem Hefehomolog des humanen "Poly(A) binding protein" (PABP), für die humanen Proteine ATXN2 und PABP nachgewiesen werden. Eine weitere Verifizierung der Wechselwirkung dieser beiden Proteine gelang mittels transienter Überexpression und anschließender Koimmunpräzipitation der interagierenden Region der humanen Proteine [69].

Im einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob ebenfalls eine Interaktion der endogen exprimierten Proteine erfolgt. Dafür wurde zunächst die endogene Lokalisation der Proteine analysiert. DU145-Zellen wurden, wie unter 2.3.3 beschrieben, auf Deckgläsern ausgesät und am darauf folgenden Tag für mikroskopische Analysen fixiert. Die Visualisierung der endogenen Proteine erfolgte über spezifische Antikörper gegen ATXN2 und PABP. Wie anhand der Abbildung 7A deutlich wird, wurde eine zytoplasmatische Verteilung von ATXN2 und PABP beobachtet. Auf Grund dieser vergleichbaren Lokalisation der Proteine konnte weiterhin eine Kolokalisation von ATXN2 und PABP im Zytoplasma der Zellen festgestellt werden. Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob eine Assoziation der endogenen Proteine stattfindet. DU145-Zellen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben (2.3.6), lysiert und die entsprechenden Zelllysate für eine Koimmunpräzipitation eingesetzt. Die verwendeten Lysate wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen ATXN2 inkubiert und anschließend mit anti-Maus-IgG-

Dynabeads behandelt. Um unspezifische Bindungen von ATXN2 oder PABP an die paramagnetischen Dynabeads auszuschließen, wurde zusätzlich Lysat ohne Zugabe des ersten Antikörpers inkubiert. Danach erfolgte die Abtrennung der Präzipitate von den Dynabeads durch Aufkochen der Proben. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und immunologisch nachgewiesen. Wie aus Abbildung 7B ersichtlich, wurde PABP mit Hilfe des spezifischen ATXN2 Antikörpers präzipitiert. Da im Kontrollansatz kein Protein nachgewiesen wurde, konnte eine Bindung von ATXN2 oder PABP an die Dynabeads ausgeschlossen, und somit die Interaktion von ATXN2 und PABP belegt werden. Im folgenden sollte nun eine funktionelle Charakterisierung dieser Interaktion vorgenommen werden.

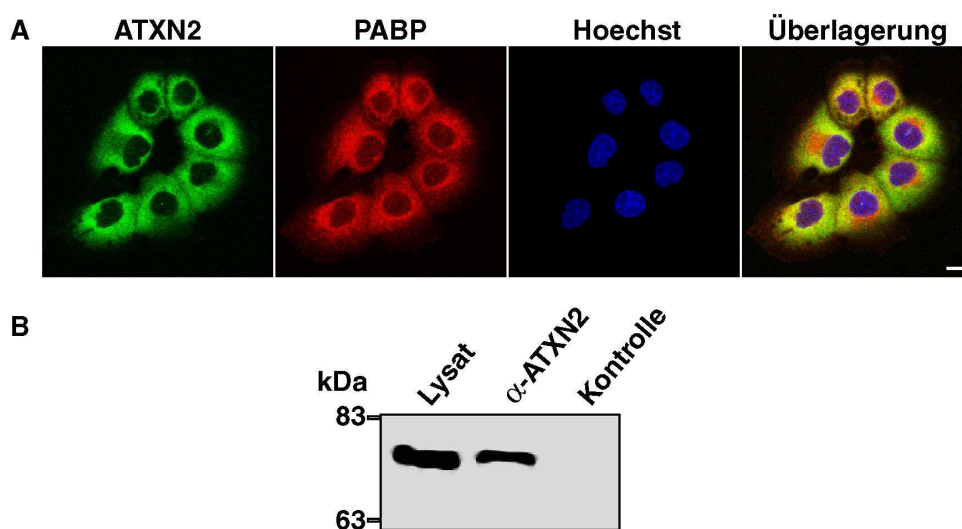


Abbildung 7: Untersuchungen zur Interaktion zwischen ATXN2 und PABP. (A) Immunfluoreszenz-Analyse. DU145-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am darauf folgenden Tag fixiert. Die endogene Lokalisation von ATXN2 und PABP wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen ATXN2 und PABP visualisiert. Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. Der Balken entspricht 10 µm. (B) Koimmunpräzipitation. 100 µg DU145-Proteinlysate wurde mit 1 µl eines ATXN2-spezifischen Antikörpers inkubiert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich Lysat ausschließlich mit Dynabeads inkubiert. Präzipitiertes PABP wurde auf einem Immunoblot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen PABP nachgewiesen. Zum Nachweis der endogenen Expression von PABP in DU145-Zellen wurden 20 µg Zelllysate auf das SDS-Gel aufgetragen und immunologisch nachgewiesen.

3.2 Einfluss von unterschiedlichen Stress-Bedingungen auf die zelluläre Lokalisation von ATXN2

3.2.1 ATXN2 ist eine Komponente von "Stress Granules"

Unter Stress-Bedingungen, wie z.B. Hitze, osmotischer oder oxidativer Stress, kommt es zu einer Akkumulation von PABP in sogenannten "Stress Granules" (SGs) [118]. Diese stellen zytoplasmatische Proteinakkumulationen dar, in denen untranslatierte mRNAs unter Stress-Bedingungen gespeichert werden. In diesen Strukturen befinden sich neben mRNA verschiedene RNA-stabilisierende und -destabilisierende Proteine, Translationsinitiationsfaktoren und RNA-Bindeproteine wie TIA-1 und TIAR [111]. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob ATXN2, auf Grund der Interaktion mit PABP, ebenfalls eine Komponente von SGs darstellt.

Zur Klärung dieser Frage wurden DU145-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und jeweils für eine Stunde bei 43,5°C inkubiert oder bei 37°C mit 0,5 mM Arsenit behandelt. Anschließend erfolgte die Färbung von ATXN2 und PABP mit spezifischen Antikörpern. Es zeigte sich, dass PABP, wie bereits publiziert, unter Stress-Bedingungen in granulären Strukturen im Zytoplasma der Zellen akkumulierte. Interessanterweise kolokalisierte ATXN2 mit PABP in diesen zytoplasmatischen Strukturen (Abbildung 8A), und war auch überwiegend in den granulären Strukturen akkumuliert; PABP hingegen konnte weiterhin im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Hitzeschockbehandlung traten die zytoplasmatischen, punktuellen Strukturen unter Arsenit-Einwirkung vermehrt auf. Des weiteren waren diese Strukturen unter Hitzestress vermehrt perinukleär lokalisiert, während sie unter oxidativen Stress-Bedingungen überwiegend im Zytoplasma nachgewiesen werden konnten.

Im weiteren sollte mit Hilfe eines weiteren SG-Markerproteins geklärt werden, ob diese ATXN2-Akkumulationen tatsächlich SGs repräsentieren. Da das RNA-Bindeprotein TIA-1 als Markerprotein für SGs beschrieben, und TIA-1 ein essentielles Protein für die Formation dieser Strukturen darstellt [118, 143], wurde dieses Protein zur Verifizierung

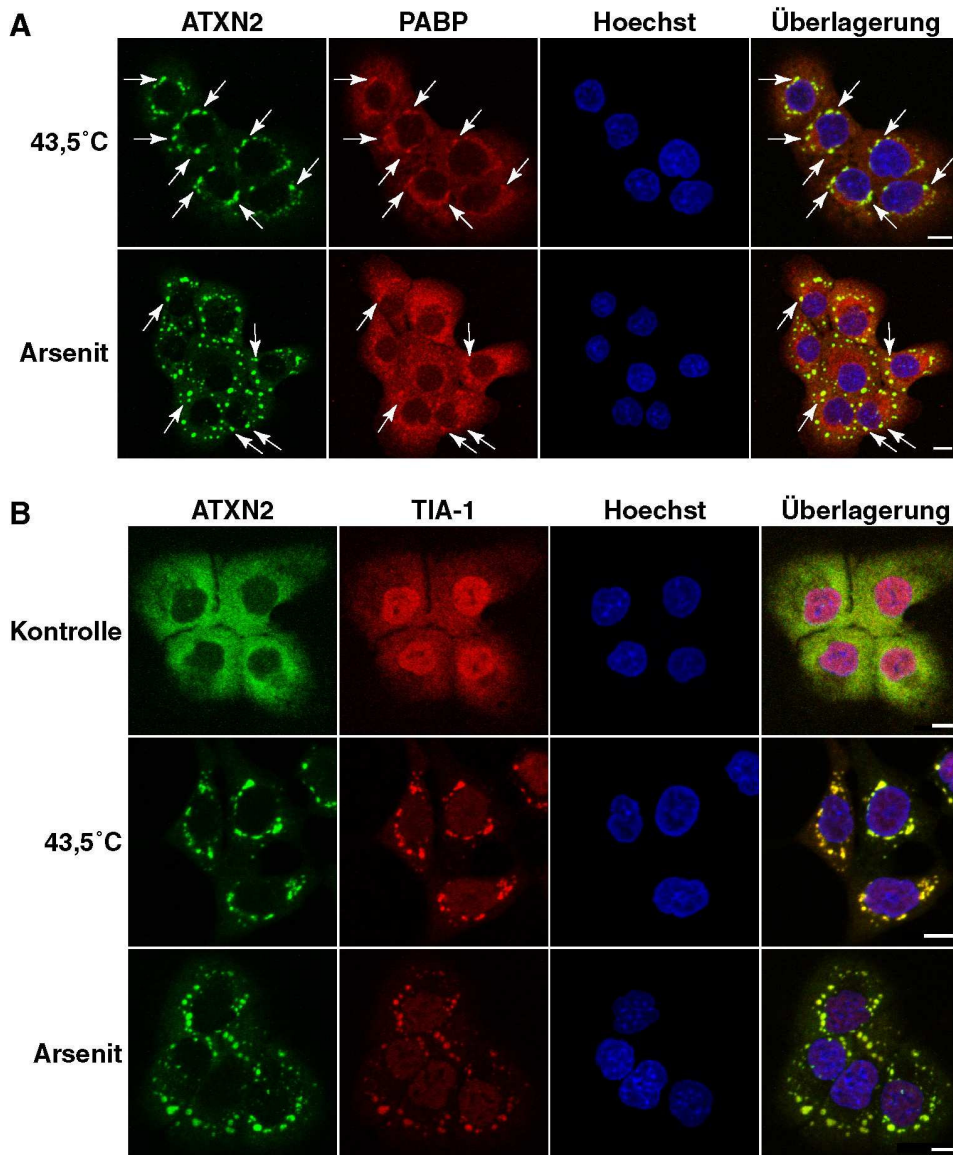


Abbildung 8: ATXN2 ist eine Komponente von Stress granules. (A) Immunfluoreszenz-Analyse. DU145-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am folgenden Tag für jeweils eine Stunde bei 43,5°C im Wasserbad inkubiert oder mit 0,5 mM Arsenit behandelt. Anschließend erfolgte die Färbung der endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und PABP. Die Pfeile heben PABP-positive Strukturen hervor. Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. (B) Immunfluoreszenz-Analyse. DU145-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben behandelt. Anschließend erfolgte die Färbung der endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und TIA-1. Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. Balken entsprechen 10 μm .

der zytoplasmatischen SGs verwendet. Dazu wurden DU145-Zellen den gleichen Stress-Bedingungen, wie oben beschrieben, ausgesetzt. Anschließend wurden die endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und TIA-1 gefärbt.

Es zeigte sich, dass TIA-1, wie bereits publiziert, unter normalen Bedingungen überwiegend im Zellkern lokalisiert vorlag (Abbildung 8B; obere Reihe). Geringere Konzentrationen konnten jedoch auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise konnte eine Kolo-kalisation von ATXN2 und TIA-1, unter den gewählten Stress-Bedingungen, in zytoplasmatischen Strukturen beobachtet werden. Bedeutenderweise waren sämtliche TIA-1-positiven SGs auch mit ATXN2 markiert (Abbildung 8B, Überlagerung).

Letztlich wurde eine weitere Komponente von SGs, das Protein Staufen 1, in die Untersuchungen mit einbezogen. Staufen 1 als auch Staufen 2 sind RNA-Bindeproteine, welche doppelsträngige RNA binden können und stellen unter oxidativen Stress-Bedingungen ebenfalls Komponenten von SGs dar [144]. Ob Staufen jedoch auch unter Hitzestress-Bedingungen in SGs lokalisiert, wurde bislang noch nicht analysiert.

Zu diesem Zweck wurden DU145-Zellen auf Deckgläser ausgebracht und am darauf folgenden Tag für jeweils eine Stunde Hitze- oder oxidativem Stress ausgesetzt. Zur Kontrolle der Lokalisation von Staufen in DU145-Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen wurde eine Zellkultur-Probe unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben (2.5), für Immunfluoreszenz-Studien präpariert, und die endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und Staufen gefärbt.

Unter normalen Wachstumsbedingungen lokalisierte Staufen im Zytoplasma der Zellen (Abbildung 9; Kontrolle), während das Protein sowohl unter Hitzestress als auch unter oxidativen Stress-Bedingungen in SGs akkumulierte.

Durch die Kolo-kalisation von ATXN2 mit den drei SG-Komponenten, PABP, TIA-1 und Staufen, konnte bestätigt werden, dass ATXN2 eine Komponente von SGs darstellt. Zu-

sätzlich dazu kann ATXN2 ebenfalls als Marker dieser Strukturen angesehen werden, da ATXN2 in allen TIA-1-markierten SGs lokalisiert war.

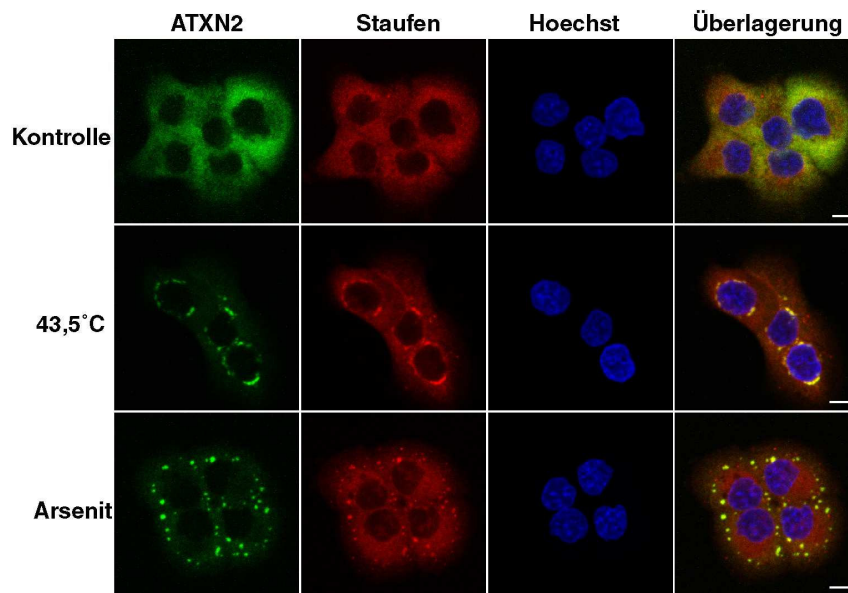


Abbildung 9: Staufen ist auch unter Hitzestress eine Komponente von Stress granules. Immunfluoreszenz-Analyse. DU145-Zellen wurden eine Stunde lang Hitze- oder oxidativem Stress ausgesetzt und anschließend für Immunfluoreszenzaufnahmen mit Antikörpern gegen ATXN2 und Staufen inkubiert. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht. Balken entsprechen 10 μm .

3.2.2 Auswirkung von Stress-Bedingungen auf die endogene ATXN2-Konzentration

Da die zytoplasmatische Lokalisation von ATXN2 durch Stress beeinflusst wurde, sollte im weiteren untersucht werden, ob es unter Umständen auch zu einer Veränderung der endogenen Konzentration dieses Proteins unter Stress-Bedingungen kommt.

Zu diesem Zweck wurden DU145-Zellen für 30 - 120 min mit Hitze oder Arsenit behandelt; als Kontrolle wurden Zellen über die gesamte Zeit bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen lysiert und die Ansätze mittels SDS-PAGE getrennt. Nachfolgend wurden die Gele zur Färbung der Proteine mit Coomassie behandelt (2.3.10), oder die Proteine zur weiteren immunologischen Analyse mittels Elektroblob auf

eine Nitrozellulosemembran übertragen (2.3.11).

In Folgenden sollte zunächst bestätigt werden, dass es bei diesen Behandlungen der Zellen zur Induktion der Stressantwort kam. Zu diesem Zweck wurden die endogenen HSC70- und HSP70-Konzentrationen untersucht, da diese zwei Protein-Isoformen Hitzeschockproteine darstellen und unter verschiedenen Bedingungen im Zytoplasma der Zellen gebildet werden. HSC70 besitzt eine Größe von 73 kDa und wird konstitutiv exprimiert. HSP70, die 72 kDa große Isoform, wird in geringen Konzentrationen ebenfalls konstitutiv gebildet; als Reaktion auf Hitzestress oder oxidativen Stress wird jedoch eine vermehrte Expression induziert [145]. Der verwendete Antikörper ist gegen beide Proteine gerichtet, so dass sowohl HSC70 als auch HSP70 detektiert werden.

Der immunologische Nachweis zeigte, dass eine Hitzestress-Behandlung zu einer deutlichen Induktion der stress-induzierbaren Isoform HSP70 führte, da nach 60 min eine zweite Protein-Bande sichtbar wurde (Abbildung 10; rechts, mittlerer Block). Auch unter oxidativen Stress-Bedingungen konnte eine Zunahme der HSP70-Konzentration beobachtet werden, welche jedoch weniger deutlich war. Dennoch konnte hiermit belegt werden, dass bei beiden Stress-Behandlungen eine Hitzeschock-Antwort der Zellen induziert wurde.

Im weiteren zeigte sich, dass es ebenfalls zu einer kontinuierlichen Zunahme der endogenen ATXN2-Konzentration unter Hitzestress kam (Abbildung 10; rechts, oberer Block). Auch unter oxidativen Stress-Bedingungen war nach 30 min ein Anstieg der endogenen ATXN2-Konzentration im Vergleich zu Kontroll-Zellen zu erkennen. Jedoch war der beobachtete Konzentrationsanstieg im Vergleich zum ATXN2-Konzentrationsanstieg nach Hitzebehandlung geringer.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf Konzentrationsunterschiede der verwendeten Proben oder Unregelmäßigkeiten beim Blotvorgang resultierten, wurden zwei Kontrollansätze durchgeführt. Zum einen wurde ein SDS-Gel mit Coomassie angefärbt, um eventuelle Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen aufge-

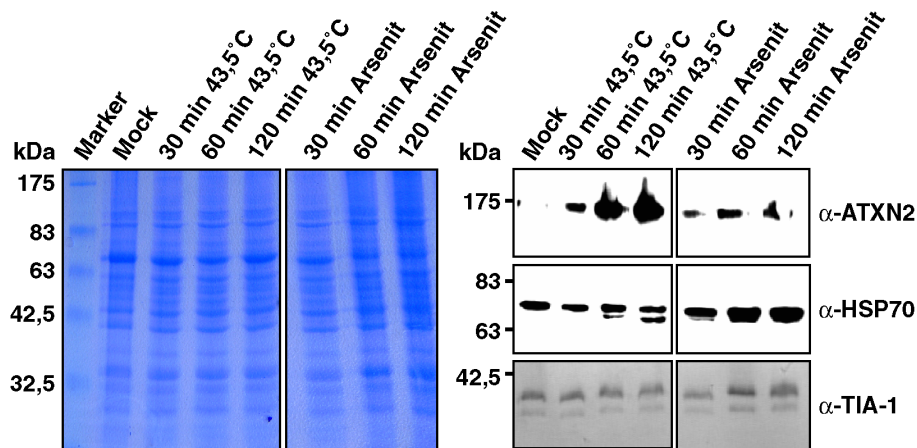


Abbildung 10: Einfluss von verschiedenen Stress-Bedingungen auf die endogene ATXN2-Konzentration. Dargestellt sind ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel und ein Western Blot. DU145-Zellen wurden für 30 - 120 min mit Hitze oder Arsenit behandelt und lysiert. Je 20 μg Proteinlysate wurden auf 10 %-ige SDS-Gele aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Gele entweder mit Coomassie gefärbt (links) oder auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (rechts). Auf der Membran erfolgte der immunologische Nachweis von ATXN2, HSP70 oder TIA-1.

tragenen Lysat-Proben zu verdeutlichen. Zum anderen wurde für eine kombinierte Lade- und Blotkontrolle, in Form eines immunologischen Nachweises von TIA-1, in die Untersuchung mit einbezogen, da in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die intrazelluläre TIA-1-Konzentration unter Stress keinen Veränderungen unterliegt [112].

