

## 4 Diskussion

Die neurodegenerative Krankheit Spinozerebellare Ataxie Typ 2 ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die zur Familie der Polyglutaminerkrankungen gehört [1]. Diese Familie besteht derzeit aus neun Krankheiten, die alle eine Expansion eines Polyglutaminbereichs im krankheitsauslösenden Protein beinhalten (siehe Einleitung Tabelle 1), welche jedoch untereinander, bis auf den Polyglutaminbereich, keine Homologien aufweisen [1, 2, 4, 6, 11]. Als ein spezielles Merkmal des Großteils dieser Erkrankungen, wurden nukleäre oder zytoplasmatische Proteinaggregate in Neuronen der betroffenen Gehirnregionen von Patienten beschrieben [11]. Im Gegensatz zu den anderen Polyglutaminerkrankungen, scheint die Bildung von Proteinaggregaten bei SCA2 jedoch nicht unabdingbar zum pathogenen Mechanismus beizutragen, da solche Akkumulationen nur vereinzelt in Kleinhirnläsionen in post mortem Gehirnen beobachtet werden konnten. Vielmehr wurde in Gehirnen betroffener Patienten ein erhöhter Expressionslevel von Ataxin-2, dem Polyglutaminprotein welches bei SCA2 von Bedeutung ist, nachgewiesen [44, 45]. Somit könnte diese gesteigerte Proteinkonzentration an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sein. Weiterhin wurde auch bei Menschen im fortgeschrittenen Alter ein erhöhter ATXN2-Expressionslevel nachgewiesen, was auch auf eine Bedeutung einer veränderten ATXN2-Konzentration in Alterungsprozessen deuten könnte [44]. Des Weiteren existieren erste Hinweise, dass ein modifizierter ATXN2-Expressionslevel zusätzlich eine Rolle bei Krebserkrankungen spielen könnte, da in Neuroblastoma-Tumoren junger Kinder unterschiedliche Expressionslevel von ATXN2 nachgewiesen wurden. Dabei wurden in Tumoren, die eine Amplifikation des *MYNC*-Onkogens aufwiesen, niedrige ATXN2-Konzentrationen gefunden. Tumore, in denen dagegen keine Amplifikation von *MYNC* nachgewiesen werden konnte, zeigten im Vergleich höhere ATXN2-Konzentrationen [63]. Weiterhin ergaben Zellkulturexperimente an Neuroblastoma-Zellen, dass eine Expression von normalem, nicht aber von expandiertem ATXN2, vermehrt zur Apoptose der Zellen führt [63]. In einer weiteren Studie erwies sich allerdings die Überexpression von ATXN2

---

mit einem verlängerten Polyglutaminbereich als toxisch für die verwendeten COS-1- und PC12-Zellen [64]. Dieses Ergebnis könnte auf eine toxische Expressionsspezifität von ATXN2 in verschiedenen Zelltypen hinweisen. Auf Grund dieser Daten sind Analysen zur Auswirkung einer modifizierten ATXN2-Konzentration auf zelluläre Prozesse, eine gesteigerte Bedeutung beizumessen, um potentielle Mechanismen, welche zur Pathogenese von SCA2 beitragen zu identifizieren.

#### **4.1 Rolle von ATXN2 im zellulären mRNA-Metabolismus**

Wie bereits erwähnt, ist die zelluläre Funktion von ATXN2 bislang weitestgehend unbekannt. Durch verschiedene Untersuchungen der Homologe in *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* konnte das Protein jedoch mit dem zellulären mRNA-Metabolismus in Verbindung gebracht werden [79, 81, 82, 89, 152]. Diese Verbindung konnte auch für das humane Protein auf Grund einer Interaktion mit dem Ataxin-2-Bindeprotein 1 (A2BP1) gezogen werden [89]. Das Protein besitzt ein RNP-Motiv (Ribonukleoprotein-Motiv), welches ein hochkonserviertes Motiv in RNA-Bindeproteinen darstellt [153]. Es wird vermutet, dass A2BP1 zu einer Familie von Proteinen gehört, die sich durch dieses hochkonservierte RNP-Motiv auszeichnen. Proteine dieser Familie sind vermutlich an diversen Schritten des mRNA-Metabolismus, wie zum Beispiel Prozessierung von mRNA und intrazellulärem mRNA-Transport, beteiligt. Weiterhin gelang es der Arbeitsgruppe, eine funktionelle Verwandtschaft von ATXN2 und seinem Hefe-Homolog Pbp1 zu belegen. Ursprünglich wurde Pbp1 als Suppressor des "petite"-Phänotyps in  $\Delta mrs2$ -Hefen identifiziert [68]. In der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ATXN2, ebenso wie sein Hefehomolog Pbp1, als Suppressor dieses Phänotyps wirken kann [69]. Des Weiteren wurde im Zuge dessen ein Hefeinteraktionsnetzwerk von Pbp1 erstellt, in dem die Assoziationen von Pbp1 mit verschiedenen, am mRNA-Metabolismus beteiligten, Proteinen dargestellt wird (Abbildung 3). Auf Grund der funktionellen Verwandtschaft von ATXN2 und Pbp1 wurde geschlossen, dass sich das Pbp1-Interaktom auf das humane System übertragen lassen

könnte.