Hierbei zeigte sich, dass das immunologisch nachgewiesene TIA-1 im Falle der Hitzestress-Proben eine vergleichbare Intensität aufwies, so dass eine vergleichbare Proteinkonzentrationen dieser Lysate belegt wurde (Abbildung 10; rechts, unterer Block). Die Proben der mit oxidativem Stress behandelten Zellen zeigten hingegen eine verstärkte TIA-1-Proteinbanden-Intensität für 60 und 120 min. Dies spricht für eine höhere Proteinkonzentration dieser Proben, was durch das Coomassie gefärbte SDS-Gel bestätigt wurde. Während die Proben der Kontrolle, der Hitzestresszeitreihe und der Arsenitinkubation bei 30 min eine gleichmäßige Intensität der gefärbten Proteinbanden aufwiesen, zeigten die Proben für oxidativen Stress bei 60 und 120 min eine

intensivere Färbung (Abbildung 10; links). Somit war in diesen Proben insgesamt eine höhere Protein-Konzentration enthalten, worauf die höhere Intensität der detektierten Proteinbanden in diesen Proteinlysaten beruhte. Da die Proteinlysate im Falle der Kontrolle (Mock) und der 30-minütigen Arsenit-Behandlung jedoch eine gleichmäßige Färbung im Coomassie-gefärbten Gel und eine gleichmäßige TIA-1-Immunreaktivität aufwiesen, konnte der Anstieg des ATXN2-Levels auch für oxidative Stress-Bedingungen belegt werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass eine Zunahme der ATXN2-Konzentration unter Stress-Bedingungen zu beobachten war. Es konnte ein starker Anstieg des ATXN2-Levels unter Hitzestress verzeichnet werden, während die Akkumulation der ATXN2-Immunreaktivität unter oxidativen Stress-Bedingungen weniger stark ausgeprägt war. Dies kann als Hinweis auf eine differenzierte Stressantwort von Zellen auf verschiedene Stress-Bedingungen angesehen werden. Dieses wird möglicherweise auch durch das differenzierte Expressionsverhalten von HSP70 unter Hitze- und oxidativen Stress-Bedingungen untermauert.

3.2.3 Untersuchungen zur Stabilität der SG-Strukturen

Stress Granules stellen sehr dynamische zelluläre Strukturen dar, die innerhalb von 15 - 30 min als Antwort auf Umweltstress gebildet werden. Mit Hilfe von FRAP-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der SGs einem ständigen Wandel unterliegt [112]. So sind viele SG-assoziierte Proteine (z.B. TIA-1, TIAR und PABP) in der Lage zwischen SGs und Zytoplasma zu pendeln. Auch stehen SGs mit Polysomen im Equilibrium, wodurch Agenzien, welche die Stabilität von Polysomen beeinflussen, gleichzeitig die Stabilität und die Formation von SGs verändern [112]. Werden Polysomen z.B. durch Puromycin destabilisiert, führt das zu einer vermehrten Bildung von SGs. Erfolgt eine Stabilisierung der Polysomen durch z.B. Cycloheximid, kommt es zu einer Auflösung von SGs. In den nachfolgenden Untersuchungen sollte nun die zellu-

läre Lokalisation von ATXN2 unter Zugabe dieser beiden Chemikalien untersucht werden.

Im ersten Schritt sollte zunächst der Einfluss von Puromycin auf die Lokalisation von ATXN2 unter normalen als auch unter Stress-Bedingungen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und für eine Stunde mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin inkubiert. Zusätzlich zur Puromycin-Behandlung wurden die Zellen entweder bei 43,5°C inkubiert oder mit 0,5 mM Arsenit behandelt. Danach wurden die Zellen fixiert und für Immunfluoreszenzaufnahmen, wie unter 2.3.12 beschrieben, präpariert. Hierbei wurden die Zellen, zum Nachweis der endogenen Proteine, mit Antikörpern gegen ATXN2 und TIA-1 inkubiert.

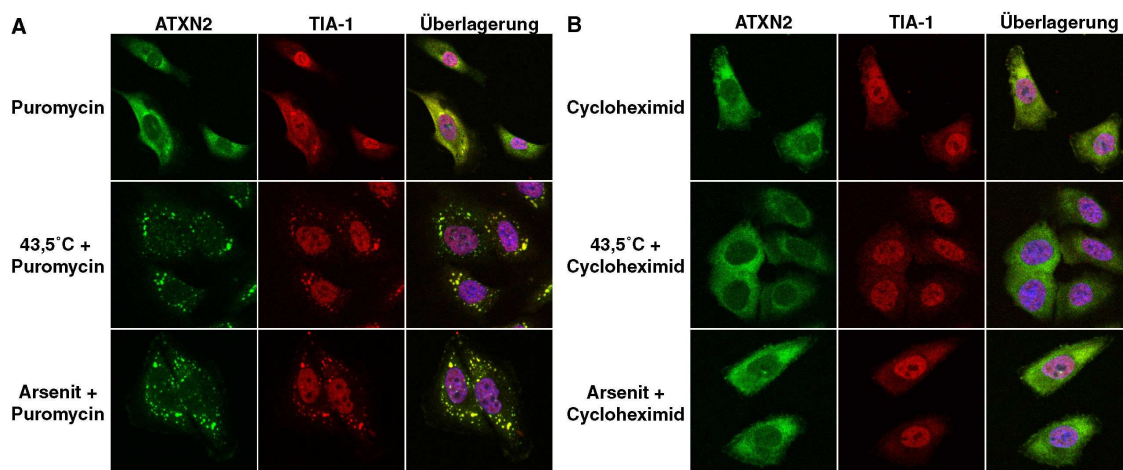


Abbildung 11: Immunfluoreszenz-Analyse zur Stabilität und Formation von SGs mittels Puromycin oder Cycloheximid. (A) HeLa-Zellen wurden für eine Stunde mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin behandelt und zusätzlich einer Hitze- oder oxidativen Stress-Behandlung ausgesetzt. Anschließend wurden die endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und TIA-1 immunologisch gefärbt. (B) HeLa-Zellen wurden für eine Stunde mit 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen entweder bei 43,5°C inkubiert oder mit 0,5 mM Arsenit behandelt. Anschließend wurden die endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und TIA-1 gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht.

Anhand der Abbildung 11A ist zu erkennen, dass sich die Lokalisation von ATXN2 und TIA-1 unter Zugabe von Puromycin, im Vergleich zu normalen Wachstumsbedingungen,

nicht wesentlich veränderte (vergleiche auch Abbildung 8B). ATXN2 zeigte weiterhin überwiegend eine zytoplasmatische Lokalisation, während TIA-1 vornehmlich nukleär detektiert wurde. In einzelnen Zellen konnten jedoch auch unter diesen Bedingungen SGs detektiert werden (Abbildung 11A Puromycin). Wie erwartet, führte eine zusätzliche Stressbehandlung der Zellen zur Bildung von SGs in allen Zellen. Hierbei war es auffällig, dass die SGs in HeLa-Zellen, welche mit Hitze und Puromycin behandelt worden waren, nicht mehr vorwiegend perinukleär lokalisierten, sondern über das gesamte Zytoplasma verteilt waren, im Vergleich zu DU145-Zellen, welche nur einer Hitze-Behandlung unterzogen worden waren (vergleiche z.B. Abbildung 8B). Es traten auch vermehrt sehr kleine ATXN2-markierte zytoplasmatische Strukturen auf, die durch eine zusätzliche TIA-1-Färbung als SGs verifiziert werden konnten.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Polysom-stabilisierenden Agens, Cycloheximid, auf die SG-Strukturen analysiert. Hierzu wurden HeLa-Zellen für eine Stunde mit 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid behandelt. Die Generierung der zusätzlichen Stress-Bedingungen erfolgte wie in Material und Methoden unter 2.3.5 beschrieben. Darauf folgend wurden die Zellen für Immunfluoreszenzaufnahmen vorbereitet und anschließend zum Nachweis der endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und TIA-1 inkubiert.

Es zeigte sich, dass eine Cycloheximid-Behandlung der Zellen keinen Einfluss auf die zytoplasmatische ATXN2-Lokalisation hatte und TIA-1 vornehmlich nukleär detektiert werden konnte (Abbildung 11B). Dies entsprach wiederum der Lokalisation der Proteine unter normalen Wachstumsbedingungen (vergleiche Abbildung 8B). Unter Induktion von Hitze- oder oxidativem Stress und gleichzeitiger Inkubation mit Cycloheximid konnten jedoch in den Zellen keine SGs beobachtet werden. Dieser Befund steht im Einklang mit Ergebnissen von Kedersha et al., die zeigen konnten, dass sowohl TIA-1-positive SGs, als auch poly(A)RNA-positive SGs mit Behandlung von Emetine, welches ähnliche Eigenschaften wie Cycloheximid besitzt, bei gleichzeitigem oxidativem Stress aufgelöst

wurden [112].

Mittels dieser hier durchgeführten Untersuchungen konnte verifiziert werden, dass die ATXN2-positiven granulären Strukturen, die unter Stress-Bedingungen im Zytoplasma von Zellen entstehen, SGs darstellen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich ATXN2 ebenso verhält wie das SG-Markerprotein TIA-1. Somit konnte ATXN2 nochmals als Komponente von SGs als auch als ein weiteres Markerprotein bestätigt werden.

3.3 Besitzt ATXN2 eine Funktion beim funktionellen Zusammenspiel von SGs und P-bodies?

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe und unseres Kollaborationspartners Dr. M. Albrecht (Saarbrücken) konnte gezeigt werden, dass die beschriebene Interaktion zwischen Pbp1 und Dhh1 auf die humanen Proteine ATXN2 und DDX6 übertragbar war. Dies wurde mit Hilfe von "Yeast-2-Hybrid-Studien" bestätigt. Zusätzlich dazu gelang es, die Assoziation von endogenem ATXN2 und DDX6 in HEK293T- und SH-SY5Y-Zellen zu zeigen [138].

Arbeiten anderer Gruppen konnten interessanterweise zeigen, dass überexprimiertes DDX6 in P-body-Strukturen lokalisiert [96, 135]. Diese stellen zytoplasmatische granuläre Strukturen dar, die unter normalen Wachstumsbedingungen in Zellen zu finden sind und eine Rolle in der zellulären mRNA-Degradation besitzen [108]. Des Weiteren beinhalten P-bodies einige Proteine, wie z.B. DDX6, die unter Stress-Bedingungen zusätzlich in SGs lokalisieren [111, 135]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass P-bodies und SGs unter Stress-Bedingungen aneinander anlagern was zu dem Postulat führte, dass zuvor in SGs gespeicherte mRNA in P-bodies überführt und somit der Degradation zugeführt werden kann [134, 135]. Auf Grund der vorangegangenen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und der Befunde anderer Forschergruppen, sollte nun überprüft werden, ob ATXN2 eine Rolle bei dem funktionellen Zusammenspiel dieser beiden Strukturen einnimmt.

3.3.1 Verifizierung der Interaktion von ATXN2 und DDX6

Zusätzlich zur beschriebenen Interaktion von ATXN2 und DDX6 in HEK293T- und SH-SY5Y-Zellen, sollte eine Assoziation der Proteine in den, häufig für Analysen der SG-Strukturen eingesetzten, DU145-Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden diese, wie unter 2.3.6 beschrieben lysiert, und die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Je 100 μg Zelllysate wurde mit 1 μl eines spezifischen Antikörpers gegen ATXN2, wie in Material und Methoden beschrieben (2.3.8), eingesetzt und mit Hilfe von SDS-PAGE und Immunoblotting, wie unter 2.3.9 und 2.3.11 beschrieben, analysiert. Darauf folgend sollte die zelluläre Lokalisation von endogenem DDX6 in DU145-Zellen unter normalen und Stress-Bedingungen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden DU145-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und einer Stress-Behandlung ausgesetzt. Anschließend folgte die Präparation der Zellen für Immunfluoreszenz-Aufnahmen (siehe 2.3.12).

Wie anhand der Abbildung 12A deutlich wird, konnte die Interaktion zwischen endogenem ATXN2 und endogenem DDX6 auch in DU145-Zellen nachgewiesen werden, da es gelang DDX6 mit einem ATXN2-spezifischen Antikörper zu präzipitieren.

Zusätzlich zeigten Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von endogenem DDX6, dass dieses Protein unter normalen Wachstumsbedingungen im Zytoplasma lokalisierte, wobei zusätzlich kleine granuläre Strukturen, die sogenannten P-bodies, zu erkennen waren (Abbildung 12B (Kontrolle)). Unter Stress-Bedingungen jedoch wurden im Zytoplasma der Zellen sowohl kleinere als auch größere punktuelle Ansammlungen, mit einem spezifischen Antikörper gegen DDX6 detektiert. Zudem zeigte es sich, dass DDX6 und ATXN2 in den größeren Proteinakkumulationen kolokalisierten. Wie auch überexprimiertes DDX6, konnte erstmals endogen exprimiertes DDX6 in P-bodies nachgewiesen werden. Zudem gelang es erstmalig, endogenes DDX6 unter Stress-Bedingungen in SGs zu detektieren.

Des Weiteren war es ersichtlich, dass die zellulären P-body-Strukturen mit Rand-

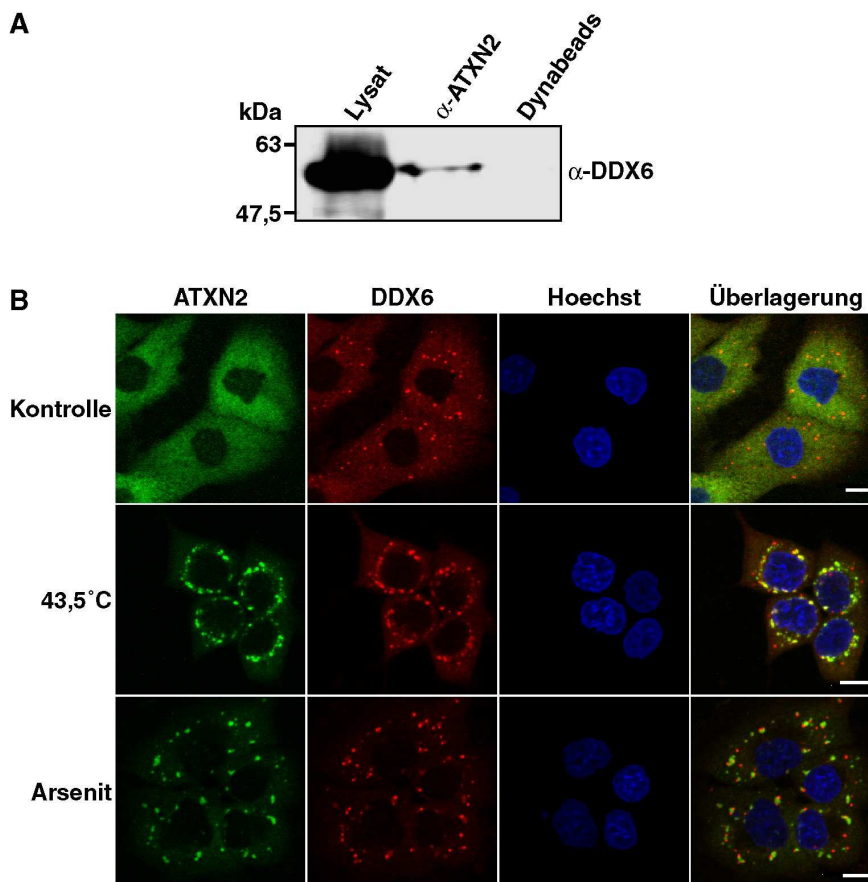


Abbildung 12: Untersuchungen zur Interaktion von ATXN2 und DDX6. (A) Koimmunpräzipitation von DDX6 mit ATXN2. 100 μg Proteinlysate von DU145-Zellen wurden mit 1 μl eines ATXN2-spezifischen Antikörpers inkubiert. Präzipitiertes DDX6 wurde auf einem Immunoblot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen DDX6 nachgewiesen. Als endogene Expressionskontrolle von DDX6 in DU145 wurde 20 μg Zelllysate eingesetzt. (B) Immunfluoreszenz-Analyse von ATXN2 und DDX6 in DU145-Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen und Stress. DU145-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, am folgenden Tag eine Stunde lang mit Hitze (43,5°C) oder oxidativem Stress (0,5 mM Arsenit) behandelt und anschließend für Immunfluoreszenzaufnahmen mit Antikörpern gegen ATXN2 und DDX6 zur Färbung der endogenen Proteine behandelt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht. Balken entsprechen 10 μm .

bereichen der SGs kolokalisierten. In der Literatur wurde bisher beschrieben, dass eine Zusammenlagerung von P-bodies und SGs unter oxidativen Stress-Bedingungen stattfindet [134, 135]. Mit diesen Arbeiten gelang jedoch auch der Nachweis, dass diese Strukturen unter Hitzestress-Bedingungen miteinander interagieren.

Um dieses Ergebnis im Folgenden zu validieren, wurde zusätzlich das P-body-Markerprotein DCP1 in die Untersuchungen einbezogen. Deshalb wurden DU145-Zellen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, behandelt und mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und DCP1 inkubiert.

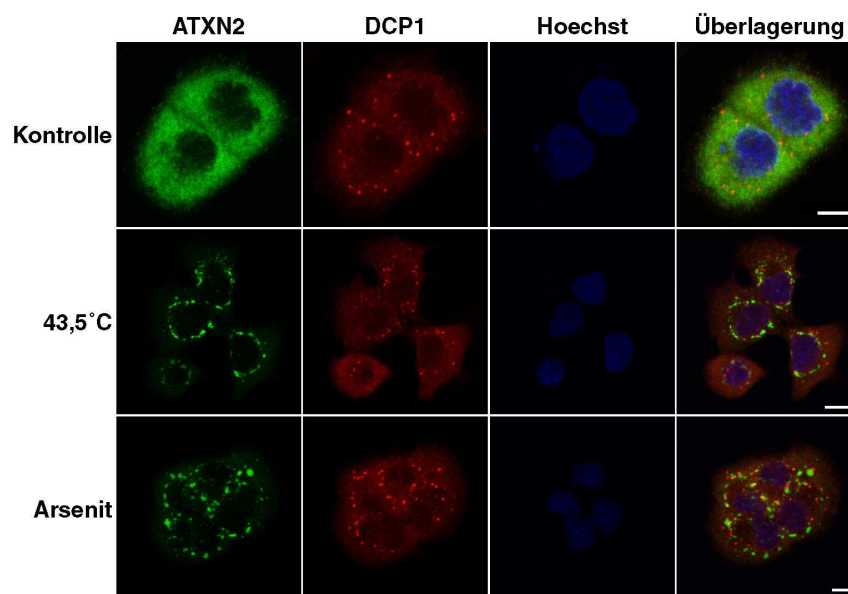


Abbildung 13: Lokalisation des P-body-Markerproteins DCP1 unter Stress-Bedingungen. Immunfluoreszenz-Analyse. DU145-Zellen wurden mit Hitze oder Arsenit behandelt, fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und DCP1 gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst visualisiert. Balken entsprechen 10 μm .