Erste Hinweise, dass ATXN2 und PABP miteinander assoziieren, wurden mittels "Yeast-two-Hybrid"-Untersuchungen erzielt. Eine Verifizierung dieser Hinweise, gelang mit Hilfe einer transienten Koimmunpräzipitation von definierten Proteinregionen in COS-1-Zellen [69]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion von ATXN2 und PABP erstmalig mit endogenen Proteinen in DU145-Zellen gezeigt werden (Abbildung 7). Diese Assoziation ist von Bedeutung, da PABPC1 an verschiedenen Regulationsprozessen im mRNA-Metabolismus beteiligt ist und in der Translation eine Rolle spielt [71]. Neben PABPC1 konnten bisher 3 weitere zytoplasmatische (PABPC3, iPABP und PABPC5) und ein nukleär lokalisiertes PABP-Protein (PABPN1) in Menschen identifiziert werden [71]. Strukturell gesehen besteht PABP aus vier RRM-Motiven ("RNA recognition motif") im N-terminalen Bereich des Proteins und der sogenannten PABC-Domäne im C-Terminus [71]. Das RRM-Motiv besteht aus ca. 90 - 100 Aminosäuren, die eine globuläre Domäne bilden. Diese besteht aus vier antiparallelen  $\beta$ -sheets, die von zwei  $\alpha$ -Helices umgeben sind [71, 154]. Die RRM-Motive ermöglichen es dem Protein direkt an RNA zu binden. RRM1 und -2 sowie RRM3 und -4 bilden dabei jeweils eine funktionelle Einheit, wobei jedes RRM alleine imstande ist, RNA zu binden, doch besitzen diese Motive nicht die gleichen Affinitäten für den poly(A)-Bereich der mRNA [154, 155]. Im Falle von PABPC1 findet die Bindung über die Motive RRM1 und RRM2 an das 3'-Ende des poly(A)-Schwanzes von eukaryotischer mRNA statt. RRM-Motive sind in vielen verschiedenen Proteinen konserviert, und es wird angenommen, dass Proteine mit diesem Motiv generell Funktionen im mRNA-Metabolismus einnehmen [153]. In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass ATXN2 mit der C-terminalen PABC-Domäne von PABP interagiert [137]. Diese aus fünf Helices bestehende Domäne ist ebenfalls hoch konserviert, und wird im Protein nicht für die Bindung von mRNA benötigt, sondern stellt ein Motiv für Protein-Protein-Interaktionen dar [88]. Mit Hilfe dieses Bereiches kann PABP mit Faktoren interagieren, die für Translationsinitiation,

---

Translationstermination, Polyadenylierung oder Deadenylierung verantwortlich sind [71]. Diese Domäne ist auch in Proteinen der sogenannten "hyperplastic disc" (HYD) Familie enthalten [156]. Diese stellen eine Familie von Ubiquitin-Protein-Ligasen dar und sind demnach mit dem Abbau von Proteinen verknüpft [157, 158, 159], wobei PABP jedoch keine Rolle bei der Degradation von Proteinen spielt. Des Weiteren ist PABP auf Grund seiner Domänenstruktur nicht nur in der Lage an den poly(A)-Schwanz der mRNA zu binden; es ist auch für die korrekte Bildung dieses Bereiches verantwortlich. Durch Mutationen im zytoplasmatischen *Pab1*-Gen der Hefe kommt es neben der Inhibition der Translationsinitiation und einem verspäteten Beginn des mRNA-Abbaus, zu einer signifikanten Verlängerung des poly(A)-Schwanzes von mRNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [160, 161, 162], während die Deletion des *Pab1*-Gens in der Hefe lethal ist [160]. Interessanterweise ist auch das Hefe-Homolog von ATXN2, Pbp1, an der korrekten Bildung des poly(A)-Bereiches von mRNA beteiligt [72, 152]. Bei einer Depletion von Pbp1 in Hefezellen, wird das 3'-Ende von pre-mRNA korrekt prozessiert, es fehlt ihnen jedoch ein kompletter poly(A)-Schwanz. Damit könnte Pbp1 ein negativer Regulator von Pab1 sein, oder die Aktivität von poly(A)-Nukleasen (PAN) kontrollieren. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Pbp1 mit Pan2 interagiert und diese Untereinheit des PAN-Komplexes Pan2-Pan3 negativ reguliert [73]. Zudem ist PABP an Regulationsprozessen der Translation beteiligt, da es mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G interagiert, der seinerseits mit weiteren am Initiationskomplex beteiligten Proteinen assoziiert vorliegt. Durch die Interaktion von PABP mit eIF4G kommt es zur Ringbildung, dem sogenannten "closed loop", der mRNA und durch mehrere aufeinander folgende Translationsinitiationen wird ein Polysom geformt [162, 163, 164]. Diese Verbindung der verschiedenen Proteine miteinander verhindert die Abspaltung der Kappenstruktur der mRNA während der Translation und damit ihren Abbau [165, 166]. Satterfield und Pallanck konnten zeigen, dass ATXN2 und sein *Drosophila melanogaster*-Homolog Datx2 mit Polysomen assoziieren, wobei die Interaktion zumindest teilweise über die Assoziation von ATXN2 und PABP zustande kommt [82]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass ATXN2 eine

direkte Rolle in der Regulation der Translation zugewiesen werden könnte. Dieser Punkt wird in einem späteren Abschnitt der Diskussion genauer beleuchtet werden.

Eine weitere Interaktion, die eine potentielle Rolle von ATXN2 im zellulären mRNA-Metabolismus unterstützt, ist die Assoziation von ATXN2 und DDX6 (Abbildung 12A). DDX6 (DEAD Box polypeptid 6) gehört zur Hauptgruppe der RNA/DNA-Helikasen, die auf Grund struktureller Merkmale in fünf Superfamilien unterteilt wird (SF1 - SF5). DDX6 ist dabei zur Superfamilie 2 zu zählen. DEAD-Box-RNA-Helikasen sind an vielen RNA-Prozessen beteiligt und wurden in einem Großteil der Eukaryonten und vielen Prokaryonten nachgewiesen. Die Aufgaben dieser Proteine reichen dabei von der Beteiligung an transkriptionellen Prozessen bis hin zur Partizipation an Degradationsprozessen von RNA [167].

Generell besitzen DEAD-Box-RNA-Helikasen neun konservierte Motive, die an der ATPase- und der Helikase-Aktivität beteiligt, und in der "CORE"-Region lokalisiert sind. Diese umfasst 350 - 400 Aminosäuren und ist in zwei Domänen (DEXDc und HELICc) organisiert [168]. Sowohl der N-terminale als auch der C-terminale Bereich der DEAD-Box-Proteine gestalten sich dagegen sehr variabel [169, 170].

Die Interaktion zwischen ATXN2 und DDX6 ist insofern interessant, als das ihre entsprechenden Hefe-Homologe mit der Regulation der Translation und mit dem mRNA-Metabolismus in Zusammenhang gebracht wurden. So interagiert Dhh1 zum Beispiel mit Pop2 und Ccr4, welche Bestandteile des Ccr4/Pop2/Not-Komplexes in *Saccharomyces cerevisiae* sind [171]. Dieser Komplex ist für die Deadenylierung von mRNA verantwortlich und wird interessanterweise von Pab reprimiert. Des weiteren assoziiert Dhh1 außerdem mit der, am mRNA-Abbau beteiligten, 5'-3'-Exoribonuklease Xrn1, und mit den Degradationsfaktoren Pat1/Mtr1 [74, 75]. Auf Grund von Untersuchungen Dhh1-defizienter Hefestämme wurde das Protein mit dem "decapping" der mRNA und Translationsrepression in Verbindung gebracht [74, 136]. Des weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Dhh1 die Bildung des 48S-Preinitiationskomplexes stört und damit an der

---

Translationsregulation beteiligt ist.

Die Untersuchung weiterer eukaryotischer Homologe von DDX6 zeigte, dass diese signifikante Rollen in der Gametogenese und der frühen Embryogenese spielen. So ist zum Beispiel das *Caenorhabditis elegans* Homolog CGH-1 im Schutz vor Keimbahn-Apoptose involviert, da die Abwesenheit von CGH-1 über einen unbekanntem Mechanismus zur Apoptose in Keimzellen von *Caenorhabditis elegans* führt [172]. Die Homologe Xp54 (aus *Xenopus laevis*) und Me31B (aus *Drosophila melanogaster*) sind jeweils integrale Bestandteile der sogenannten "stored (maternal) mRNP particles" in Oozyten [173, 174, 175]. Es wird postuliert, dass sie hier in der Kontrolle der Translation eine Rolle spielen. Xp54 interagiert mit CPEB, dem "Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein", einem translationsregulierenden Protein, welches in P-bodies lokalisiert [176]. Des Weiteren konnte auch für das humane CPEB1 eine Lokalisation in P-bodies gezeigt werden [135]. Interessanterweise lokalisiert DDX6 ebenfalls in diesen zytoplasmatischen Strukturen (Abbildung 12).

Bemerkenswerterweise zeigte sich unter Stress-Bedingungen, dass P-bodies mit anderen zellulären Strukturen, den SGs, fusionieren können [96, 134, 135]. Es wird vermutet, dass bei diesen Assoziationen der beiden Strukturen mRNA aus SGs in P-bodies überführt und somit zur Degradation freigegeben wird. Ob dabei auch ein Austausch von mRNA aus den P-bodies in SGs stattfindet, ist nicht geklärt worden. Es wird jedoch postuliert, dass auch mRNA aus diesen Strukturen wieder dem Translationspool zugeführt werden kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATXN2 unter Stress-Bedingungen mit PABP in SGs kolokalisiert und damit ebenfalls eine Komponente dieser Strukturen darstellt (Abbildung 8A). Dieses Ergebnis konnte zusätzlich mit Hilfe des SG-Markerproteins TIA-1 bestätigt werden (Abbildung 8B). Dabei zeigte sich, dass ATXN2 in sämtlichen TIA-1 positiven SGs enthalten war. Demnach kann auch ATXN2 eine Rolle als Markerprotein

dieser Strukturen zugesprochen werden.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass einige Proteine nur unter bestimmten Bedingungen in SGs lokalisieren. So ist zum Beispiel HSP27 unter Hitzestress, nicht aber bei oxidativen Stress-Bedingungen, in SGs lokalisiert [118]. Diese Beobachtung weist auf eine unterschiedliche Stressantwort der Zellen bei verschiedenen Stress-Bedingungen hin. ATXN2 stellt jedoch eine generelle Komponente dieser Strukturen dar, da es sowohl unter Hitze- als auch unter oxidativem Stress in SGs lokalisiert.

Bemerkenswerterweise wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt, dass der endogene Expressionslevel von ATXN2 unter Stress-Bedingungen einer Veränderung unterliegt (Abbildung 10). DU145 Zellen wurden in einer Zeitreihe sowohl Hitze als auch oxidativem Stress ausgesetzt. Durch anschließende Analyse des endogenen ATXN2-Expressionslevels wurde ein Anstieg der endogenen ATXN2-Konzentration unter Einfluss von Hitze und oxidativen Stress-Bedingungen festgestellt. Der Anstieg der endogenen Konzentration war unter Induktion von Hitzestress größer als der unter oxidativen Bedingungen. Dieses Ergebnis lässt wiederum auf verschiedene Wege der Stressantwort von Zellen auf unterschiedliche Stress-Bedingungen schließen. Diese Vermutung wird weiterhin durch die im vorherigen Abschnitt diskutierte Beobachtung untermauert, dass die Zusammensetzung von SGs bei verschiedenen Stressen ebenfalls Veränderungen unterliegt. Dass ATXN2 eine Erhöhung der endogenen Proteinkonzentration unter Stress-Bedingungen zeigt ist insofern bemerkenswert, als das bisher kein Protein der Polyglutaminkrankheitsfamilie mit einem solchen Verhalten in Verbindung gebracht wurde. Unter Stress-Bedingungen kommt es in Zellen zu einer Veränderung des mRNA-Metabolismus, da vermehrt Hitzeschockproteine gebildet werden, während die Translation von "housekeeping" Proteinen gedrosselt wird [113, 177]. Dabei werden vermehrt Proteine der Hitzeschock-Proteinfamilie gebildet. Diese molekularen Chaperone helfen bei der Rückfaltung von denaturierten Proteinen. Die vermehrte Bildung der HSPs wird durch eine Aktivierung der "heat shock transcription factor"-Proteine (HSFs) indu-