Unter normalen Bedingungen lokalisierte DCP1, wie auch DDX6, in den zytoplasmatischen P-body-Strukturen (Abbildung 13). Unter Stress-Bedingungen waren diese Strukturen wiederum an den Randbereichen von SGs und P-bodies überlagert. Eine weitere Kolo-kalisation von DCP1 und ATXN2 war, wie zu erwarten, nicht zu beobachten, da DCP1 als P-body-Markerprotein eine exklusive P-body-Lokalisation aufweist.

Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig eine Lokalisation von endogenem DDX6 in P-

bodies als auch in SGs gezeigt werden. Zudem wurde eine Anlagerung dieser beiden Strukturen erstmals unter Hitzestress belegt.

3.3.2 Untersuchungen zur Stabilität und Formation der P-body-Strukturen

Wie bereits in Abschnitt 3.2.3 erwähnt, beeinflussen Puromycin und Cycloheximid die Stabilität von SGs. P-bodies befinden sich, wie in der Einleitung unter 1.4 erläutert, auch in einem Equilibrium mit den zur Translation benötigten Polysomen. In der Literatur wurde beschrieben, dass Cycloheximid die zellulären P-body-Strukturen durch Stabilisierung der Polysomen auflöst. Puromycin hingegen wirkt destabilisierend auf Polysomen und somit auch stabilisierend auf P-bodies [96, 135]. Nun sollten diese Beobachtungen wiederum auf Stress-Bedingungen übertragen werden. Hierbei lag der Fokus dieser Untersuchungen auf der zu erwartenden Auflösung bzw. vermehrten Akkumulation von P-bodies, wobei eine Behandlung von Zellen mit Puromycin zu einer erhöhten Akkumulation von P-bodies führen sollte.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden DU145-Zellen auf Deckgläsern ausgesät, mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin behandelt und zusätzlich entweder bei 43,5°C oder mit 0,5 mM Arsenit inkubiert. Anschließend wurden die endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und DDX6 für mikroskopische Aufnahmen gefärbt.

Diese Analyse zeigte, dass eine Destabilisierung der Polysomen zu einer vermehrten Bildung P-bodies führte, da in sämtlichen Zellen P-bodies detektiert werden konnten (Abbildung 14). Dies war ohne Zugabe von Puromycin nicht zu erkennen, denn unter normalen Wachstumsbedingungen wurden auch Zellen ohne erkennbare P-bodies beobachtet. Zudem war, wie zuvor gezeigt, sowohl unter Hitze- als auch oxidativen Stress-Bedingungen, eine große Anzahl von SGs in den Zellen zu erkennen.

In einer weiteren Untersuchung sollte der Einfluss von Cycloheximid unter Stress-Bedingungen auf die zellulären P-body-Strukturen untersucht werden. Cycloheximid führt, wie erwähnt, zur Stabilisierung von Polysomen und damit zur Destabilisierung von

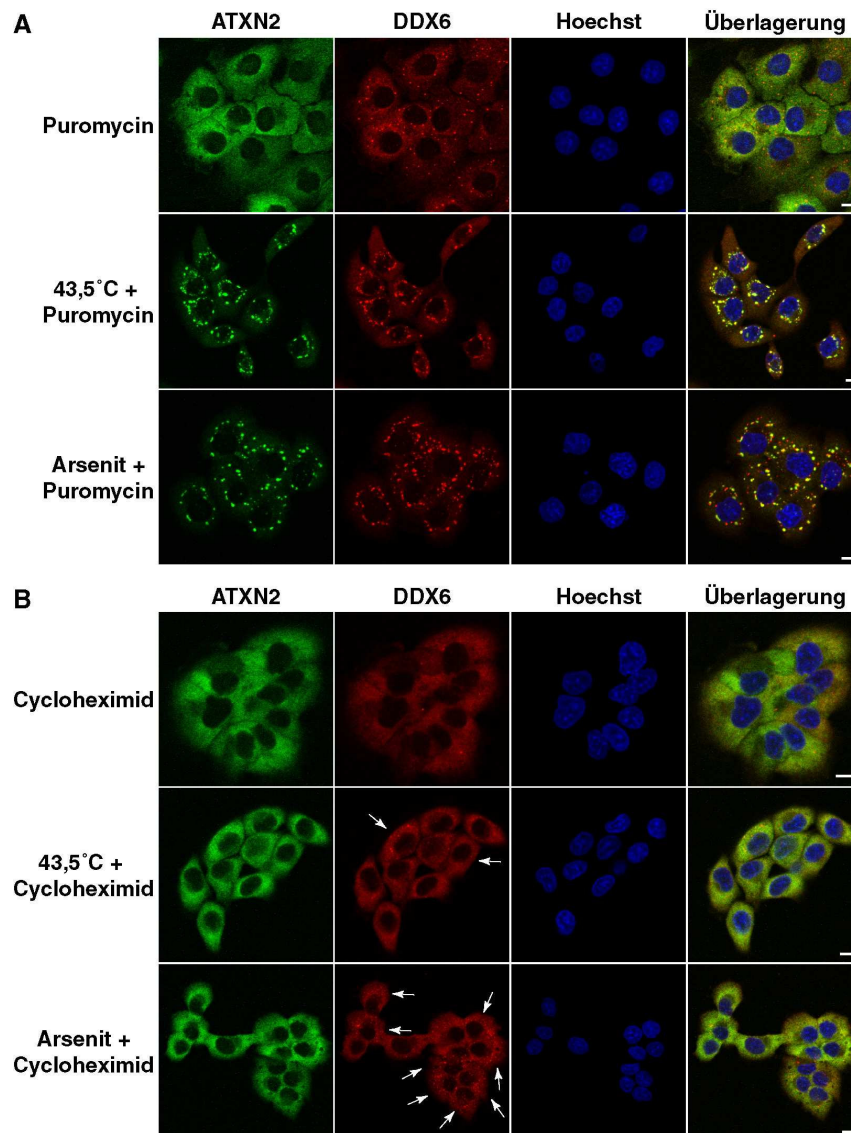


Abbildung 14: Beeinflussung der P-body-Formation mittels Puromycin und Cycloheximid. Immunfluoreszenz-Analysen. (A) DU145-Zellen wurden für eine Stunde mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen bei 43,5°C im Wasserbad oder mit 0,5 mM Arsenit inkubiert. Proteine wurden mit Antikörpern gegen ATNX2 und DDX6 sichtbar gemacht. Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt. (B) DU145-Zellen wurden für eine Stunde mit 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid behandelt. Zusätzlich dazu wurden die Zellen bei 43,5°C im Wasserbad oder mit 0,5 mM Arsenit inkubiert. Proteine wurden mit Antikörpern gegen ATNX2 und DDX6 gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt. Pfeile weisen auf Zellen mit P-bodies hin. Balken entsprechen 10 μm .

P-bodies. DU145-Zellen, welche für eine Stunde mit 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid inkubiert worden waren, wurden gleichzeitig mit Hitze oder Arsenit behandelt.

Anhand der Abbildung 14 (obere Zeile) wird deutlich, dass die Inkubation mit Cycloheximid zu einer fast vollständigen Auflösung von P-bodies in den Zellen führte. Unter Stress-Bedingungen zeigte sich ein verändertes Bild. Hitzestress kombiniert mit einer Cycloheximid-Inkubation der Zellen resultierte in einer vermehrten Akkumulation von P-bodies in ca. 55 % der Zellen (Abbildung 14; mittlere Zeile, Pfeile). Wurde oxidativer Stress, kombiniert mit einer Translationshemmung durch Cycloheximid induziert, traten P-bodies jedoch in einer größeren Anzahl und in ca. 80 % der Zellen auf (Abbildung 14; untere Zeile, Pfeile).

Oxidativer Stress scheint somit die Stabilisierung von Polysomen teilweise zu unterdrücken oder zu einer von Hitzestress verschiedenen Stressantwort zu führen, in der vermehrt mRNA in die P-bodies zur Degradation zugeführt wird. Dieses Ergebnis spricht zusätzlich für eine differenzierte Stressantwort von Zellen auf verschiedene Stressarten.

3.4 Einfluss eines veränderten ATXN2-Expressionslevels auf die Lokalisation und zelluläre Konzentration der Interaktionspartner DDX6 und PABP

Die Immunreaktivität von ATXN2 in Purkinje-Zellen in Gehirnen von SCA2-Patienten und alten Menschen ist gegenüber gesunden Menschen erhöht [44, 45]. Daher könnte ein erhöhter ATXN2-Level zu einem Pathomechanismus von SCA2 beitragen. Des Weiteren konnte eine veränderte endogene ATXN2-Konzentration auch mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden. In Neuroblastoma-Zellen sehr heterogener Tumore junger Kinder wurden Veränderungen in der zellulären ATXN2-Konzentration gefunden. In einigen Tumoren führt eine Akkumulation von ATXN2 zu einer Sensibilisierung der Neuroblastoma-Zellen gegenüber Apoptose. Andere Tumore, die eine Amplifikation des *MYCN*-Gens enthielten, wiesen eine signifikante Reduktion der ATXN2-Konzentration gegenüber Tumoren ohne amplifiziertes *MYCN* auf [63]. Deshalb ist es von Bedeutung,

einen veränderten Expressionslevel von ATXN2 in Zellen zu untersuchen, da dieser einen großen Einfluss auf verschiedene Krankheiten auszuüben scheint.

Daher sollte im Folgenden der Einfluss eines verringerten als auch eines erhöhten ATXN2-Levels auf die Konzentration und die Lokalisation der beschriebenen Interaktionspartner, DDX6 und PABP, analysiert werden. Ein weiteres Augenmerk sollte zusätzlich auf eventuelle Veränderungen der beiden beschriebenen zytoplasmatischen Proteinakkumulationen, P-bodies bzw. SGs, liegen.

3.4.1 Eine Reduktion des ATXN2-Expressionslevels mittels RNAi-Technologie

Die Reduktion des endogenen ATXN2-Expressionslevels sollte mittels "RNA interference" (RNAi) erfolgen. RNAi ist ein natürlicher Prozess in eukaryotischen Zellen, der die Expression einzelner Gene mit Hilfe von 21 - 25 nt langen RNA-Stücken reguliert [146, 147]. Zur gezielten Regulation einzelner Gene können synthetische sogenannte siRNAs eingesetzt werden, welche von verschiedenen Firmen kommerziell angeboten werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, mit Hilfe eines Computerprogramms (<http://cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html>) die Zielregion eines Gens zu bestimmen und damit eine sogenannte esiRNA herzustellen [142]. Dabei wird ein Zielstück der DNA, mit einer Länge von 500 - 600 Basenpaaren, ausgewählt und mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Anschließend wird die DNA in RNA umgeschrieben und diese doppelsträngige RNA enzymatisch verdaut. Es entsteht eine sogenannte Endoribonuclease-angefertigte siRNA (esiRNA), welche einen Pool aus siRNA-Molekülen darstellt. Da diese Technik zur Herstellung einer esiRNA eingesetzt werden sollte, wurde eine Region, bestehend aus 588 Basen (Region bp 2846 - 3434 des offenen Leserahmens) des *SCA2* Gens, mit Hilfe der DEQOR-Software bestimmt und wie in Material und Methoden (2.4.1) beschrieben, für die Herstellung der esiRNA herangezogen.

Zur Durchführung der entsprechenden "knock down"-Experimente, sollte in einem ersten Schritt die "knock down"-Effizienz der kommerziell erworbenen siRNA und der selbst hergestellten esiRNA-Moleküle mittels quantitativer "real time" RT-PCR überprüft werden. Zu

diesem Zweck wurden HEK293T-Zellen in Zellkulturtestplatten überführt und anschließend mit den verschiedenen siRNA-Molekülen transient transfiziert. Als Kontrolle (Mock) wurden Zellen ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelt. Nach drei Tagen wurde die RNA der Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben, und eine quantitative "real time" RT-PCR durchgeführt (siehe 2.4.1).

Diese Vorexperimente ergaben, dass im Falle der siATXN2#4 die höchste "knock down"-

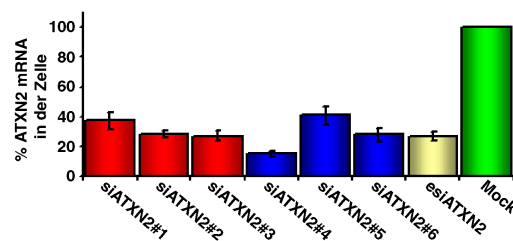


Abbildung 15: Quantitative "real time" RT-PCR-Analyse der mit siRNA behandelten Proben. HEK293T-Zellen wurden mit siATXN2#1 - #6 und esiATXN2 transient transfiziert oder mit Hiperfect behandelt (Mock). Nach drei Tagen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, welche für eine quantitative "real time" RT-PCR unter Verwendung von TaqMan Proben gegen ATXN2 eingesetzt wurde. Die Ergebnisse für Kontrollzellen (Mock) wurden als 100 % definiert und die relativen mRNA-Level der transient mit ATXN2 siRNAs transfizierten Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. Der cDNA-Input der verschiedenen Proben wurde anhand der "real time"-Daten für Beta Aktin (ACTB) normalisiert. Die angegebenen RNA-Level sind repräsentativ aus drei unabhängigen Experimenten gewonnen worden. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Effizienz erreicht wurde; allerdings war auch ein vermehrter Zelltod bei Einsatz dieser siRNA im Vergleich zu den anderen verwendeten siRNAs zu verzeichnen. Des Weiteren zeigte sich, dass die siRNA-Moleküle siATXN2#2, siATXN2#3, siATXN2#6 und die esiRNA eine vergleichbare Reduktion der Transkription von ATXN2 erzielten (Abbildung 15). Um im weiteren mit Zellen arbeiten zu können, die eine im gleichen Maße reduzierte ATXN2-Expression zeigten, wurden die siRNA-Moleküle siATXN2#2, siATXN2#3, siATXN2#6 und die esiATXN2 für die weiteren Versuche ausgewählt.

3.4.2 Einfluss eines verminderten ATXN2-Levels auf die Formation von P-body-Strukturen

Im Folgenden sollte zunächst der Einfluss einer verminderten ATXN2-Expression auf die Formation von P-bodies untersucht werden. Hierzu wurde HEK293T-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und transient mit den siRNA-Molekülen siKontrolle#1, siATXN2#3 und siATXN2#6 transfiziert oder als Kontrolle ausschließlich mit Hiperfect behandelt. Nach drei Tagen erfolgte die Vorbereitung der Zellen für die nachfolgenden Immunfluoreszenz-Analysen. Dabei wurden die endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und DDX6 gefärbt.

Anhand dieser Analyse zeigte sich, dass kein deutlicher Unterschied in Größe oder Anzahl der P-body-Strukturen zwischen den Kontroll- und "knock down"-Proben zu beobachten war (Abbildung 16A). Es waren weder weniger noch in der Größe veränderte P-body-Strukturen zu erkennen. Somit scheint eine Reduktion der endogenen ATXN2-Konzentration keinen Einfluss auf die Formation von P-bodies unter normalen Wachstumsbedingungen auszuüben.

Um weiterhin zu analysieren, ob ein reduzierter ATXN2-Level unter Stress-Bedingungen einen Einfluss auf die P-body-Formation oder auf die Assoziation von P-bodies und SGs hatte, wurden HEK293T-Zellen mit den oben genannten siRNAs transient transfiziert. Nach ca. 72 Stunden wurden die Zellen dann zusätzlich für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt.

Die mikroskopischen Aufnahmen, dargestellt in Abbildung 16B, zeigen, dass auch unter Stress-Bedingungen die Anzahl der gebildeten P-body-Strukturen in Zellen mit verminderter ATXN2-Konzentration und den Kontroll-Proben vergleichbar war. Des Weiteren konnte eine Assoziation von P-bodies und SGs auch bei einer verringerten ATXN2-Expression beobachtet werden. Somit zeigte sich bei einer verringerten ATXN2-Konzentration keine signifikante Beeinflussung der Assoziation von P-bodies und SGs in Säugetierzellen unter Stress-Bedingungen. Interessanterweise aber schienen die gebildeten SGs in Zellen mit vermindertem ATXN2-Level, verglichen mit den SGs in Kontroll-

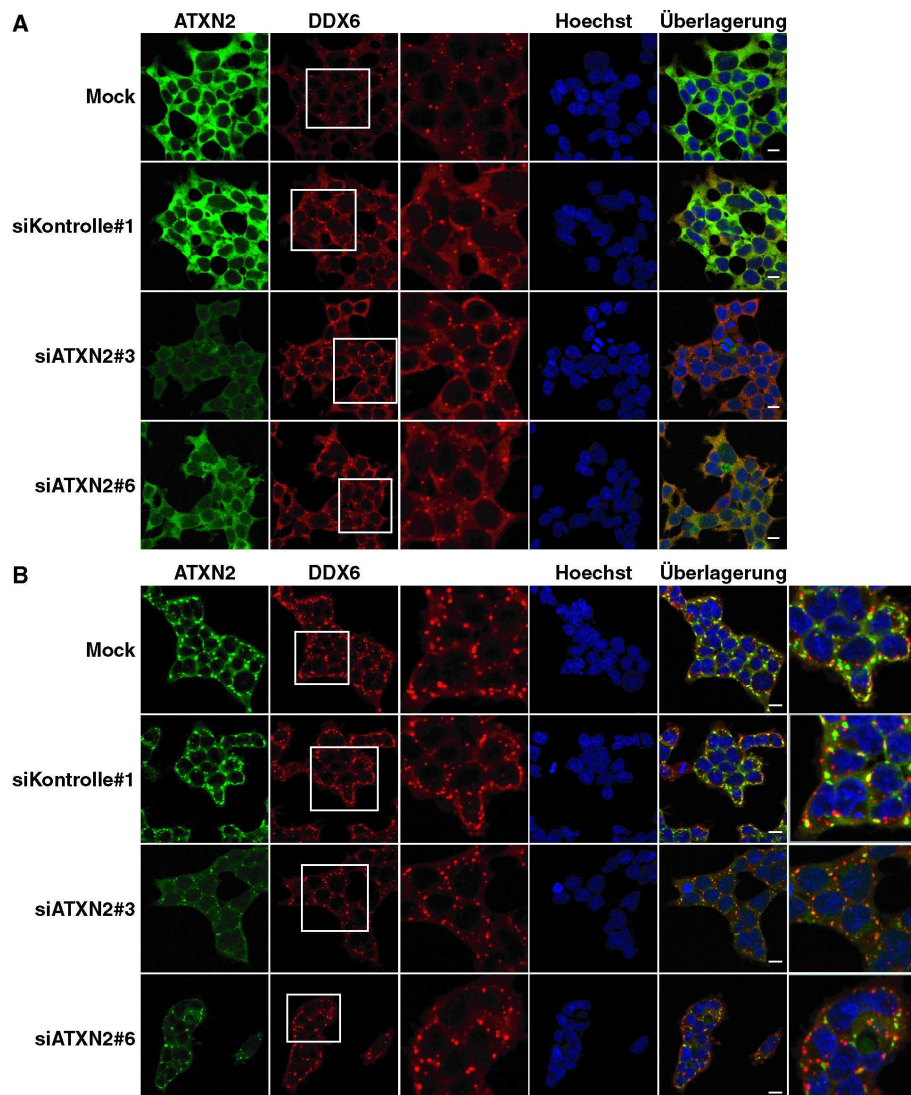


Abbildung 16: Ein reduzierter endogener Level von ATXN2 hat keinen Einfluss auf die Formation von P-bodies. Immunfluoreszenz-Analysen. (A) HEK293T-Zellen wurden auf Deckgläser übertragen und mit Hiperfect (Mock) behandelt oder mit siKontrolle#1, siATXN2#3 oder siATXN2#6 transient transfiziert. Nach drei Tagen erfolgte die Anfärbung der endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und DDX6. Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. Balken entsprechen 10 μm . Zur besseren Ansicht wurden Bildteile (weiße Kästen) vergrößert und in die Abbildung eingefügt. (B) HEK293T-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben transfiziert. Vor der Färbung der Proteine mit ATXN2- und DDX6-Antikörpern wurden die Zellen eine Stunde lang mit 0,5 mM Arsenit behandelt, um oxidativen Stress zu induzieren. Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. Balken entsprechen 10 μm . Zur besseren Ansicht wurden Bildteile (weiße Kästen) vergrößert und in die Abbildung eingefügt.