---

ziert [121, 122]. Wie hier an HSP70 gezeigt, konnte unter den gewählten Hitzeschock-Bedingungen ebenfalls ein Anstieg dieses Proteins gezeigt werden. Damit wurde eine Induktion der Hitzeschockantwort belegt. Unter oxidativem Stress, ausgelöst durch eine Behandlung der Zellen mit Arsenit, war der Anstieg sowohl von ATXN2 als auch von HSP70 nicht so stark, wie unter Hitzeschockbedingungen. Dieses Ergebnis kombiniert mit der Lokalisation von ATXN2 in SGs und seiner Markerfunktion in diesen Strukturen, läßt die Vermutung zu, dass ATXN2 unter Stress-Bedingungen an der Stress-Antwort beteiligt ist. Da ATXN2 unter diesen Bedingungen jedoch vornehmlich in SGs lokalisiert, könnte eine Funktion dieses Proteins, im Gegensatz zu klassischen Chaperonen, deren Rolle die Hilfe bei Faltungen von Proteinen darstellt, eher im Bereich des Schutzes oder des Sortierens (Abbau oder Lagerung) von mRNA zu suchen sein.

Eine gesteigerte Konzentration von ATXN2 unter Stress-Bedingungen könnte durch eine Bindung eines Proteins der HSF-Familie an den Promotor-Bereich von ATXN2 zustande kommen. Dabei wäre HSF1 als das potentielle Promotor-Bindungsprotein anzusehen, da dieses Protein einer Aktivierung unter Stress-Bedingungen unterliegt; während dies für die anderen Mitglieder der HSF-Proteinfamilie bisher nicht eindeutig gezeigt werden konnte [178]. Unter normalen Bedingungen liegt HSF1 als reprimiertes Monomer in der Zelle vor. Unter Stress-Bedingungen bilden sich Trimere, die im Zellkern lokalisieren und aktiviert werden. Aktivierte Trimere können an die sogenannten "heat shock response elements" (HSEs) der HSP-Promotoren binden, was in einer Transkription der *HSP*-Gene resultiert [121, 122]. In vorläufigen Studien des ATXN2-Promotors und der ATXN2-Sequenz, konnte in Zusammenarbeit mit H. Klein (MPI für molekulare Genetik), eine putative HSF1-Bindestelle in dieser Region bestimmt werden. Dieses Ergebnis würde für eine verstärkte Translation von ATXN2 unter Stress sprechen.

Eine weitere Möglichkeit, die zu einer gesteigerten ATXN2-Konzentration unter Stress-Bedingungen führen würde, wäre eine Beeinträchtigung der Aktivität des Proteasom-Komplexes bei Stress, und damit verbunden einem abgeschwächten Abbau von Proteinen. Tatsächlich wurde eine Schwächung des Proteasoms mit oxidativem Stress in Zu-

sammenhang gebracht [179]. Der Abbau von Proteinen über das Proteasom kann dabei sowohl in einer Ubiquitin-abhängigen als auch einer Ubiquitin-unabhängigen Art und Weise vollzogen werden. Interessanterweise scheint eine Beeinträchtigung der Proteasom-Aktivität in verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten, wie Alzheimer, Parkinson und der Huntington-Krankheit eine große Rolle zu spielen [180].

## **4.2 Zelluläre Konsequenzen eines veränderten Ataxin-2 Expressionslevel als möglicher Pathomechanismus?**

### **4.2.1 Auswirkungen eines verringerten AXN2-Expressionslevels auf die zelluläre Homöostase**

Durch die Reduktion des Expressionslevels eines Proteins durch z.B. RNAi oder die vollständige Eliminierung eines Proteins durch einen "knock out" können wichtige Rückschlüsse auf seine Funktion gezogen werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit "knock down"-Studien mittels RNAi an HEK293T-Zellen durchgeführt, um die Auswirkungen eines verringerten ATXN2-Expressionslevels auf die Lokalisation und/oder Konzentration der beschriebenen Interaktionspartner und der am RNA-Metabolismus beteiligten Strukturen, P-bodies und SGs, zu untersuchen.

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss eines verringerten ATXN2-Expressionslevels auf die Formation von P-bodies untersucht. Dabei war jedoch weder unter normalen Wachstumsbedingungen, noch unter Stress-Bedingungen eine offensichtliche Auswirkung einer reduzierten ATXN2-Konzentration auf die Bildung dieser zytoplasmatischen Strukturen zu verzeichnen. Rein visuell wurden weder mehr, noch größere P-bodies formiert (Abbildung 16). Auch war keine Veränderung der endogenen DDX6-Konzentration oder Lokalisation zu beobachten. Damit übt ein verringerter ATXN2-Level anscheinend keinen direkten Einfluss auf den in P-bodies lokalisierten 5'-3'-Abbauweg der mRNA aus, und seine Anwesenheit scheint für die Formation von P-bodies nicht zwingend erforderlich zu sein. Auch die Anlagerung von P-bodies und

---

SGs unter Stress-Bedingungen wurde von einer verringerten ATXN2-Konzentration nicht beeinträchtigt.

Ein anderes Bild zeigte sich jedoch im Zusammenhang zwischen einer verringerten ATXN2-Konzentration und der Formation von SGs. Wurde der ATXN2-Level in HEK293T-Zellen mittels RNAi verringert, kam es unter den gewählten Bedingungen zu einer Störung in der SG-Bildung (Abbildung 19). Bei einer Reduktion der ATXN2-mRNA auf unter 25 % verbliebene mRNA, ging die Bildung der SGs in den Zellen auf ca. 16 % zurück (Abbildung 20). ATXN2 ist somit wahrscheinlich direkt an der Entstehung von SGs beteiligt.