Zellen, von kleinerer Größe zu sein. Des Weiteren hatte es den Anschein, dass in diesen Zellen zusätzlich weniger SGs gebildet worden waren, da die Zahl ATXN2-positiver SGs geringer war.

3.4.3 Einfluss eines erhöhten ATXN2-Expressionslevels auf die Formation von P-body-Strukturen

Wie erwähnt, wurde eine erhöhte ATXN2 Immunreaktivität in Purkinje-Zellen in "post mortem" Gehirnen von SCA2 Patienten detektiert [44, 45]. Zudem konnte ein gesteigertes ATXN2-Expressionslevel in Neuroblastoma-Tumoren junger Kinder nachgewiesen werden [63]. Des Weiteren wurden in vorangegangenen Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe erste Hinweise einer Beeinflussung der Lokalisation von DDX6 unter erhöhten ATXN2-Konzentrationen gefunden (Diplomarbeit F. Welzel). Um die Auswirkungen einer höheren ATXN2-Konzentration auf die hier beschriebenen zellulären Strukturen näher zu untersuchen, sollte ATXN2 in Zellkulturexperimenten transient überexprimiert und dessen Effekt mikroskopisch analysiert werden. Dabei sollte zum einen ATXN2 mit 22 Glutaminen eingesetzt werden (ATXN2(Q22)). Zum anderen sollte zusätzlich eine pathogene Form von ATXN2 mit 79 Glutaminen (ATXN2(Q79)) in den Zellen zur Expression gebracht werden. Durch die Verwendung der beiden verschiedenen Formen von ATXN2 könnte ein eventueller Einfluss eines verlängerten Glutaminbereichs innerhalb von ATXN2 auf P-bodies detektiert werden, was auf einen möglichen Pathomechanismus von ATXN2 mit einem elongierten Polyglutaminbereich hinweisen könnte.

Deshalb wurden im Folgenden SH-SY5Y-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und am darauffolgenden Tag mit den Plasmiden pCMV-MYC-ATXN2-Q22 oder pCMV-MYC-ATXN2-Q79 transfiziert. Nach 24 Stunden Proteinexpression wurden die fixierten Zellen zum Nachweis der Proteine mit Antikörpern gegen den MYC-Tag und DDX6 behandelt.

Die mikroskopischen Analysen zeigten, dass die Anzahl der P-bodies in Zellen mit erhöhter ATXN2-Konzentration drastisch abnahm (Abbildung 17A; oberer Block). Dabei konnte eine Abhängigkeit in der Anzahl der P-body-Strukturen im Bezug auf den gesteigerten

ATXN2-Expressionslevel festgestellt werden. Diese Abhängigkeit wies eine negative Korrelation auf, denn eine starke Überexpression von ATXN2 führte meist zur Auflösung sämtlicher P-bodies in den Zellen, während bei einer moderaten Expression von ATXN2 noch P-body-Strukturen detektiert werden konnten. Des Weiteren war visuell jedoch kein Unterschied in der Stärke der Abnahme der P-bodies zwischen den beiden verwendeten Formen von ATXN2, ATXN2(Q22) und ATXN2(Q79), festzustellen. Somit konnte kein Einfluss eines verlängerten Polyglutaminbereichs auf die Auflösung der P-body-Strukturen festgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen kann jedoch gefolgert werden, dass die ATXN2-Konzentration einen direkten Einfluss auf einen der Hauptabbauwege der mRNA zu nehmen scheint, da in P-bodies normalerweise der 5'-3'-Degradationsweg von mRNA lokalisiert ist [90, 94]. Im Weiteren sollte nun zunächst überprüft werden, ob die Beobachtungen darauf beruhen, dass eine gesteigerte Expression von ATXN2 zu einer Rekrutierung von DDX6 aus den P-bodies führte, oder ob eine Überexpression von ATXN2 in einer generellen Auflösung von P-body-Strukturen resultierte.

Zur Klärung dieser Frage, sollte wiederum das P-body-Markerprotein DCP1 in die Untersuchung einbezogen werden. SH-SY5Y-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCMV-MYC-ATXN2-Q22 oder pCMV-MYC-ATXN2-Q79 transient transfiziert. Nach 24 Stunden, wurden die Zellen für die folgenden mikroskopischen Analysen vorbereitet, wobei die Färbung der Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen MYC und DCP1 erfolgte.

Dieses Experiment zeigte, dass in Zellen mit überexprimiertem ATXN2 weniger bzw. keine P-bodies mit DCP1 angefärbt werden konnten (Abbildung 17B). Wie in der vorangegangenen Analyse konnte in diesem Fall ebenfalls keine Abhängigkeit der Auflösung der P-bodies von der Länge der Polyglutaminregion von ATXN2 festgestellt werden. Des Weiteren wurde eine quantitative Auswertung des Einflusses einer erhöhten ATXN2-Konzentration auf die Formation der P-bodies, wie in Material und Methoden unter 2.5.1 beschrieben, vorgenommen. Der beschriebene visuelle Eindruck wurde mit Hilfe dieser

Analyse bestätigt (Abbildung 17C); es zeigte sich, dass, im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen, die Zahl der P-bodies in transfizierten Zellen auf ca. 16 % zurück ging.

Im weiteren sollte nun untersucht werden, welcher Bereich von ATXN2 für die Auflösung der P-body-Strukturen verantwortlich war. In der Diplomarbeit von F. Welzel konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen ATXN2 und DDX6 über die LSm/LSmAD-Domäne von ATXN2 vermittelt wird. Des weiteren wurden in dieser Arbeit erste Hinweise erzielt, aus denen auf eine Beteiligung dieser Domäne an der Auflösung der P-bodies in COS-1-Zellen geschlossen werden konnte.

Zur weiteren Verifizierung dieser Befunde sollten in SH-SY5Y-Zellen verschiedene ATXN2-Konstrukte zur Expression gebracht werden. Hierzu wurden zwei mit unterschiedlichen Proteintags versehene Proteine in die Analysen mit einbezogen, da Proteintags unterschiedliche Einflüsse auf das Proteinverhalten aufweisen. Ein weiterer Grund für die Wahl verschiedener Plasmide war die Möglichkeit durch die unterschiedlichen Promotoren die Stärke der Proteinexpression zu einem gewissen Grad steuern zu können. Um weiterhin auszuschließen, dass die beobachtete Auflösung der P-body-Strukturen per se ein Überexpressionsartefakt darstellte, wurde zusätzlich ein unabhängiges Protein, Endophilin-A3, ein weiterer Interaktionspartner von ATXN2 [137], der, soweit bekannt, keine Rolle im mRNA-Metabolismus von Zellen einnimmt, in die Untersuchungen mit einbezogen.

Zu diesem Zweck wurden SH-SY5Y-Zellen auf Deckgläser ausgesät und mit den Plasmiden pCMV-MYC-ATXN2-LSm/LSmAD, pTLFLAG-ATXN2-LSm/LSmAD oder pTLFLAG-Endophilin-A3 transient transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend für Immunfluoreszenz-Analysen fixiert. Darauf folgte die Färbung der Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen den MYC- bzw. FLAG-Tag und DDX6.

Dieses Experiment zeigte, dass die Überexpression von MYC-ATXN2-LSm/LSmAD in SH-SY5Y-Zellen zu einer Auflösung der P-bodies führte (Abbildung 18; obere

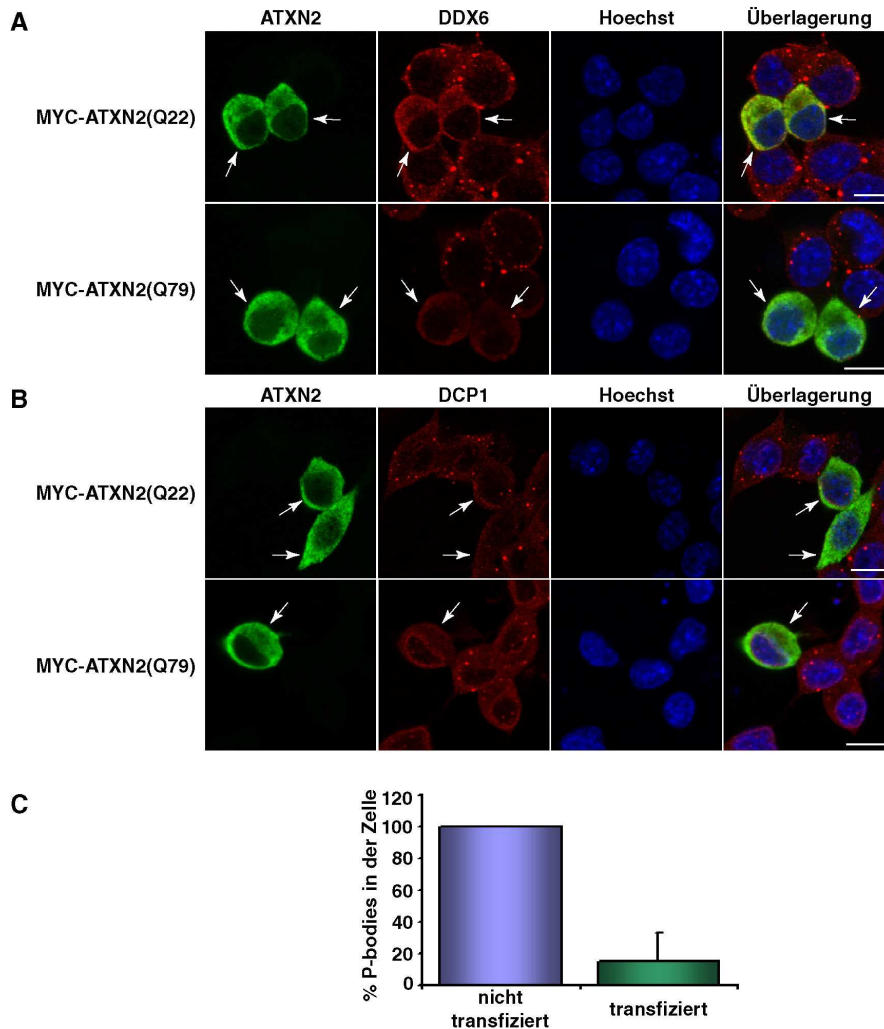


Abbildung 17: Eine Überexpression von ATXN2 beeinflusst die Bildung von P-bodies. (A/B) Immunfluoreszenz-Analyse. SH-SY5Y-Zellen wurden mit pCMV-MYC-ATXN2-Q22 oder pCMV-MYC-ATXN2-Q79 transient transfiziert und nach 24 Stunden fixiert. Zur Visualisierung der Proteine wurden die Zellen mit Antikörpern gegen MYC und DDX6 (A) oder MYC und DCP1 (B) behandelt. Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt. Balken entsprechen 10 μm . Pfeile weisen auf transfizierte Zellen hin. (C) Quantitative Analyse der P-body-Strukturen. In allen Bildern der MYC-ATXN2(Q22)-Überexpressionen wurden die DDX6 gefärbten P-bodies für transient transfizierte und nicht transfizierte Zellen gezählt und auf die Anzahl der Zellen der jeweiligen Zelltypen bezogen. Die Mittelwerte wurden anhand dieser Angaben gewichtet. Die so ermittelte durchschnittliche Zahl der P-bodies in nicht transfizierten Zellen wurde als 100 % festgelegt und die restlichen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

Zeile). Dieses Ergebnis konnte ebenfalls bei einer Überexpression von FLAG-ATXN2-LSm/LSmAD beobachtet werden. Auch hier führte die Expression des FLAG-markierten Proteinfragmentes zu einer vermehrten Auflösung der P-body-Strukturen (Abbildung 18; mittlere Zeile). Da eine Überexpression von Endophilin-A3 keine Auswirkung auf diese Strukturen hatte (Abbildung 18; untere Zeile), kann ausgeschlossen werden, dass die Auflösung der zellulären P-bodies in Gegenwart erhöhter ATXN2-Konzentrationen ein Überexpressions-Artefakt darstellte. Somit konnte ein Einfluss der LSm/LSmAD-Domäne auf die Formation der P-bodies gezeigt werden.

Dieses Ergebnis bestätigt demnach, dass eine erhöhte ATXN2-Konzentration einen großen Einfluss auf die P-body-Strukturen in Säugerzellen besitzt. Im Gegensatz dazu hatte, wie unter 3.4.2 beschrieben, eine reduzierte Konzentration von ATXN2, keine Auswirkung auf die Formation von P-bodies.

Somit könnte geschlossen werden, dass bei SCA2-Patienten und Krebsarten, die einen erhöhten ATXN2-Level im Verlauf der Krankheit zeigen, ein wichtiger mRNA-Abbauweg gestört sein könnte und dies einen Einfluss auf die beobachteten Krankheitsverläufe ausübt.

3.4.4 Untersuchungen zum Einfluss einer verringerten ATXN2-Expression auf die Formation von SGs

Im vorangegangenen Abschnitt wurde eine Beeinflussung der P-body-Strukturen durch die Überexpression von ATXN2 gezeigt. Eine Reduktion des ATXN2-Expressionslevels hingegen hatte keinen erkennbaren Einfluss auf diese zytoplasmatischen Strukturen. Jedoch ergaben diese Experimente erste Hinweise darauf, dass sich eine Verringerung der ATXN2-Konzentration auf die Formation der SG-Strukturen auswirken könnte (siehe Abschnitt 3.4.2; Abbildung 16). Dieser Hinweis sollte im Folgenden genauer untersucht werden.

Dazu wurden HEK293T-Zellen auf Deckgläser ausgesät und mit den siRNA-Molekülen

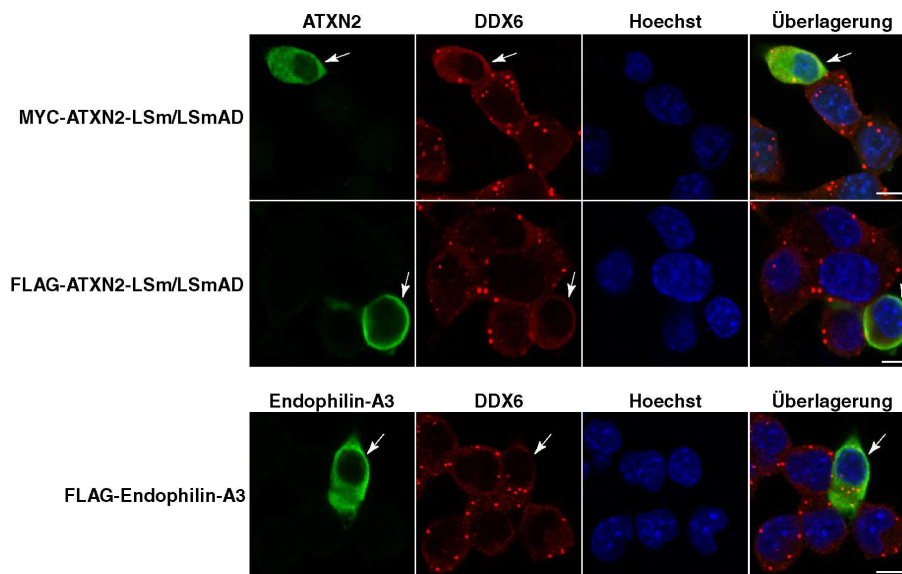


Abbildung 18: Die Überexpression der LSm/LSmAD-Domäne von ATXN2 führt zur Auflösung von P-bodies. Immunfluoreszenz-Analyse. SH-SY5Y-Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV-MYC-ATXN2-LSm/LSmAD, pTLFLAG-ATXN2-LSm/LSmAD oder pTLFLAG-Endophilin-A3 transient transfiziert. Nach 24 Stunden Proteinexpression wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen MYC oder FLAG und DDX6 gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht. Balken entsprechen 10 μm .

siATXN2#3 und siATXN2#6 transient transfiziert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Zellen mit Hiperfect behandelt oder mit dem siRNA-Molekül siKontrolle#1 transfiziert. Nach drei Tagen wurden diese Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt. Anschließend wurden endogenes ATXN2 und TIA-1 mit Hilfe spezifischer Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen markiert.

Interessanterweise zeigte sich, dass bei einer Verringerung des endogenen ATXN2-Levels, die Größe und Anzahl der SGs gegenüber den Kontroll-Zellen, die nur mit Hiperfect behandelt oder mit dem siRNA-Molekül siKontrolle#1 transient transfiziert worden waren, stark abnahm (Abbildung 19). Des Weiteren konnte ATXN2 auch unter diesen Bedingungen in jedem TIA-1-positiven SG nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis führte zu der Überlegung, dass die verbliebene ATXN2-Konzentration von ca. 30 % (vergleiche Abbildung 15) für die Bildung von SGs ausreichend war. Im nächsten Schritt

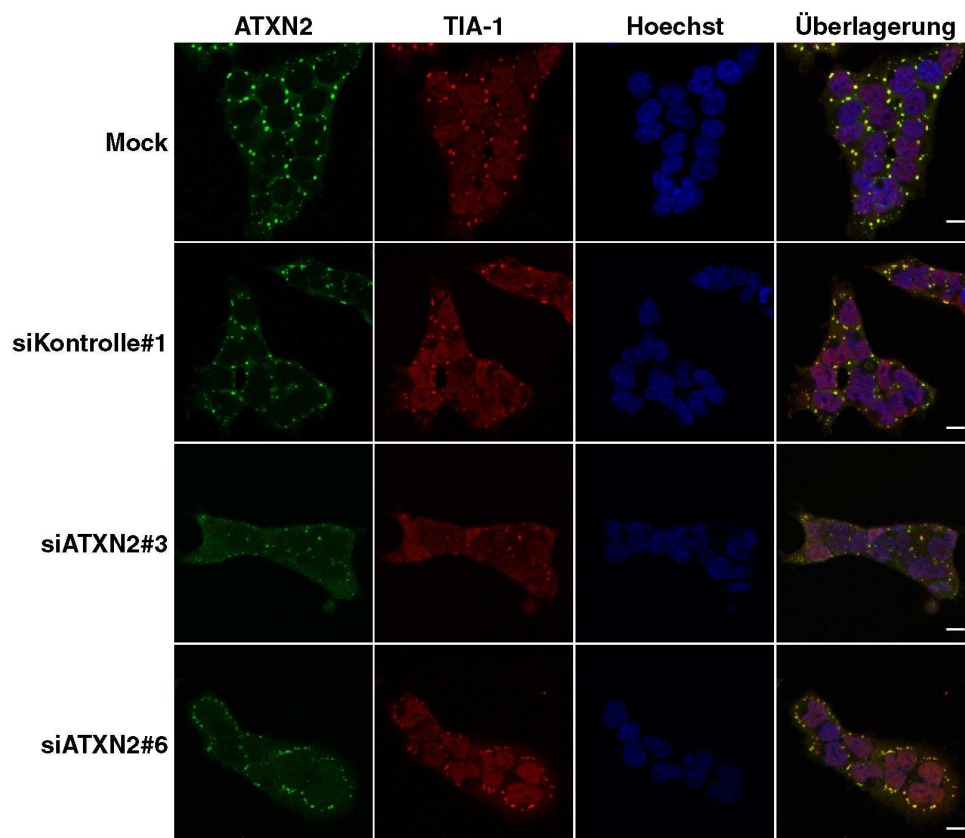


Abbildung 19: Auswirkung einer Verringerung des ATXN2-Expressionslevels auf die Formation von SGs. Immunfluoreszenz-Analyse. HEK293T-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit den siRNA-Molekülen siKontrolle#1, siATXN2#3 und siATXN2#6 transient transfiziert oder mit Hiperfect behandelt (Mock). Nach drei Tagen wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt und fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung der endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und TIA-1. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht. Balken entsprechen 10 μ m.

sollte nun analysiert werden, ob eine weitere Verringerung des ATXN2-Expressionslevels zu einer weiteren Reduktion der SG-Anzahl führen würde.

Um eine weitere Reduzierung des ATXN2 mRNA-Levels und eine daraus resultierende weitere Reduktion der ATXN2-Proteinexpression zu erreichen, sollten, in Anlehnung an das Prinzip der esiRNA, zwei der kommerziell erworbenen siRNAs als Gemisch eingesetzt werden. Hierzu wurden die Moleküle siATXN2#2 und siATXN2#3 ausgewählt, da

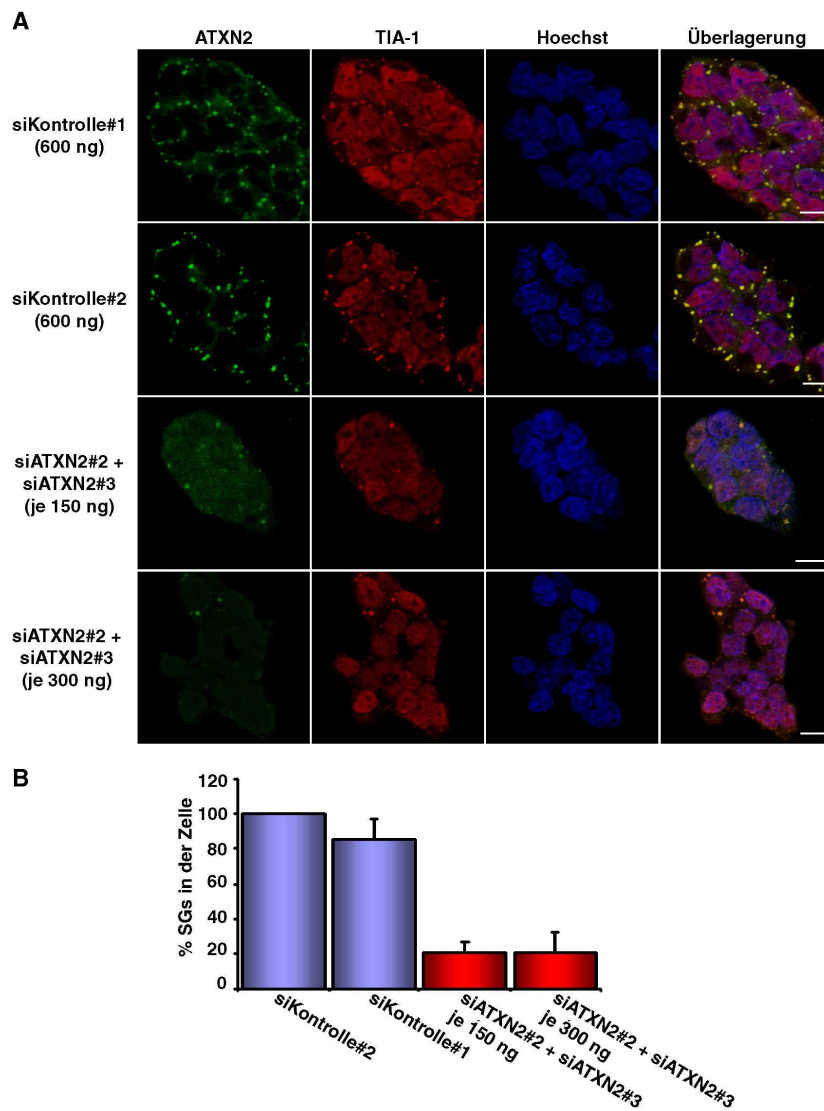


Abbildung 20: Die Reduktion der endogenen ATXN2-Konzentration bewirkt eine Abnahme der SG-Strukturen in HEK293T-Zellen unter oxidativen Stress-Bedingungen. (A) Immunfluoreszenz-Analyse. HEK293T-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit siKontrolle#1, siKontrolle#2 und einem Gemisch aus siATXN2#2 und siATXN2#3 (je 150 ng oder 300 ng) transient transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt, fixiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und TIA-1 inkubiert. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gefärbt. Balken entsprechen 10 μ m. (B) Quantitative Analyse. SGs in einem Bild wurden gezählt und auf die Anzahl der abgebildeten Zellen bezogen. Anschließend wurden die Mittelwerte sämtlicher Analysen der jeweiligen Zellen gebildet und gewichtet. Die Anzahl der SGs in Zellen, welche mit dem siRNA-Molekül siKontrolle#2 transient transfiziert worden waren, wurde als 100 % festgelegt und sämtliche Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

sie in der vorangegangenen Einzeltransfektion zu einer vergleichbaren Reduktion der ATXN2-mRNA geführt hatten (siehe Abbildung 15) sowie unterschiedliche Zielsequenzen im *SCA2*-Gen aufweisen.

HEK293T-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und mit den siRNA-Molekülen siKontrolle#1, siKontrolle#2 sowie einer Kombination aus den Molekülen siATXN2#2 und siATXN2#3 transfiziert. Dabei wurden jeweils 600 ng für die Kontroll-siRNAs sowie je 150 oder 300 ng der spezifischen siRNAs eingesetzt. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie für die vorangegangene Analyse beschrieben.

Diese Untersuchung zeigte, dass die Zahl der gebildeten SGs als auch deren Größe, bei stärkerer Reduktion der ATXN2-Konzentration, weiter abnahm (Abbildung 20A). Interessanterweise konnte ATXN2 in allen nachzuweisenden SGs detektiert werden. Um diesen mikroskopischen Befund quantitativ auszuwerten, wurden die Ergebnisse wie in Material und Methoden beschrieben (siehe 2.5.1) analysiert. Für Zellen, welche mit siKontrolle#1 transfiziert worden waren, war eine nicht signifikante Verringerung in der Anzahl der SGs zu erkennen (Abbildung 20B). Die Auswertung der SG-Anzahl im Falle der Transfektion der Zellen mit dem Gemisch aus siATXN2#2 und siATXN2#3, zeigte jedoch eine signifikante Abnahme der SGs auf ca. 16 % der zytoplasmatischen SG-Anzahl von Kontroll-Zellen.

Somit führen diese Ergebnisse zu der Annahme, dass ATXN2 eine wichtige Rolle bei der Entstehung und der Entwicklung von SGs zugesprochen werden muss.

3.4.5 Einfluss eines erhöhten ATXN2-Expressionslevels auf die Formation von SGs

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Reduktion des endogenen ATXN2-Expressionslevels zu einer Auflösung der SG-Strukturen unter oxidativen Stress-Bedingungen führt. Da eine Zunahme der ATXN2-Konzentration in Purkinje-Zellen von *SCA2*-Patienten beobachtet wurde [44], was auf einen pathogenen Einfluss einer erhöhten ATXN2-Konzentration hinweisen könnte, und in dieser Arbeit belegt werden konnte,

dass eine gesteigerte ATXN2 Expression in einer Auflösung von P-body-Strukturen resultiert (3.4.3), sollte in einem weiteren Schritt evaluiert werden, wie sich eine gesteigerte ATXN2-Konzentration auf die Bildung von SGs auswirkt.

Dazu wurden DU145-Zellen mit dem Plasmid pCMV-MYC-ATXN2-Q22 transient transfiziert und für acht Stunden zu Expression der Proteine bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde oxidativem Stress ausgesetzt. Zur Kontrolle wurden transfizierte Zellen während dieser Zeit bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin erfolgte die Färbung der Proteine für mikroskopische Aufnahmen mit Antikörpern gegen den MYC-Tag sowie TIA-1.

Interessanterweise führte, wie aus der Abbildung 21A (Kontrolle) ersichtlich, eine Überexpression von ATXN2 zu einer Dislokation von TIA-1. In ATXN2 überexprimierenden Zellen zeigte sich, dass TIA-1 nicht mehr vornehmlich im Kern lokalisiert vorlag, sondern verstärkt im Zytoplasma der Zellen detektiert wurde. Unter Stress-Bedingungen konnten in allen Zellen, die ATXN2 überexprimierten, SGs detektiert werden, die sowohl TIA-1 als auch MYC-ATXN2 enthielten (Abbildung 21A; Arsenit); es waren keine granulären Strukturen zu erkennen, die nur eines der beiden Proteine enthielten.

Um im weiteren einen Einfluss des verwendeten Proteintags auf die Dislokation von TIA-1 auszuschließen, wurden DU145-Zellen zusätzlich mit pTLHA-ATXN2-Q22 transfiziert und entsprechend behandelt. Anschließend erfolgte die Färbung der Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen den HA-Tag und TIA-1.

Dabei wurden ähnliche Ergebnisse wie mit MYC-getagtem ATXN2 erzielt. In Zellen, welche HA-ATXN2 überexprimierten, war TIA-1 wiederum vermehrt aus dem Zellkern ins Zytoplasma rekrutiert worden (Abbildung 21B; Kontrolle). Unter oxidativen Stress-Bedingungen wurden ebenfalls, sowohl in mit ATXN2 transfizierten als auch in nicht transfizierten Zellen, die Formation von SGs beobachtet (Abbildung 21B; Arsenit). Durch diese Ergebnisse konnte eine Beeinflussung des Proteinverhaltens durch einen der fusionierten Proteintags ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass eine moderate Überexpression von ATXN2

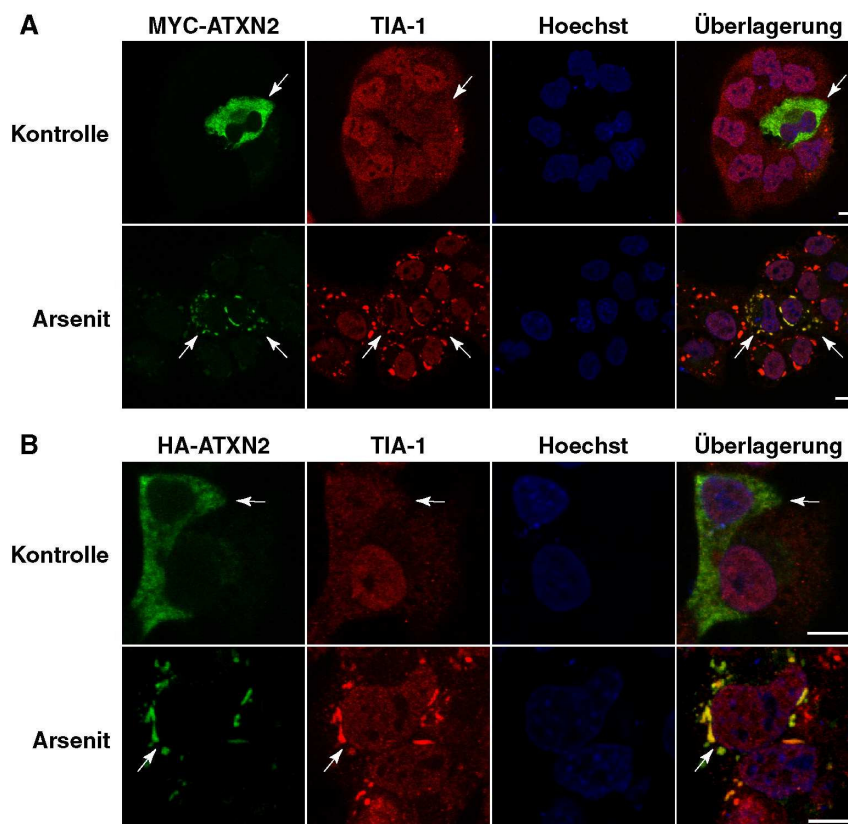


Abbildung 21: Eine moderate Überexpression von ATXN2 hat keinen Einfluss auf die Bildung von SGs. Immunfluoreszenz-Analyse. DU145-Zellen wurden mit (A) pCMV-MYC-ATXN2-Q22 oder (B) pTLHA-ATXN2-Q22 transfiziert. Nach 8 - 24 Stunden Proteinexpression wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt. Anschließend wurden die Proteine für Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit Antikörpern gegen MYC bzw. HA und TIA-1 gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht. Balken entsprechen 10 µm. Pfeile weisen auf transfizierte Zellen hin.

keinen Einfluss auf die Bildung von SGs ausübte.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte der Einfluss einer stark gesteigerten Expression von ATXN2 auf die endogene Lokalisation von TIA-1 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden DU145-Zellen wiederum mit den Plasmiden pCMV-MYC-ATXN2-Q22 oder pTLHA-ATXN2-Q22 transient transfiziert. Nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und für mikroskopische Aufnahmen mit Antikörpern gegen MYC bzw. HA

und TIA-1 behandelt, um die Proteine anzufärben.

Diese Experimente zeigten, dass bei einer gesteigerten Expression von ATXN2 wiederum eine Dislokation von TIA-1 beobachtet werden konnte. Besonders deutlich wurde diese Veränderung der Lokalisation, wenn ATXN2 keine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung zeigte, sondern in einer eher akkumulierten Lokalisation detektiert wurde (Abbildung 22; untere Zeile, Pfeile). Hier konnte TIA-1 nicht mehr im Zellkern nachgewiesen werden, sondern akkumulierte in den Bereichen, in denen das überexprimierte ATXN2 vorlag. Eine starke Überexpression führte also interessanterweise zur, teilweise vollständigen, Dislokation von TIA-1 unter normalen Wachstumsbedingungen.

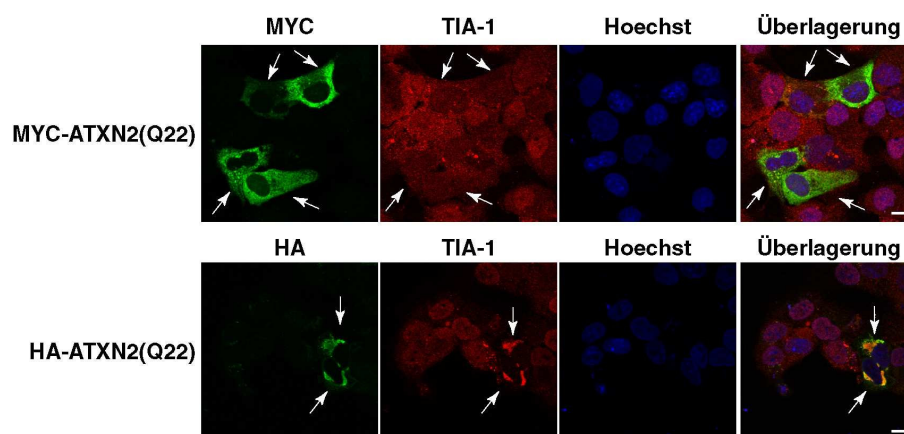


Abbildung 22: Eine starke Überexpression von ATXN2 beeinflusst die Lokalisation von endogenem TIA-1. Immunfluoreszenz-Analyse. DU145-Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV-MYC-ATXN2-Q22 und pTLHA-ATXN2-Q22 transient transfiziert. Nach 24 (MYC-Expression) bzw. 48 Stunden (HA-Expression) wurden die Proteine mit Antikörpern gegen MYC oder HA und TIA-1 gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht. Balken entsprechen 10 µm. Pfeile weisen auf transfizierte Zellen hin.

Auf Grund dieser Ergebnisse sollte in einem weiteren Schritt analysiert werden, wie sich eine starke Überexpression von ATXN2, und die darauf beruhende Dislokation von TIA-1, auf die Formation von SGs auswirkte. Zu diesem Zweck wurden DU145-Zellen erneut mit pCMV-MYC-ATXN2-Q22 transient transfiziert. Nach 24 Stunden Proteinexpression wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt und anschließend mit

spezifischen Antikörpern gegen den MYC-Tag und TIA-1 inkubiert.

Durch Immunfluoreszenz-Analysen wurde deutlich, dass eine starke Überexpression von ATXN2 unterschiedliche Konsequenzen für die Lokalisation von TIA-1 und die Formation von SGs unter oxidativen Stress-Bedingungen hatte. Ein Teil der Zellen zeigte eine zytoplasmatische Verteilung von ATXN2, ohne dass SGs zu erkennen waren (Abbildung 23; obere Zeile). In einem anderen Teil der Zellen konnten Akkumulationen von ATXN2 im Zytoplasma der Zellen beobachtet werden, in denen dann ebenfalls TIA-1 akkumuliert vorlag. In diesem Fall waren wiederum keine "klassischen" SGs, sondern ausschließlich größere Proteinakkumulationen, nachweisbar (Abbildung 23; untere Zeile).

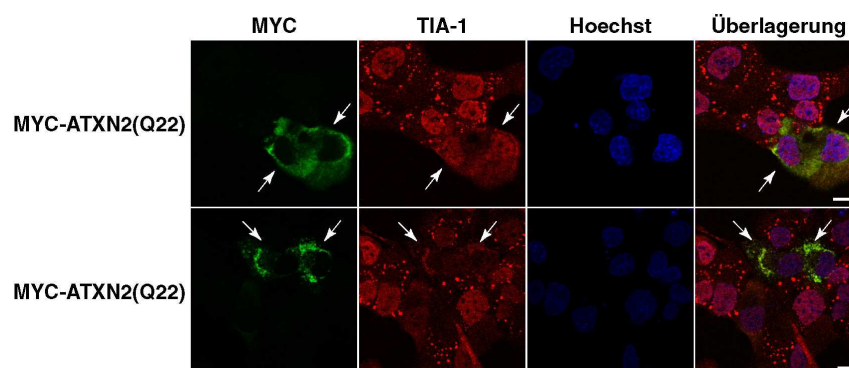


Abbildung 23: Eine starke Überexpression von ATXN2 hat einen Einfluss auf die Bildung von SGs. Immunfluoreszenz-Analyse. DU145-Zellen wurden mit pCMV-MYC-ATXN2-Q22 transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden sie für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt und anschließend mit Antikörpern gegen MYC und TIA-1 gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht. Balken entsprechen 10 µm. Pfeile weisen auf transfizierte Zellen hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl eine moderate als auch eine starke Überexpression von ATXN2 zu einer Dislokation von TIA-1 führte. Da beobachtet wurde, dass TIA-1 unter normalen Umständen ständig zwischen Zellkern und Zytoplasma wechselt, stellt sich die Frage, ob TIA-1 auch unter den gezeigten Bedingungen diese Translokation vollziehen kann [131]. Dieses müssen jedoch weitergehende Versuche zeigen. Falls diese Funktion von TIA-1 unter erhöhter ATXN2-Konzentration eingeschränkt

wäre, könnte dieses Ergebnis auf einen möglichen Pathomechanismus in SCA2 deuten.

3.4.6 Einfluss eines verringerten ATXN2-Expressionslevels auf die intrazelluläre Konzentration von PABP

In den vorherigen Analysen konnte ein Einfluss eines reduzierten ATXN2-Expressionslevels auf die Formation von SGs festgestellt werden. Im Zuge dieser Analysen wurde auch das SG-assoziierte Protein PABP untersucht, um einen eventuellen Einfluss eines reduzierten ATXN2-Expressionslevels auf die Lokalisation oder Konzentration dieses Proteins zu analysieren.

Zu diesem Zweck wurden HEK293T-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und mit den siRNA-Molekülen siKontrolle#1, esiATXN2, siATXN2#3 und siATXN2#6 transient transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen, wie beschrieben 2.3.12, für Immunfluoreszenz-Analysen vorbereitet.

Interessanterweise ergab die mikroskopische Analyse, dass die PABP Immunreaktivität in den Zellen, welche eine verminderte ATXN2-Expression aufwiesen, stark zunahm (Abbildung 24). Dieses bemerkenswerte Ergebnis sollte zusätzlich mittels Western Blots überprüft werden, um eine Zunahme der endogenen PABP-Konzentration mit einer weiteren unabhängigen Methode zu verifizieren. Erneut wurden HEK293T-Zellen mit den siRNA-Molekülen siKontrolle#1, siKontrolle#2, esiATXN2, siATXN2#2, siATXN2#3 und siATXN2#6 transient transfiziert oder nur mit Hiperfekt behandelt. Nach drei Tagen wurden die Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben, lysiert und je 20 μg der entsprechenden Lysate auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der immunologische Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2, PABP und TIA-1. TIA-1 wurde als Ladekontrolle gewählt, da in vorangegangenen Untersuchungen keine Veränderung des TIA-1-Expressionslevels bei Reduktion der ATXN2-Konzentration festgestellt wurde (vergleiche Abbildung 19).