Interessanterweise konnte in vorangegangenen Arbeiten ein Einfluss des Expressionslevels von TIA-1 auf die Bildung von SGs nur bei einem "knock out", nicht aber schon bei einem "knock down" der Proteinexpression beobachtet werden [143, 181]. Diesem Protein wird allerdings eine essentielle Rolle in der Entstehung der SGs zugesprochen. TIA-1 gehört zur Familie der RNA-Bindeproteine, und ist als "translational silencer" bekannt. Es reguliert selektiv die Expression des Tumor-Nekrosis-Faktor- $\alpha$  und spielt, zusammen mit Tristetraprolin (TTP), im Arthritis-Krankheitsbild eine Rolle [182, 183]. Strukturell gesehen, beinhaltet TIA-1 N-terminal drei RRM-Motive, während der C-Terminus eine dem Prion-Protein verwandte Domäne beinhaltet, welche zur Selbstaggregation fähig ist [131]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Expression der Prion-Protein verwandten Domäne zur spontanen Bildung von SGs unter normalen Wachstumsbedingungen führt, in die auch endogenes TIA-1 rekrutiert wird [143]. Die Überexpression einer mutierten Form von TIA-1, der die RRM-Motive zur RNA-Bindung fehlt, verhindert hingegen die Bildung von SGs [118].

Das Ergebnis, dass eine Reduktion des endogenen ATXN2-Levels die Formation von SGs beeinflusst, führt zu der Vermutung, dass TIA-1 eventuell bei einem "knock out" von ATXN2 nicht in der Lage wäre, die Bildung von SGs zu induzieren. Dieses Gedankenspiel ist insofern interessant, als dass man weiter vermuten könnte, dass der Polyglutaminbereich von ATXN2 vielleicht als aggregationsfördernder Keim für die Selbstaggregation

der Prion-Protein verwandten Domäne von TIA-1 wirkt. Diese Möglichkeit muss jedoch in weiterführenden Untersuchungen in geeigneten Modellsystemen analysiert werden. Ein weiterer Effekt der Reduktion der endogenen ATXN2-Konzentration war die Zunahme der endogenen PABP-Konzentration (Abbildung 24 und 25). Dieser erhöhte endogene PABP-Level resultierte jedoch nicht aus einer vermehrten Transkription der PABP-mRNA, was mittels quantitativer "real time" RT-PCR gezeigt werden konnte (Abbildung 25). Daher könnte geschlossen werden, dass entweder eine vermehrte PABP-Translation stattfindet, oder dass PABP durch einen verringerten ATXN2-Level stabilisiert wird. Veränderungen der endogenen PABP-Konzentration üben nicht nur einen Einfluss auf die Synthese verschiedener Proteine aus, sondern auch das zelluläre Protein-Expressionsprofil wird verändert [184]. Eine Überexpression von PABP führt, durch eine vermehrte Interaktion von PABP und eRF3, zu einer erhöhten Effizienz der Translationstermination in *Saccharomyces cerevisiae* [185]. Des Weiteren wurden Defekte in der Zellteilung von *Schizosaccharomyces pombe* bei Überexpression von PABP beobachtet [186]. Zudem stören erhöhte endogene PABP-Level reifungsspezifische Deadenylierung und translationelle Inaktivierung maternaler mRNAs in den Oocyten von *Xenopus laevis* [187]. Darüber hinaus konnten erhöhte PABP-Konzentrationen in frühen Krebsstadien nachgewiesen werden, was eine Verbindung zwischen Zellwachstum und endogenem PABP-Level unterstützt [188, 189]. Daher könnte man vermuten, dass ATXN2 über eine Repression der PABP-Expression oder eine Destabilisierung des Proteins in Translationsprozesse eingreifen kann.

Die beschriebenen zellulären Auswirkungen eines reduzierten endogenen ATXN2-Niveaus sind in Abbildung 36 zusammengefasst dargestellt.

### Reduzierter ATXN2-Level

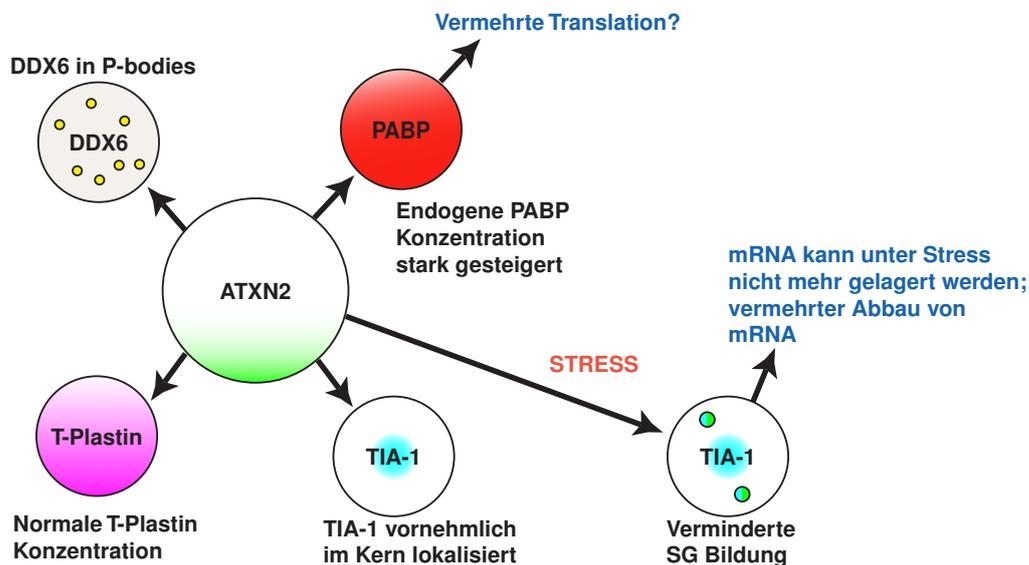


Abbildung 36: Schematische Zusammenfassung der Effekte eines reduzierten endogenen ATXN2 Levels auf seine Interaktionspartner und zytoplasmatische Strukturen.