Diese Immunoblot-Analyse ergab, dass die ATXN2-Konzentration, wie zu erwarten, in

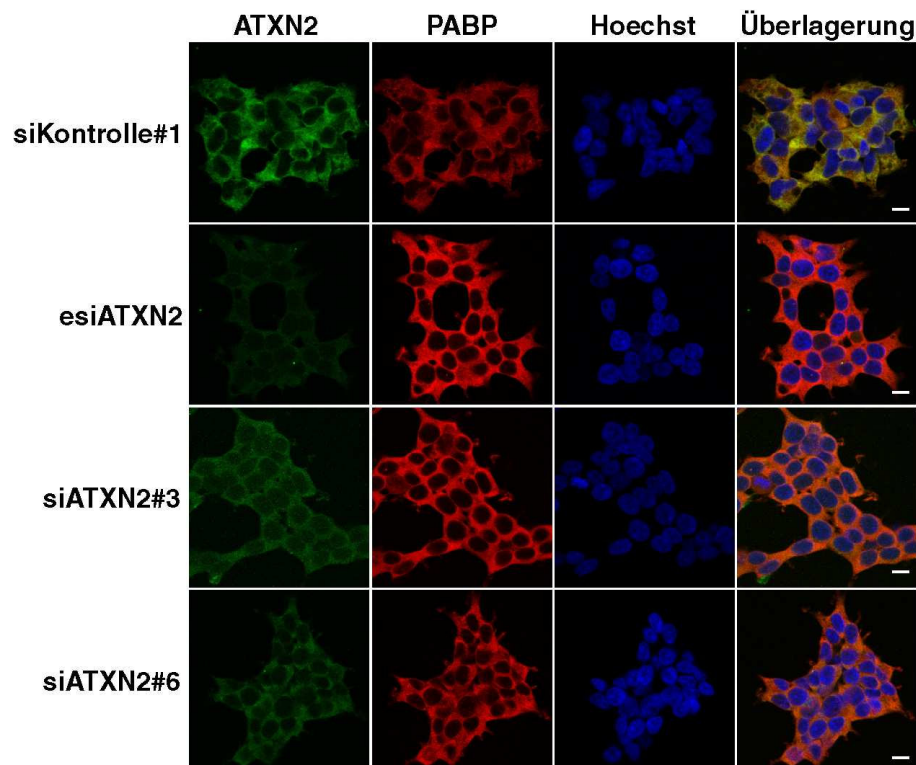


Abbildung 24: Reduktion des endogenen ATXN2-Levels führt zur Zunahme der PABP Immunreaktivität. Immunfluoreszenz-Analyse. HEK293T-Zellen wurden transient mit den siRNA-Molekülen siKontrolle#1, esiATXN2, siATXN2#3 und siATXN2#6 transient transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen ATXN2 und PABP behandelt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gefärbt. Die Balken entsprechen 10 μm .

den Zellen, welche mit den spezifischen siRNAs transfiziert worden waren, gegenüber den Kontroll-Zellen deutlich herabgesetzt war (Abbildung 25A). Im Gegensatz dazu war eine deutliche Zunahme der PABP-Konzentration in den transfizierten Zellen gegenüber den Kontroll-Zellen zu erkennen. Die TIA-1-Immunreaktivität der einzelnen Proben wies eine gleichmäßige Intensität auf, was auf eine gleichmäßige Proteinkonzentration der jeweiligen aufgetragenen Proteinproben hinweist, und ausschließen läßt, dass der Anstieg der endogenen PABP-Konzentration auf eine unterschiedliche Proteinkonzentration der einzelnen Lysate zurückzuführen war.

Im weiteren sollte nun die Frage geklärt werden, ob die Zunahme der PABP-

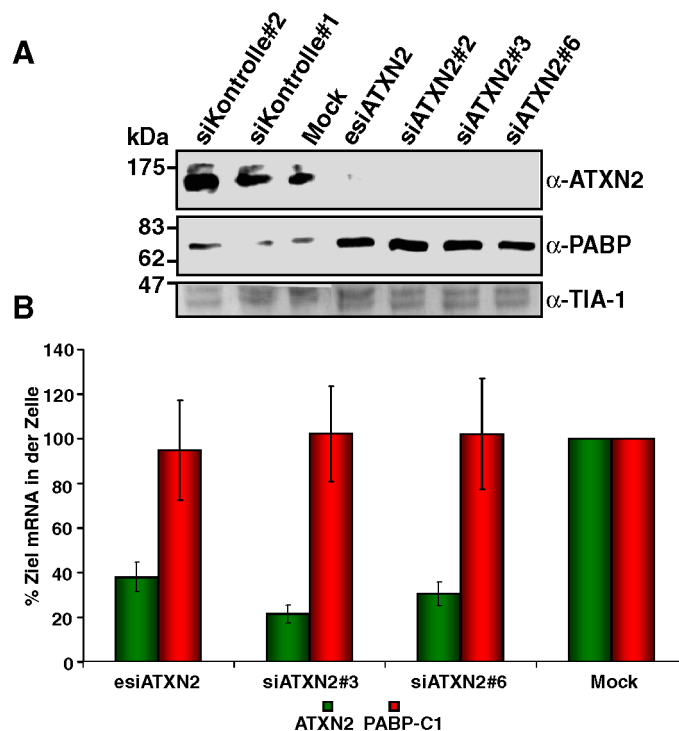


Abbildung 25: Zunahme der PABP-Konzentration bei Reduktion des endogenen ATXN2 findet auf Protein-, nicht auf transkriptioneller Ebene statt. (A) Immunoblot. HEK293T-Zellen wurden transient mit den siRNA-Molekülen siKontrolle#1, siKontrolle#2, esiATXN2, siATXN2#2, siATXN2#3 und siATXN2#6 transient transfiziert oder mit Hiperfect (Mock) inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen lysiert und jeweils 20 μ g Proteinlysate auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der anschließende Immunoblot wurde gegen ATXN2, PABP und TIA-1 entwickelt. Die Bilder der gescannten Blots wurden für eine bessere Darstellung zerschnitten und wieder zusammengesetzt. (B) Quantitative "real time" RT-PCR Analyse. HEK293T-Zellen wurden mit Hiperfect behandelt (Mock) oder transient mit esiATXN2, siATXN2#3 und siATXN2#6 transfiziert. Isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben, welche für eine quantitative "real time" RT-PCR unter Verwendung von TaqMan Proben gegen ATXN2 und PABP eingesetzt wurde. Die Ergebnisse der quantitativen "real time" RT-PCR der Kontrollzellen (Mock) wurden als 100 % definiert und die relativen Expressionslevel der transient mit ATXN2 siRNAs transfizierten Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. Der "cdNA-Input" der verschiedenen Proben wurde anhand von "real time" Daten für Beta Aktin (ACTB) normalisiert. Die angegebenen RNA-Level sind repräsentativ aus fünf unabhängigen Experimenten gewonnen worden. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Konzentration auf Proteinebene oder auf transkriptioneller Ebene auftritt.

Wiederum wurden HEK293T Zellen wie für die vorangegangenen Immunfluoreszenz-Analysen mit spezifischen siRNA-Molekülen transient transfiziert oder mit Hiperfect

(Mock) behandelt. Nach drei Tagen wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend für eine quantitative "real time" RT-PCR eingesetzt. Wie aus Abbildung 25B ersichtlich, war insgesamt keine signifikante Veränderung des PABP mRNA-Levels in Zellen mit reduzierter ATXN2-Transkription gegenüber Kontrollzellen (Mock) zu beobachten. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine Regulation der PABP-Konzentration nicht auf transkriptioneller Ebene stattfindet, sondern der erhöhte PABP-Level aus einer gesteigerten Translation der vorhandenen mRNA, oder einer Stabilisierung von PABP auf Proteinebene resultieren muss. Zudem zeigen diese Resultate, dass ATXN2 neben seiner Rolle in der Formation von SGs zusätzlich funktionell an der Regulation der PABP-Konzentration beteiligt ist.

3.4.7 Einfluss eines erhöhten ATXN2-Levels auf PABP

Auf Grund des vorherigen Resultats sollte im weiteren untersucht werden, ob auch eine erhöhte ATXN2-Konzentration einen Einfluss auf die intrazelluläre PABP-Konzentration ausübt. Dabei sollte zum einen ATXN2 mit 22 Glutaminen (ATXN2(Q22)) in den Zellen zur Expression gebracht werden. Zum anderen sollte zusätzlich eine pathogene Form mit einem Polyglutaminbereich von 79 Glutaminen (ATXN2(Q79)) eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden HEK293T-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und mit den Plasmiden pTLHA-ATXN2-Q22 oder pTLHA-ATXN2-Q79 transient transfiziert. Nach 48 Stunden Proteinexpression wurden die Zellen fixiert und zur Färbung der Proteine für Immunfluoreszenz-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen den HA-Tag und PABP inkubiert.

Es zeigte sich, dass die Überexpression von ATXN2 zu einer stark verminderten PABP-Expression führte, da transfizierte Zellen eine deutliche Reduktion der PABP-Immunreaktivität aufwiesen (Abbildung 26A). Dabei war kein Unterschied zwischen den Zellen, welche 22 oder 79 Glutamine im Polyglutaminbereich des Proteins exprimierten, auszumachen. Um im weiteren auszuschließen, dass eine Abhängigkeit dieses Ergebnisses von dem an die Proteine fusionierten Proteintag bestand, wurden HEK293T-

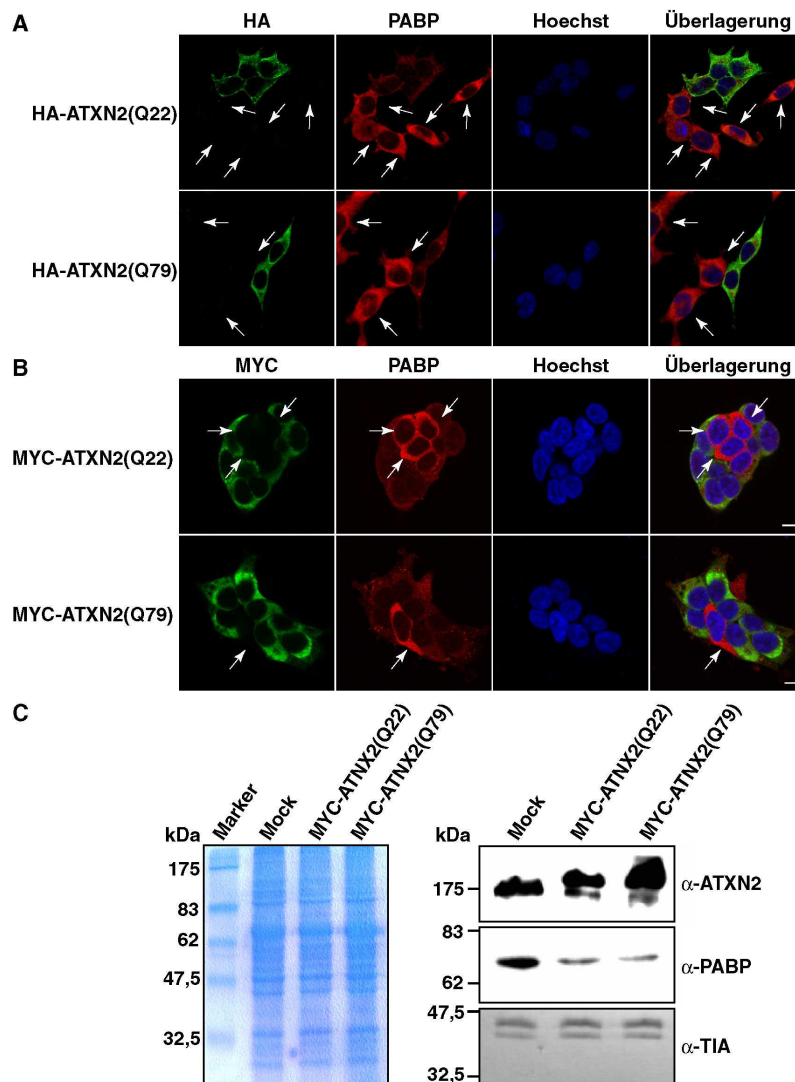


Abbildung 26: Überexpression von ATXN2 beeinflusst den endogenen PABP-Level. (A/B) Immunfluoreszenz. HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pTLHA-ATXN2-Q22, pTLHA-ATXN2-Q79, pCMV-MYC-ATXN2-Q22 oder pCMV-MYC-ATXN2-Q79 transient transfiziert. Nach 48 (HA-Expression, A), beziehungsweise 24 Stunden (MYC-Expression, B) wurden die Zellen fixiert und die Proteine mit Antikörpern gegen den HA- bzw. MYC-Tag und endogenes PABP gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht, Balken entsprechen 10 μ m. Pfeile in den Bildern weisen auf nicht transfizierte Zellen hin. (C) SDS-Gel und Immunoblot. HEK293T-Zellen wurden transient mit MYC-ATXN2(Q22) oder MYC-ATXN2(Q79) transfiziert, Kontrollzellen (Mock) wurden nur mit Polyfect behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und gleiche Mengen Proteinlysate auf SDS-Gele aufgetragen. Gele wurden entweder für einen Konzentrationsabgleich mit Coomassie gefärbt (linke Seite) oder für einen Immunoblot verwendet (rechte Seite). Blots wurden immunologisch gegen ATXN2, PABP oder TIA-1 entwickelt.

Zellen in einer weiteren Untersuchung mit den Plasmiden pCMV-MYC-ATXN2-Q22 oder pCMV-MYC-ATXN2-Q79 transient transfiziert. Nach 24 Stunden, wurden die Zellen für die nachfolgende Immunfluoreszenz-Analyse, wie in Material und Methoden unter 2.5 beschrieben, behandelt. Auch hier zeigte es sich, dass die Überexpression eines MYC-ATXN2-Fusionsproteins zu einer Reduktion der endogenen PABP Immunreaktivität führte (Abbildung 26B). Zudem war hier ebenfalls visuell kein Unterschied in der Stärke der Reduktion der endogenen PABP-Konzentration bei Überexpression der beiden MYC-ATXN2-Proteine zu erkennen.

Des Weiteren konnte dieses Ergebnis nachfolgend mit Hilfe eines Immunoblots verifiziert werden, da die Abnahme der endogenen PABP-Konzentration bei transients Überexpression des MYC-ATXN2-Fusionsproteins im Immunoblot dargestellt werden konnte (Abbildung 26C). Dabei wurde kein Unterschied zwischen der Wildtyp- und der Pathogenen-Form von ATXN2 festgestellt. In beiden Fällen war, wie auch in den vorangegangenen Immunfluoreszenz-Analysen (Abbildung 26A und B), eine gleichmäßige Reduktion der PABP-Immunreaktivität zu beobachten. Durch den immunologischen Nachweis von TIA-1 konnte ausgeschlossen werden, dass zwischen den einzelnen aufgetragenen Lysaten ein Konzentrationsunterschied bestand, da die TIA-1-Proteinbanden eine gleichmäßige Stärke aufwiesen. Die Gleichmäßigkeit des Probenauftrages konnte zusätzlich durch die Färbung der Proteinbanden im Coomassiegefärbten SDS-Gel belegt werden. Somit war die deutliche Abnahme des endogenen PABP-Levels nicht auf Konzentrationsunterschiede der einzelnen Lysate zurückzuführen.

Aus diesen Ergebnissen könnte man schliessen, dass eine Veränderung der endogenen ATXN2-Konzentration in der Zelle über die Regulation der PABP-Expression Einfluss auf die Translation in der Zelle nehmen kann und ATXN2 somit einen Dosis-abhängigen Regulator von PABP darstellt.

3.5 Funktionelles Zusammenspiel von ATXN2 und T- bzw. L-Plastin

Neben einer funktionellen Rolle von ATXN2 im zellulären RNA-Metabolismus konnte in weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe die Beobachtung gemacht werden, dass ATXN2 auch an endozytotischen Prozessen beteiligt ist. Ein Toxizitätsscreen zeigte, dass die Überexpression von normalem und pathogenem ATXN2 in einem Hefe-Stamm, der defizient für das *SAC6*-Gen war, zu Wachstumsdefekten führte. Dieses Gen kodiert für Fimbrin in der Hefe, welches das funktionelle Ortholog der humanen Proteine L- und T-Plastin darstellt. Beide Plastin-Isoformen sind als Aktin-Bündelproteine bekannt, und nehmen Einfluss auf die Aktin-Filament-Formation [148, 149]. Bemerkenswerterweise, führte eine Expression von humanem L- oder T-Plastin zu einer Reduktion des toxischen Effektes des transformierten ATXN2 in der $\Delta sac6$ -Hefe [69].

Zudem ergaben Proteom-basierte Untersuchungen, dass T-Plastin und PABP, wie ihre korrespondierenden Homologe der Hefe, in großen Proteinkomplexen lokalisieren, in denen größtenteils Proteine involviert sind, die an der Prozessierung von mRNA beteiligt sind [150, 151].

3.5.1 Untersuchungen zur Assoziation von ATXN2 und L- bzw. T-Plastin

Um zu untersuchen, ob die im vorigen Abschnitt erwähnten Befunde auf eine direkte Assoziation von ATXN2 und T- bzw. L-Plastin schließen lassen, sollten in einem ersten Schritt die zellulären Lokalisationen der Plastine untersucht werden. Dafür wurden HEK293T- und SH-SY5Y Zellen auf Deckgläsern ausgesät und am folgenden Tag mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und T-Plastin, bzw. ATXN2 und L-Plastin inkubiert.

Die mikroskopischen Analysen zeigten, dass T- und L-Plastin, wie auch ATXN2, eine zytoplasmatische Verteilung aufwiesen (Abbildung 27A). Dabei war kein Unterschied in der Lokalisation der Proteine zwischen den verwendeten Zelllinien zu erkennen. Auf Grund der zytoplasmatischen Lokalisation beider Proteine sollte folgend unter-

sucht werden, ob eine Assoziation von T- und L-Plastin mit ATXN2 stattfindet. In diesem Versuchsansatz sollten sowohl die normale als auch die pathogene Form von ATXN2 überexprimiert werden, um ebenfalls einen eventuellen Einfluss eines verlängerten Polyglutaminbereiches auf eine potentielle Assoziation nachweisen zu können.

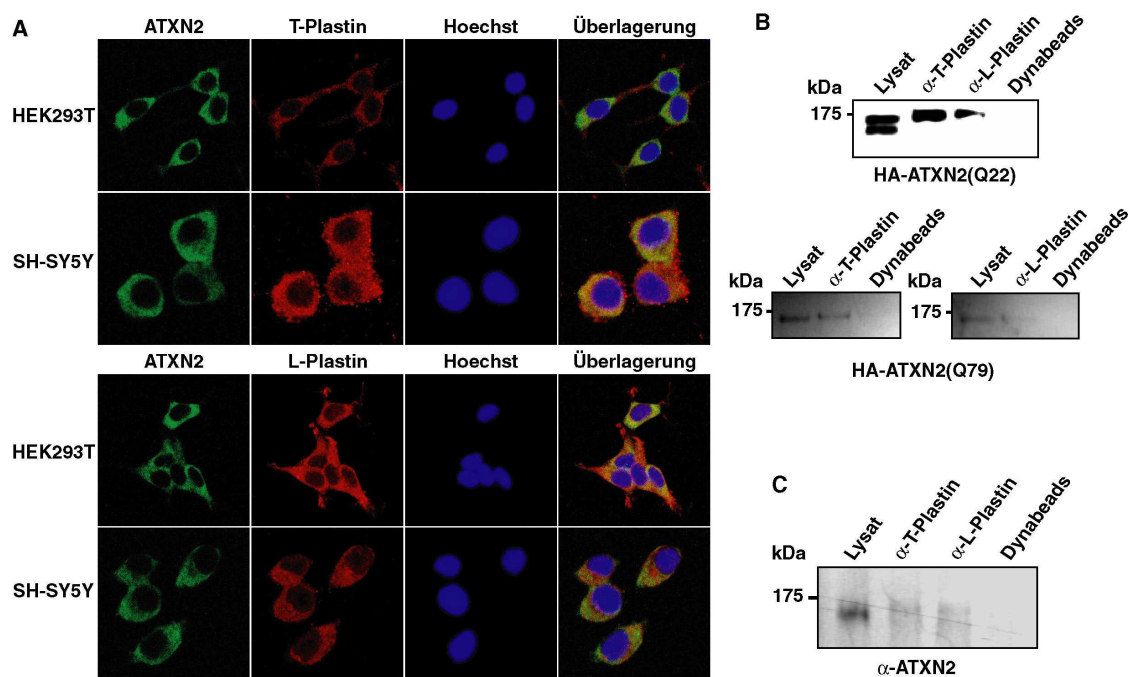


Abbildung 27: ATXN2 interagiert mit L- und T-Plastin. (A) Immunfluoreszenz-Analyse. HEK293T- und SH-SY5Y-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am darauf folgenden Tag mit Antikörpern gegen ATXN2 und T- bzw. L-Plastin gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht. (B) Koimmunpräzipitation aus Zelllysat. Je 100 μ g Proteinlysat von HEK293T-Zellen, welche entweder mit pTLHA-ATXN2-Q22 oder pTLHA-ATXN2-Q79 transient transfiziert worden waren, wurde mit je 1 μ l eines T- bzw. L-Plastin-spezifischen Antikörpers inkubiert. Um unspezifische Bindungen von ATXN2 oder T- bzw. L-Plastin an die Antikörper gekoppelten Dynabeads auszuschließen, wurde Lysat ohne Zugabe des ersten Antikörpers ebenso behandelt wie die eigentliche Probe (Dynabeads). Präzipitiertes ATXN2 wurde mit Hilfe eines Immunoblots visualisiert. Die transiente Expression von HA-ATXN2(Q22) bzw. HA-ATXN2(Q79) in HEK293T-Zellen wurde durch Auftrag von 20 μ g Zelllysat dargestellt. (C) Koimmunpräzipitation aus Maushirnlysat. 1 mg Lysat eines Mausgehirns wurde mit Antikörpern gegen T- bzw. L-Plastin versetzt. Anschließend wurden die Präzipitate mittels SDS-PAGE getrennt und per Immunoblot gegen ATXN2 analysiert. Die endogene ATXN2-Expression wurde durch den Auftrag von 100 μ g Lysat auf das SDS-Gel nachgewiesen.

Dazu wurden HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pTLHA-ATXN2-Q22 und pTLHA-

ATXN2-Q79 transient transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die jeweiligen Proteinlysate anschließend für Koimmunpräzitationen, wie unter 2.3.8 beschrieben, eingesetzt. Um auszuschließen, dass überexprimiertes ATNX2, L- oder T-Plastin mit den Antikörper-gekoppelten Dynabeads unspezifisch assoziieren, wurde jeweils eine Probe als Kontrolle nur mit Dynabeads inkubiert. Die Proteinpräzitate wurden durch Aufkochen von den Beads abgespalten, in einem SDS-Gel getrennt und anschließend mit Hilfe eines Immunoblots nachgewiesen. Anhand der Abbildung 27B wird ersichtlich, dass der Nachweis einer spezifischen Interaktion von HA-ATXN2(Q22) mit T- als auch mit L-Plastin gelang, da T- bzw. L-Plastin spezifisch präzipitiert worden waren. Des weiteren konnte eine Assoziation von T- bzw. L-Plastin mit HA-ATXN2(Q79) spezifisch dargestellt werden. Dabei konnte keine Abhängigkeit der Interaktion zwischen ATXN2 und den beiden Isoformen von Plastin vom Polyglutaminbereich beobachtet werden.

Im weitem sollte nun überprüft werden, ob die Assoziation von ATXN2 mit T- bzw. L-Plastin auch auf endogener Basis erfolgen. Zu diesem Zweck wurde Maus-Gehirnlysate, wie in Material und Methoden beschrieben (2.3.6), hergestellt und für eine Koimmunpräzitation (2.3.8) eingesetzt. Dabei wurde jeweils ein spezifischer Antikörper gegen T- bzw. L-Plastin verwendet. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proben und der Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte der immunologische Nachweis von ATXN2 auf der Membran.

Wie in Abbildung 27C gezeigt, konnte endogenes ATXN2 aus Mausgehirn mit spezifischen Antikörpern gegen T-Plastin und L-Plastin präzipitiert werden. Somit konnte die Interaktion zwischen ATXN2 und T-Plastin als auch ATNX2 und L-Plastin zusätzlich mit den endogenen Proteinen aus Mausgehirnlysate verifiziert werden. Auch in diesem Fall konnte kein präzipitiertes ATXN2 in der Kontrolle (Dynabeads) nachgewiesen werden. Somit konnte die Interaktion zwischen ATXN2 und T- bzw. L-Plastin als spezifisch angesehen werden.

3.5.2 Einfluss eines verringerten ATXN2-Expressionslevels auf L- und T-Plastin

Im nächsten Schritt wurde nun untersucht, ob ein reduzierter ATXN2-Expressionslevel einen Einfluss auf die Lokalisation oder Konzentration der Plastine besitzt. Zu diesem Zweck wurden HEK293T-Zellen mit den siRNA-Molekülen siKontrolle#1 oder siKontrolle#2 und siATXN2#3 transient transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert und die endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und L-Plastin bzw. T-Plastin gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht.

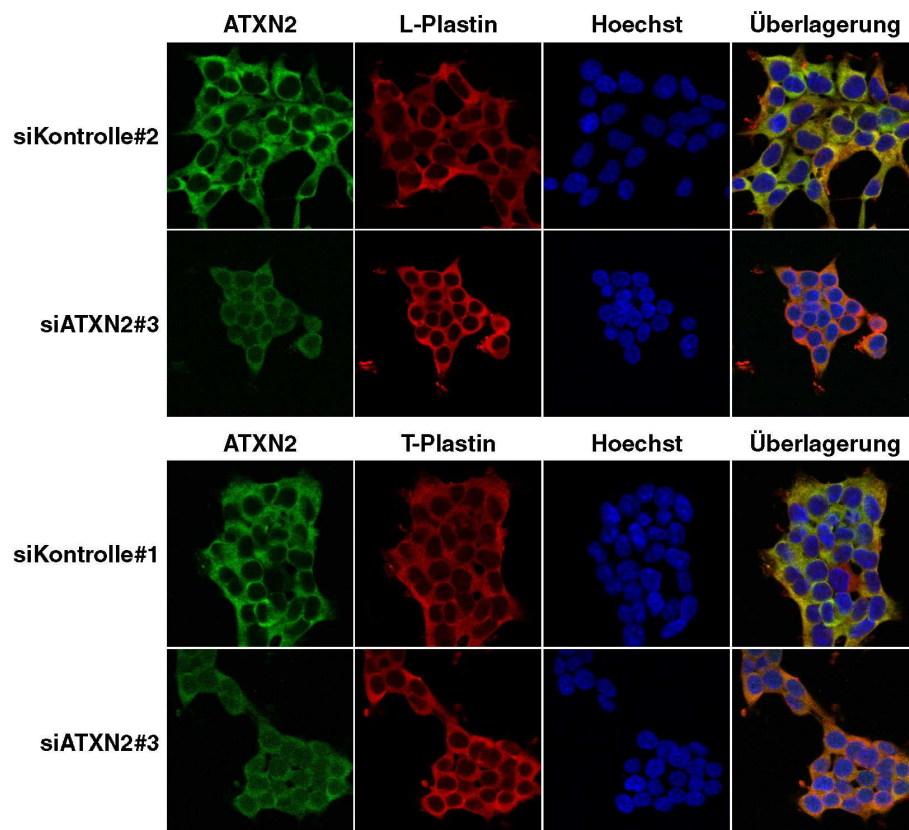


Abbildung 28: Eine Reduktion des ATXN2-Levels hat keinen Einfluss auf die endogene Konzentration von L- oder T-Plastin. Immunfluoreszenz-Analyse. HEK293T-Zellen wurden mit siKontrolle#2 und siATXN2#3, bzw. siKontrolle#1 und siATXN2#3 transient transfiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2 und L- bzw. T-Plastin gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht.

Anhand der Abbildung 28A wird deutlich, dass die Konzentration von L-Plastin sowohl in Kontroll-Zellen, als auch in Zellen mit verringertem ATXN2-Expressionslevel, vergleichbar waren. Somit hatte, unter den hier gewählten Versuchsbedingungen, eine Verringerung des endogenen ATXN2-Levels keinen Einfluss auf Konzentration oder Lokalisation von L-Plastin.

Zudem zeigte sich auch eine vergleichbare Immunreaktivität von T-Plastin in Kontroll-Zellen und Zellen mit einem reduzierten ATXN2-Level. Somit hatte eine verringerte ATXN2-Konzentration keinen erkennbaren Einfluss auf die endogene Expression oder Lokalisation von T-Plastin (Abbildung 28B).

3.5.3 Einfluss eines erhöhten ATXN2-Levels auf die endogene L- und T-Plastin-Konzentration

Da in vorangegangenen Untersuchungen ein Einfluss einer erhöhten Konzentration von ATXN2 auf den Expressionslevel von PABP festgestellt wurde (3.4.7), sollte in weiteren Analysen überprüft werden, ob eine Erhöhung der ATXN2-Konzentration Auswirkungen auf die Lokalisation oder die endogene Konzentration der Plastine hatte.

Zu diesem Zweck wurden wiederum HEK293T-Zellen mit zwei verschiedenen ATXN2-Konstrukten, HA-ATXN2(Q22) und HA-ATXN2(Q79), transient transfiziert. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert.

Diese Immunfluoreszenzanalysen verdeutlichen, dass in Zellen mit erhöhter ATXN2-Konzentration visuell keine Veränderung der L-Plastin-Immunreaktivität festgestellt werden konnte (Abbildung 29A; linker Block). Weder die Expression des wiltp-Proteins noch des ATXN2-Proteins mit einem verlängerten Polyglutaminbereich beeinflusste die Konzentration oder Lokalisation von L-Plastin. Hingegen konnte eine starke Erhöhung der T-Plastin-Immunreaktivität in Zellen mit erhöhter ATXN2-Konzentration detektiert werden (Abbildung 29A; rechter Block). Dieser Effekt war sowohl für eine Überexpression

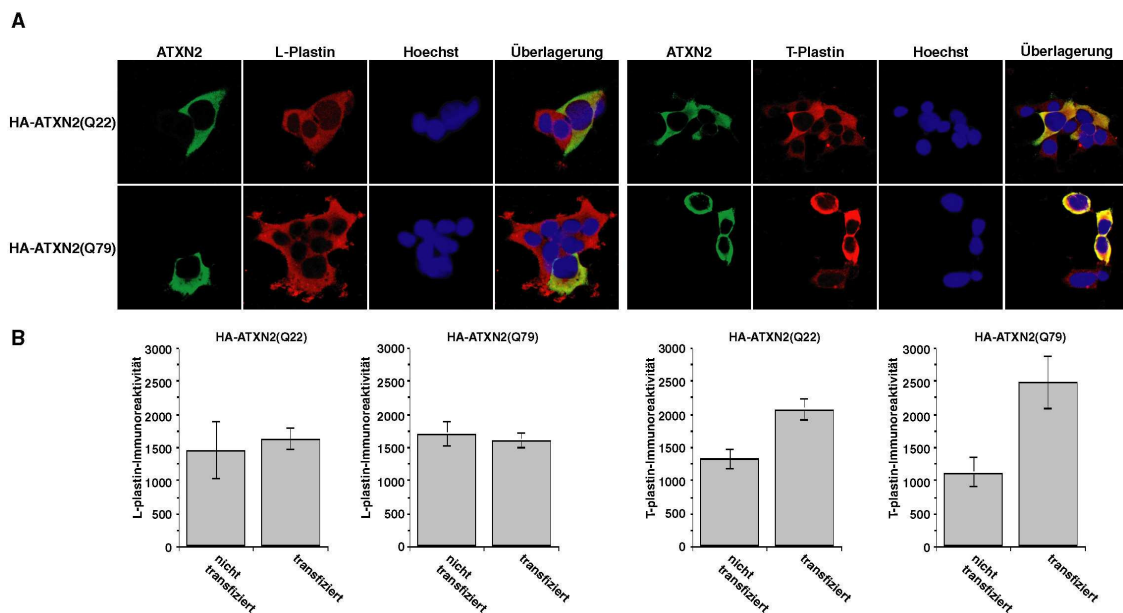


Abbildung 29: Eine Überexpression von ATXN2 führt spezifisch zur Zunahme der endogenen T-Plastin Immunreaktivität in HEK293T-Zellen. Immunfluoreszenz-Analyse. (A) HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pTLHA-ATXN2-Q22 und pTLHA-ATXN2-Q79 transient transfiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen den HA-Tag und L- bzw. T-Plastin gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht. (B) Quantitative Analyse der T- und L-Plastin-Immunreaktivität von mit ATXN2 transfizierten und nicht transfizierten COS-1-Zellen. Es wurden jeweils mindestens 10 Regionen von sowohl transfizierten als auch nicht transfizierten Zellen festgelegt und mit Hilfe der Axiovision Software im Bezug auf die Cy3 (Plastin) Immunreaktivität analysiert. Aus diesen Daten wurden die Mittelwerte gebildet und mit Hilfe der festgelegten Flächen für die Standardabweichung gewichtet. Fehlerbalken geben die gewichtete Standardabweichung an.

von ATXN2 mit 22 Glutaminen, als auch für ATXN2 mit einem verlängerten Polyglutaminbereich zu beobachten. Im Gegensatz zur endogenen L-Plastin-Konzentration unterliegt der endogene T-Plastin-Level demnach einer starken Beeinflussung durch einen erhöhten ATXN2-Expressionslevel. Dies ist insofern interessant, da gezeigt werden konnte, dass beide Proteine mit ATXN2 assoziieren (siehe 3.5.1).

Um diese mikroskopische Analyse zu untermauern, sollte im Folgenden der Anstieg der endogenen Immunreaktivität von T-Plastin bei Überexpression von ATXN2 zusätzlich quantitativ analysiert werden. Da sich HEK293T-Zellen auf Grund der relativ kleinen Größe ihres Zytoplasmas jedoch nur bedingt für solche Analysen eignen, wurden für die

quantitativen Analysen COS-1-Zellen eingesetzt. COS-1-Zellen wurden, wie im oberen Abschnitt beschrieben, behandelt und die relativen Immunreaktivitäten von L- und T-Plastin wurden, wie in Material und Methoden beschrieben (siehe 2.5.2), analysiert und verglichen. Wie schon visuell beobachtet werden konnte (vergleiche Abbildung 29A), wurde auch mit Hilfe der Quantifizierung der Immunreaktivität von L-Plastin in transfizierten und nicht transfizierten Zellen deutlich, dass in diesem Fall kein Anstieg der endogenen Proteinkonzentration vorlag, da die L-Plastin-Immunreaktivität im Falle von transfizierten und nicht transfizierten Zellen vergleichbare Werte zeigte.

Mit Hilfe dieser Auswertung konnte belegt werden, dass im Falle einer Transfektion der Zellen mit ATXN2(Q22) ein Anstieg der Immunreaktivität, und somit eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von T-Plastin auf das ca. 1,6-fache verzeichnet werden konnte (Abbildung 29B). Im Falle von ATXN2(Q79) lag der Anstieg der T-Plastin Immunreaktivität transfizierter Zellen um den Faktor 2,3 höher als der nicht transfizierter Zellen. Dieser Unterschied zwischen den beiden ATXN2-Proteinformen war zwar nicht signifikant; könnte jedoch trotzdem als Hinweis auf einen Pathomechanismus gedeutet werden.

Im weiteren sollte dieses Ergebnis zusätzlich in einer Neuroblastoma-Zelllinie überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden SH-SY5Y-Zellen ebenso behandelt wie im Vorangegangenen HEK293T- und COS-1-Zellen, und anschließend mikroskopisch analysiert. Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass in transient transfizierten Zellen, die T-Plastin-Immunreaktivität gegenüber nicht transfizierten Zellen, stark anstieg (Abbildung 30). Die endogene Proteinexpression von L-Plastin blieb trotz gesteigerter ATXN2-Konzentration auch in dieser Zelllinie unbeeinflusst. Somit konnte das bisherige Ergebnis zusätzlich in einer Neuroblastoma-Zelllinie bestätigt werden. Diese Ergebnisse führen zur Annahme, dass eine selektive Zunahme der endogenen T-Plastin-Konzentration, einen möglichen Pathomechanismus in SCA2 darstellen könnte.

Im nächsten Schritt sollte näher charakterisiert werden, ob eine bestimmte Region von

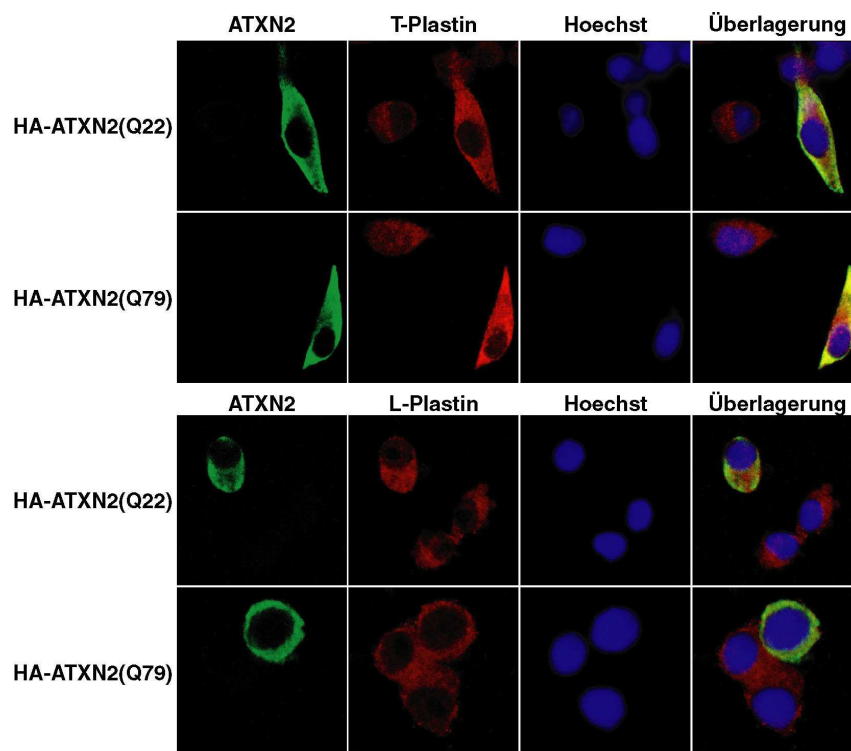


Abbildung 30: Überexpression von ATXN2 beeinflusst den endogenen T-Plastin-Level in SH-SY5Y-Zellen. Immunfluoreszenz-Analyse. SH-SY5Y-Zellen wurden auf Deckgläsern mit HA-ATXN2(Q22) bzw. HA-ATXN2(Q79) transient transfiziert. Nach zwei Tagen Proteinexpression wurden die Zellen fixiert und für Immunfluoreszenz-Analysen mit Antikörpern gegen den HA-Tag und T- (oberer Block) bzw. L-Plastin (unterer Block) behandelt. Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt.