#### 4.2.2 Auswirkungen einer erhöhten ATXN2-Konzentration auf die zelluläre Homöostase

Die Überexpression von ATXN2 resultierte in verschiedenen zellulären Veränderungen, welche schematisch in Abbildung 37 zusammengefasst sind. Zum einen wurde beobachtet, dass ein erhöhter ATXN2-Level zu einer Auflösung der P-body-Strukturen führte (Abbildung 17). Die beiden P-body-Proteine, DDX6 und DCP1, zeigten unter diesen Umständen eine diffuse zytoplasmatische Verteilung in den Zellen. Interessanterweise wies die Störung der P-body-Formation dabei eine positive Korrelation mit der Stärke des ATXN2-Expressionslevels auf. Wurde vergleichsweise wenig ATXN2 in den Zellen gebildet, konnten noch P-bodies in den Zellen detektiert werden. War im Gegensatz dazu die Expression stark gesteigert, wurde eine meist vollständige Auflösung der zytoplasmatischen P-bodies beobachtet. Dabei war jedoch kein Unterschied zwischen der Expression von ATXN2 mit einem normalen oder mit einem verlängerten Poly-

glutaminbereich zu erkennen. Dieses Phänomen war demnach unabhängig von der Polyglutaminexpansion des Proteins. Da die Expression des unabhängigen ATXN2-Interaktionspartners, Endophilin-A3, nicht zur Auflösung der P-body-Strukturen führte, konnte ausgeschlossen werden, dass dieses Ergebnis ein Überexpressionsartefakt darstellte (Abbildung 18).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die LSM/LSMAD-Domäne für die Auflösung der zytoplasmatischen Strukturen verantwortlich war. Dies ist insofern interessant, da diese Domäne den Interaktionsbereich von ATXN2 mit DDX6 darstellt [138]. Daraus könnte man schließen, dass die Dislokation von DDX6 und die Auflösung der P-bodies aus einer Rekrutierung von DDX6 resultiert. "Knock down"-Untersuchungen bezüglich DDX6 ergaben, dass Zellen, in denen die DDX6-Expression mittels RNAi verringert wurde, schwere Defekte in der P-body-Akkumulation aufweisen [190]. Auch der "knock down" anderer P-body-Komponenten wie LSM1, CCR4 oder eIF4E-T, führt zu Störungen in der P-body-Formation [190, 191, 192]. Des Weiteren konnte ebenfalls eine Auflösung der P-bodies bei Depletion von GW182 und Ge-1 beobachtet werden, während die Überexpression dieser Proteine in einer Formation von großen P-body-Strukturen resultiert [98, 101, 107, 193]. Diese Beobachtung korreliert ebenfalls mit dem vermehrten Auftreten von P-bodies in der späten S- und G2-Phase im Zellzyklus; in diesen Stadien unterliegt auch GW182 einer gesteigerten Expression, während die GW182-Konzentration in mitotischen Zellen gering ist [98, 107, 193].

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass eine erhöhte ATXN2-Konzentration zusätzlich die korrekte Komplexierung anderer LSM-Proteine stört, denn LSM-Proteine bilden, über die  $\beta$ -Stränge 4 und 5 der Sm-Motive ihrer LSM-Domänen, Heteromere [79]. Dabei könnte ATXN2 sowohl mit einzelnen Proteinen des LSM2-8-Komplexes, welcher im pre-mRNA-Spleissen eine Rolle spielt, als auch mit Proteinen des LSM1-7-Komplexes, der im "decapping" von mRNA involviert ist, oder mit deren assoziierten Proteinen interagieren und so die Funktion dieser Komplexe stören [79, 109]. Interessanterweise konnte durch "Yeast-two-Hybrid"-Studien eine direkte Interaktion von ATXN2 und LSM12

---

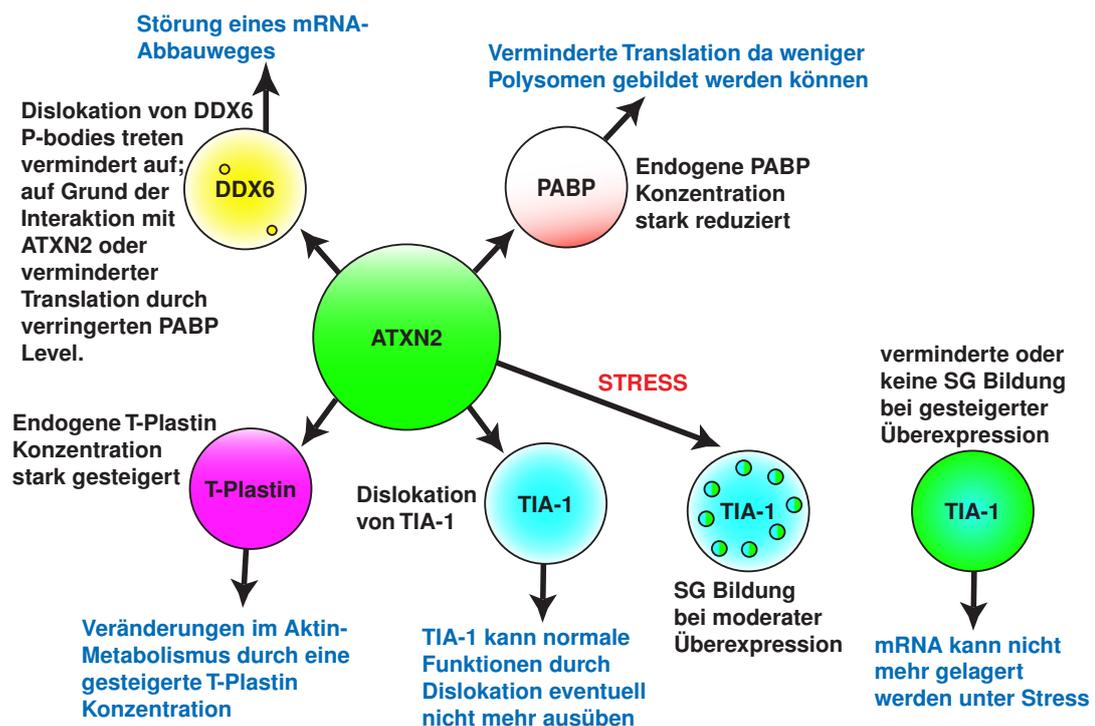
in der Arbeitsgruppe festgestellt werden. LSM12 ist ein Protein mit bisher unbekannter Funktion, welches aber auf Grund seiner Struktur zu den LSM-Proteinen gezählt wird [86]. Es interagiert mit verschiedenen Proteinen, welche im mRNA-Metabolismus eine Rolle spielen.