ATXN2 für den Anstieg der endogenen T-Plastin-Konzentration verantwortlich war. Dafür wurden COS-1-Zellen mit verschiedenen Plasmiden zur Expression von ATXN2-Fragmenten (siehe Abbildung 31) transient transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen für die anschließenden Immunfluoreszenz-Analysen aufgearbeitet.

Diese Untersuchungen ergaben erneut, dass Zellen, welche ATXN2 exprimierten, einen Anstieg der endogenen T-Plastin-Immunreaktivität zeigten. Wurden die N-terminalen Bereiche von ATXN2 mit 22 oder 79 Glutaminen zur Expression gebracht, war keine Zunahme der T-Plastin-Immunreaktivität zu verzeichnen. Demnach hatte der N-terminale

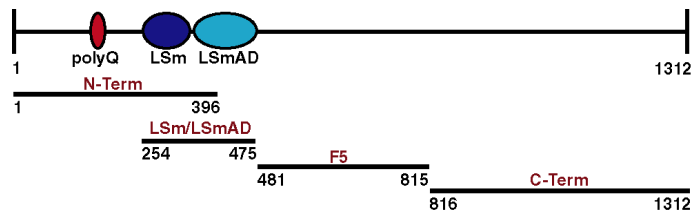


Abbildung 31: Schematische Darstellung der für Zellkulturexperimente verwendeten ATXN2 Fragmente. Die Ellipsen representieren die poly-Q-Region (dunkelrot), die LSm- (dunkelblau) und die LSmAD-Domäne (hellblau). Zahlen geben Aminosäurepositionen an, Balken unterhalb der Proteindarstellung geben die für Zellkulturexperimente verwendeten ATXN2-Fragmente an. Über den Balken in rot sind die Namen der Fragmente angegeben.

Bereich von ATXN2 keinen Einfluss auf die Veränderung der endogenen T-Plastin-Konzentration. Dieses Ergebnis schließt an die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen an, in denen gezeigt wurde, dass die Erhöhung der T-Plastin-Konzentration unabhängig vom Polyglutamingehalt von ATXN2 war. Auch in Zellen die zwei C-terminale Fragmente, ATXN2-CTerm und ATXN2-F5, exprimierten (siehe Abbildung 31), konnte keine Steigerung der T-Plastin-Immunreaktivität detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, welche die LSm/LSmAD-Domäne exprimierten, eine Zunahme der endogenen T-Plastin-Immunreaktivität (siehe Abbildung 32). Um eine Sequenzspezifität des verwendeten Protein-Tags auszuschließen, wurde das Fusionsprotein dieser ATXN2-Proteinregion sowohl mit einem HA- als auch mit einem FLAG-Tag zur Expression gebracht. Da mit beiden verwendeten Proteinkonstrukten die Akkumulation der T-Plastin-Konzentration detektiert wurde, konnte eine Abhängigkeit des Ergebnisses vom verwendeten Protein-Tag ausgeschlossen werden.

Diese Beobachtung sollte zusätzlich in einer weiteren Zelllinie verifiziert werden. Aus diesem Grund wurden HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pTLFLAG-ATXN2-LSm/LSmAD oder pTLFLAG-ATXN2-CTerm transient transfiziert und nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen für Immunfluoreszenz-Analysen vorbereitet. Wie schon in COS-1-Zellen beobachtet, wiesen HEK293T-Zellen, welche die LSm/LSmAD-Domäne von ATXN2 exprimierten, ebenfalls ein Anstieg der endogenen T-Plastin-Konzentration auf (Abbildung 33).

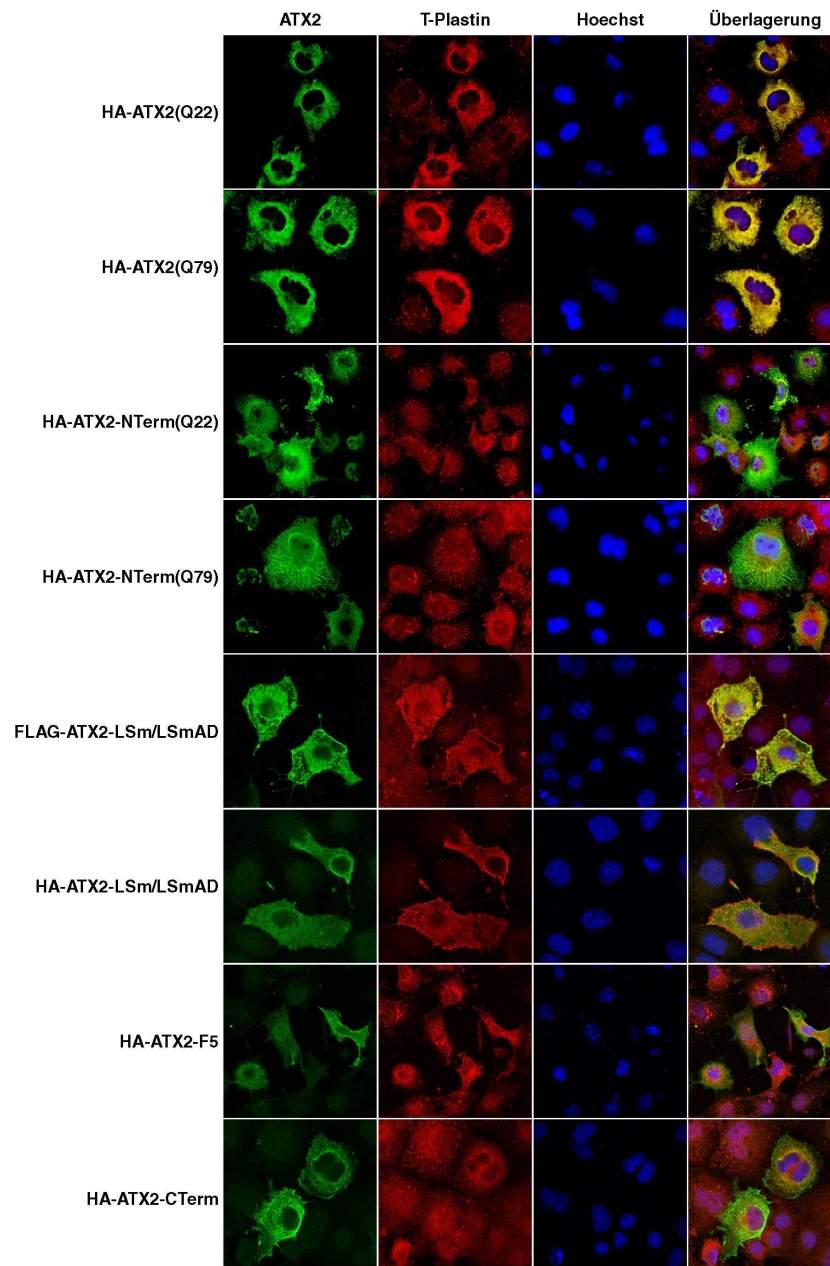


Abbildung 32: Die LSm/LSmAD-Domäne von ATXN2 beeinflusst die endogene T-Plastin-Konzentration. Immunfluoreszenz-Analyse. COS-1-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit den Plasmiden pTLHA-ATXN2-Q22, pTLHA-ATXN2-Q79, pTLHA-ATXN2-NTerm-Q22, pTLHA-ATXN2-NTerm-Q79, pTLFLAG-ATXN2-LSm/LSmAD, HA-ATXN2-LSm/LSmAD, pTLHA-ATXN2-F5 oder pTLHA-ATXN2-CTerm transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen fixiert und die Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen HA, bzw. FLAG und T-Plastin gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt.

Wurde als Kontrolle der C-Terminus von ATXN2 überexprimiert, war keine Zunahme der Immunreaktivität von T-Plastin zu erkennen.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die LSm/LSmAD-Domäne von ATXN2 für die Erhöhung des T-Plastin-Niveaus eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Interessanterweise war die LSm/LSmAD-Domäne auch für die Auflösung der P-body-Strukturen bei Überexpression von ATXN2 verantwortlich (siehe Abbildung 18).

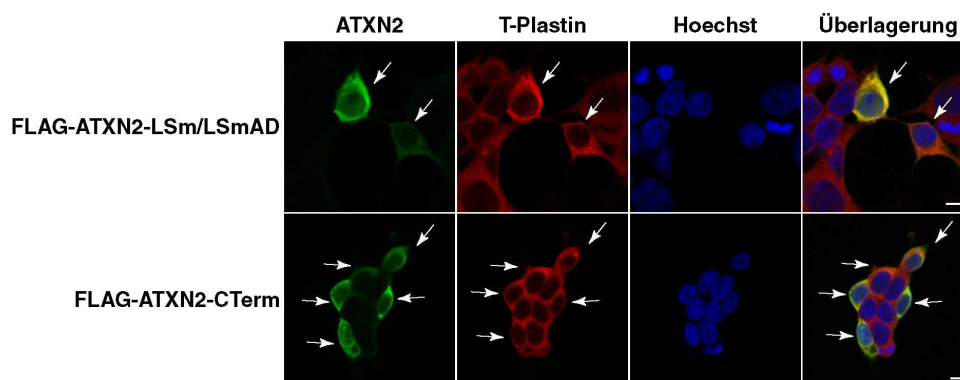


Abbildung 33: Die LSm/LSmAD-Domäne von ATXN2 ist bei Überexpression verantwortlich für die Zunahme der endogenen T-Plastin-Konzentration. Immunfluoreszenz-Analyse. HEK293T-Zellen wurden mit pTLFLAG-ATXN2-LSm/LSmAD und pTLFLAG-ATXN2-CTerm transient transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen FLAG und T-Plastin gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht. Pfeile deuten auf transfizierte Zellen.

3.5.4 Untersuchungen zu Lokalisation von L- und T-Plastin unter Stress-Bedingungen

Wie Eingangs erwähnt, konnte durch Proteom-Analysen eine Assoziation von T-Plastin mit PABP nachgewiesen werden [150, 151]. Die Rolle und Funktion von T-Plastin und L-Plastin sind jedoch noch weitestgehend unbekannt. Deshalb sollte in den folgenden Studien analysiert werden, ob die Plastine aufgrund ihrer Assoziation mit ATXN2 als auch mit PABP, unter Stress-Bedingungen eine Komponente von SGs darstellen.

Zu diesem Zweck wurden DU145-Zellen, wie in vorangegangenen Untersuchungen, mit Hitze oder Arsenit behandelt, und für Immunfluoreszenz-Analysen präpariert.

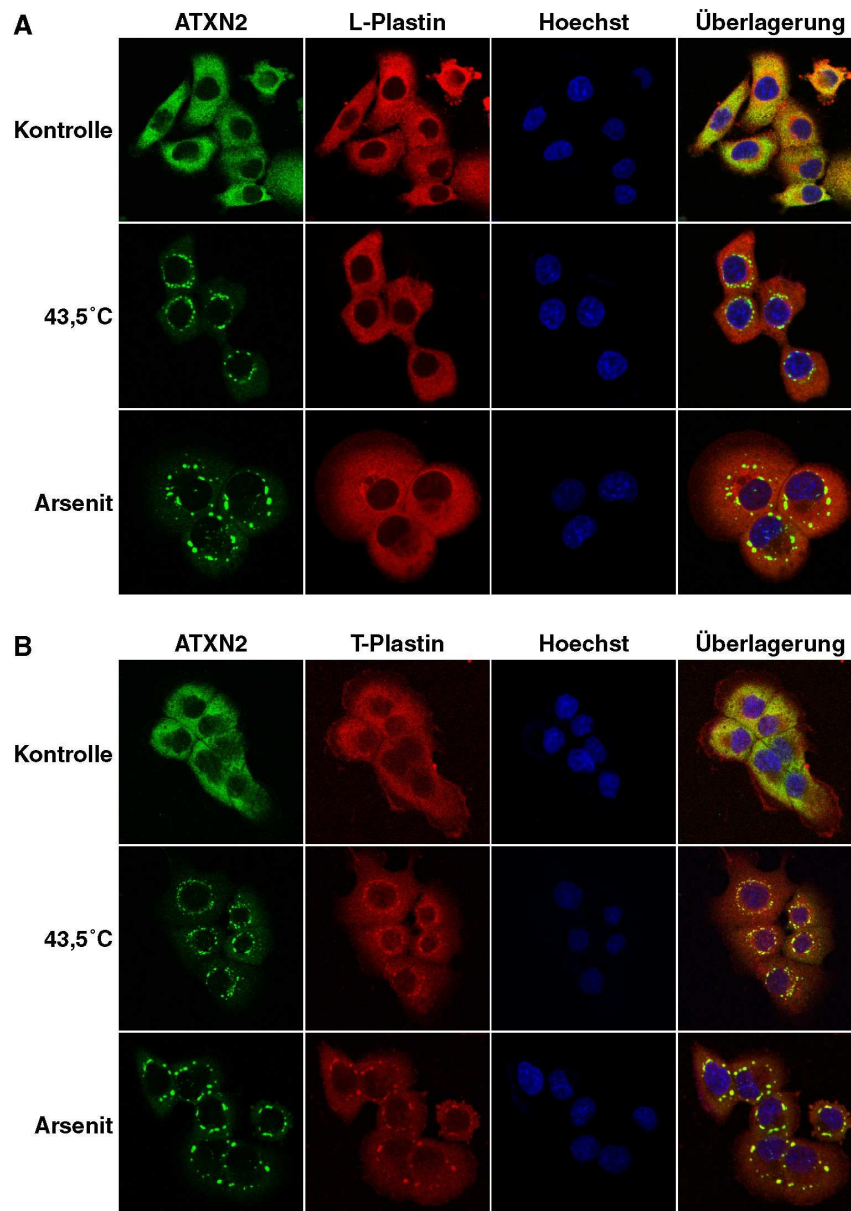


Abbildung 34: T-Plastin ist eine Komponente von SGs. Immunfluoreszenz-Analyse. DU145-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und am folgenden Tag eine Stunde lang bei 43,5°C inkubiert oder mit 0,5 mM Arsenit behandelt und die Proteine anschließend für Immunfluoreszenzaufnahmen mit Antikörpern gegen ATXN2 und L-Plastin (A) oder ATXN2 und T-Plastin (B) gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst sichtbar gemacht.

Es zeigte sich, dass unter normalen Wachstumsbedingungen L-Plastin auch in DU145-Zellen im Zytoplasma der Zellen verteilt lokalisierte (Abbildung 34A). Nach Induktion von Hitze- oder oxidativem Stress war keine Veränderung in der Lokalisation von L-Plastin zu erkennen, während ATXN2, wie beschrieben, in SGs akkumulierte. Im Gegensatz dazu konnte beobachtet werden, dass T-Plastin sowohl unter Hitze als auch oxidativen Stress-Bedingungen in SGs lokalisierte. Weiterhin zeigte sich, dass T-Plastin, neben der Lokalisation in SGs, zusätzlich noch zytoplasmatisch detektiert werden konnte. Des Weiteren wurden nicht alle SGs mit T-Plastin positiv markiert, da kleine ATXN2-positive SG-Strukturen mit dem T-Plastin-Antikörper nicht detektiert werden konnten.

Daraus folgt, dass T-Plastin eine weitere SG-Komponente darstellt, aber, im Gegensatz zu ATXN2, anscheinend kein Markerprotein für diese Strukturen ist.

3.5.5 Ein erhöhter Plastin-Level führt vermehrt zur Bildung von SGs

Die Tatsache, dass in SCA2-Patienten ein erhöhter ATXN2-Level beobachtet wurde, und eine Überexpression des Proteins in den hier vorgestellten Untersuchungen zu einer Erhöhung der endogenen T-Plastin-Konzentration führte (3.5.3), könnte darauf hindeuten, dass die Pathogenität im Krankheitsverlauf von SCA2 mit der intrazellulären ATXN2- bzw. T-Plastin-Konzentration zusammenhängt. Daher sollten im weiteren die Auswirkungen einer verstärkten T-Plastin-Expression analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden COS-1-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und mit dem Expressionsplasmid pTLFLAG-T-Plastin transient transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen fixiert und die Zellen mit einem Antikörper gegen den FLAG-Tag und zusätzlich mit spezifischen Antikörpern gegen ATXN2, PABP oder TIA-1 inkubiert.

Die mikroskopische Untersuchung dieser Zellen zeigte, dass überexprimiertes T-Plastin im gesamten Zytoplasma der Zellen verteilt lokalisierte (Abbildung 35). Dabei war zu beobachten dass ca. 30 - 40 % der Zellen, welche T-Plastin überexprimierten, Proteinakkumulationen der endogenen SG-Komponenten, ATXN2, PABP oder TIA-1, im Zytoplas-

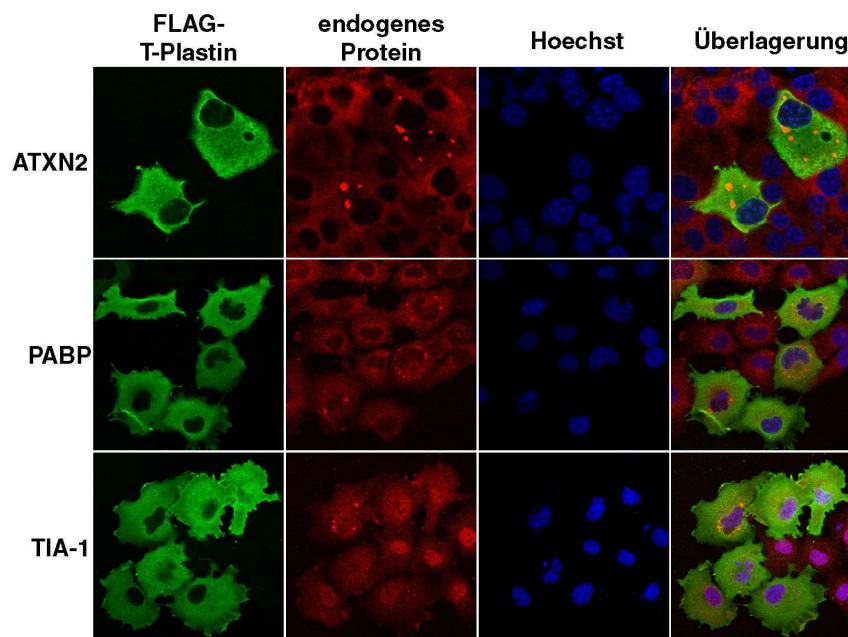


Abbildung 35: Überexpression von T-Plastin führt zur Bildung von SGs. Immunfluoreszenz-Analyse. COS-1-Zellen wurden aus Deckgläsern ausgesät und am folgenden Tag mit FLAG-T-Plastin transfiziert. Nach zwei Tagen Proteinexpression wurden die Zellen fixiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen FLAG und ATXN2 (oben), PABP (mitte) oder TIA-1 (unten) behandelt. Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt.

ma aufwiesen. Diese Akkumulationen konnten sowohl mit den beiden Markerproteinen ATXN2 und TIA-1, als auch mit der SG-Komponente PABP sichtbar gemacht werden. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei diesen durch die Überexpression von T-Plastin ausgelösten zyttoplasmatischen Strukturen um SGs handelte. Dass die Formation von SGs bei Überexpression verschiedener Proteine jedoch ein Überexpressionsartefakt per se darstellten, konnte durch die Vielzahl der gezeigten Überexpressionsstudien dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

Obwohl unter 3.5.3 gezeigt werden konnte, dass bei Überexpression von ATXN2 eine Erhöhung der endogenen T-Plastin-Konzentration vorlag, konnte dort keine Bildung von "klassischen" SG-Strukturen beobachtet werden. Dies könnte jedoch daran liegen, dass der erhöhte T-Plastin-Level bei transientser Überexpression von ATXN2 eine nicht

vergleichbar hohe Konzentration erreicht, wie bei einer transienten Überexpression des Proteins. Ob dieser Beobachtung ein möglicher pathogener Aspekt bezüglich SCA2 zugesprochen werden kann, müsste durch weitergehende Untersuchungen in geeigneten Modellsystemen, wie Tiermodellen oder stabilen Zelllinien, im Detail analysiert werden.