Die Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen eines erhöhten ATXN2-Expressionslevels auf die Formation von SGs ergaben, dass eine moderate Überexpression von ATXN2, unter den hier gewählten Bedingungen, zu einer Dislokation von TIA-1 führte. Dieses normalerweise vornehmlich nukleär lokalisierte Protein wurde bei einem gesteigerten ATXN2-Expressionslevel auch vermehrt im Zytoplasma der Zellen detektiert. Eine starke Überexpression von ATXN2 resultierte in einer stärkeren Dislokation von TIA-1. Dabei wurde das Protein in teilweise detektierbare zytoplasmatische Proteinakkumulationen von ATXN2 rekrutiert (Abbildung 22). TIA-1 ist, wie erwähnt, ein RNA-Bindeprotein, welches kontinuierlich zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma der Zellen pendelt und unter Stress-Bedingungen ein essentielles Protein von SGs darstellt [111, 128, 131]. Ob TIA-1 unter den hier beschriebenen Bedingungen seine normalen Funktionen noch ausführen kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Zusätzlich dazu müsste auch TIA-1 in post mortem Gehirnen von SCA2-Patienten markiert werden, um zu klären, ob auch im Falle von SCA2 eine Dislokation von TIA-1 in betroffenen Gehirnregionen zu beobachten ist.

Des Weiteren wurde die Bildung von SGs bei einer moderaten Überexpression von ATXN2 unter Stress-Bedingungen nicht beeinflusst (Abbildung 21), während eine stark gesteigerte ATXN2-Expression zu Störungen der SG-Formation führte (Abbildung 23). Im Falle von ATXN2-Akkumulationen unter Stress-Bedingungen, war auch TIA-1 in diesen Protein-Ansammlungen lokalisiert; diese wiesen jedoch in den meisten Fällen nicht die normale Größe oder Form von SGs auf (Abbildung 23). Man könnte jedoch auch vermuten, dass sich ATXN2 bei einer starken Überexpression zu Homooligomeren zusammenschließt, und weiterhin Heterooligomere mit anderen Proteinen bildet, die

zu den beobachteten Proteinzusammenschlüssen führen. Diese Vermutungen müssen jedoch in weitergehenden Untersuchungen analysiert werden.

#### Erhöhter ATXN2 Expressionslevel



**Abbildung 37: Schematische Zusammenfassung der Effekte einer erhöhten ATXN2 Konzentration in Zellen auf seine hier untersuchten Interaktionspartner und zytoplasmatische Strukturen.**

Eine weitere Beobachtung bei den Analysen zur Überexpression von ATXN2 war eine starke Abnahme der endogenen PABP-Konzentration. Dies konnte sowohl mit Hilfe von Immunfluoreszenzaufnahmen als auch im Western Blot belegt werden (Abbildung 26). Bemerkenswerterweise führt die Entfernung von PABP aus einem Zell-freien Extrakt dazu, dass mRNA-Translationen nicht mehr initiiert werden können, da PABP die Zirkularisierung der mRNA durch Interaktion mit eIF4G, und damit mit dem Translationsinitiationskomplex, vermittelt, was die Translation durch Recycling der Ribosomen fördert [164].

---

Interessanterweise konnten Yoshida et al. zeigen, dass eine Reduktion des endogenen PABP-Levels ebenfalls zu einer Verringerung der intrazellulären PAIP2-Konzentration führt [194]. PAIP2 ist das sogenannte "PAPB-interacting protein 2" und besitzt zum einen ebenfalls ein PAM2-Motiv, welches das Protein zur Interaktion mit der PABC-Domäne von PABP befähigt [194, 195, 196]. Zum anderen beinhaltet dieses Protein zusätzlich das PAM1-Motiv, welches eine Interaktion des Proteins mit den RRM-Motiven von PABP vermittelt. Es wird vermutet, dass PAIP2 einen Regulator der PABP-Homöostase darstellt. Dabei führt ein verminderter PABP-Level zu einer Ubiquitinierung von PAIP2 durch HYD/EDD, welches, wie erwähnt, ebenfalls eine PABC-Domäne besitzt. Der vermehrte Abbau von PAIP2 führt vermehrt zu frei verfügbarem PABP und zu zunehmender PABP-Aktivität. Dies ist insofern interessant, als das in verschiedenen Krebsarten HYD/EDD überexprimiert vorliegt [197, 198]. Dies könnte zu einer vermehrten Degradation von PAIP2 führen und damit zu einer gesteigerten Translationsrate durch eine höhere PABP-Konzentration. Des Weiteren ist von Interesse, dass eine *in vitro*-Affinität von ATXN2 zur PABC-Domäne von HYD/EDD gezeigt wurde [199]. In der Arbeitsgruppe wurde versucht, diese Interaktion mittels "Yeast-two-Hybrid" zu bestätigen, was jedoch nicht gelang. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass eine Assoziation von ATXN2 und HYD/EDD nur unter bestimmten, bisher allerdings noch nicht definierten, biologischen Bedingungen stattfindet. Des Weiteren konnten Satterfield et al. wie erwähnt zeigen, dass ATXN2 mit Polysomen interagiert [82]. Die Autoren stellen in ihrer Arbeit ein Modell auf, in dem sie ATXN2 eine direkte Rolle in der Regulation der Translation zuweisen. Diese Regulation wird über die Bindung von ATXN2 über zwei seiner Domänen an Polysomen gesteuert. Zum einen bindet darin ATXN2 direkt über die LSm/LSmAD-Domäne an mRNA und indirekt, vermittelt über das PAM2-Motiv, an die PABC-Domäne von PABP, welches selber direkt über den poly(A)-Bereich der mRNA mit dieser verbunden ist. Des Weiteren interagiert PABP mit eIF4G und weiteren Faktoren, die die Kappestruktur der mRNA vor Abspaltung und damit die mRNA vor Degradation schützen. Durch die Interaktion von ATXN2 und PABP könnte die Interaktion von PABP mit eIF4G gelöst,

der Ringschluss der mRNA gestört, und letztendlich das Polysom aufgelöst werden. Die Autoren postulieren, dass eine Verlängerung des Polyglutaminbereiches von ATXN2, im Falle von SCA2, durch Interferenz mit der translationalen Regulation bestimmter mRNAs, die beobachtete Neurodegeneration auslöst.

Im Licht der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, könnten jedoch weiterreichende Schlußfolgerungen gezogen werden. Man könnte postulieren, dass nicht die Expansion des Polyglutaminbereiches von ATXN2 bei SCA2, sondern vielmehr die beobachtete erhöhte ATXN2-Konzentration in den Gehirnen Betroffener für ein vermehrtes Eingreifen von ATXN2 in die Regulation der Transkription von mRNAs verantwortlich ist. Wie in dieser Arbeit dargestellt wurde, geht eine Erhöhung der ATXN2 Konzentration mit einer Reduktion der endogenen PABP-Konzentration einher. Damit könnte weniger PABP bei der Translationsinitiation eine Rolle spielen, was in einer allgemeinen Drosselung der Translation resultieren würde. Des weiteren ist bisher nicht bekannt, ob die LSm/LSmAD-Domäne von ATXN2 an spezifische RNA-Sequenzen oder generell RNA bindet. Im Falle einer spezifischen Bindung könnte ein erhöhter ATXN2-Level die Translation bestimmter Proteine stören, da vermehrt frei vorliegendes ATXN2 diese spezifischen mRNA-Sequenzen binden könnte. Bei einer generellen und unspezifischen RNA-Bindung durch ATXN2 könnte eine willkürliche Repression der Translation von Proteinen stattfinden. In jedem Fall würde eine Drosselung der Translation einhergehen mit dem hier beschriebenen Rückgang der P-body-Strukturen, da bekannt ist, dass eine reziproke Beziehung zwischen Translation und der Anzahl der in der Zelle vorhandenen P-bodies besteht. Weiterhin könnte ATXN2 DDX6 über die beschriebene Interaktion aus P-bodies rekrutieren. Damit würde eine gesteigerte ATXN2-Konzentration zusätzlich zur Auflösung dieser Strukturen beitragen, da gezeigt wurde, dass eine Reduktion von DDX6 eine Auflösung von P-bodies bewirkt, und damit in einen essentiellen Abbauweg der mRNA eingreifen. Zum anderen ist ATXN2 im Überschuss vorhanden und könnte mit anderen Proteinen um die Interaktion mit zytoplasmatischem PABP konkurrieren, da es wahrscheinlich er-

---

scheint, dass ein erhöhter ATXN2 Level mit einer erhöhten Interaktionsrate von ATXN2 und PABP einher gehen würde. Das Phänomen des Konkurrierens eines Interaktionspartners von PABP mit anderen Proteinen konnte, wie erwähnt, von Yoshida et al. gezeigt werden. Von daher wäre es weiterhin interessant zu untersuchen, wie sich ein erhöhter ATXN2-Expressionslevel auf die endogene PAIP2-Konzentration auswirkt.

#### **4.2.3 Einfluss veränderter ATXN2-Level auf Aktin-assoziierte Filament-Formation**

Untersuchungen in unserem Labor ergaben, dass ATXN2 auch in Prozessen der Aktin-Filament-Formation eine Rolle zugewiesen werden kann. Diese Verbindung kann auf Grund der Interaktion von ATXN2 mit T- bzw. L-Plastin gezogen werden (Abbildung 27), da die Plastine zu einer Unterklasse von Aktin-Bindeproteinen gehören, welche die Fähigkeit besitzen, Aktin-Filamente zu festen Bündeln zu vernetzen und deshalb auch als Aktin-Bündelproteine bezeichnet werden [148]. In Säugetieren existieren 3 Isoformen der Plastine, I-Plastin, L-Plastin und T-Plastin, die spezifisch in bestimmten Zelltypen exprimiert werden. T- und L-Plastin stellen die bisher besser untersuchten Homologe dar und weisen eine 80 %-ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz auf [200]. Plastine sind strukturell aus zwei aminoterminalen EF-Hand-Motiven, die diese Proteine zur Bindung von Kalzium befähigen, und zwei Tandem-Aktin-Bindedomänen, die wiederum in zwei Calponin-Homologie-Domänen unterteilt sind, aufgebaut [201, 202]. Sie stabilisieren Aktin-Filament-Strukturen durch ihre Aktin-Bündel-Aktivität, welche wahrscheinlich durch unterschiedliche Kalzium-Konzentrationen moduliert wird [203, 204]. Beide Proteine weisen ein unterschiedliches Verhalten in ihrer Fähigkeit auf, sich zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma zu bewegen [148].

Eine interessante Beobachtung war, dass ein erhöhter ATXN2-Expressionslevel einen Einfluss auf die endogene Immunreaktivität von T-Plastin besaß, während der Level von L-Plastin nicht beeinträchtigt wurde (Abbildungen 29 und 30). Bemerkenswerterweise konnte auch die für den Anstieg der endogenen T-Plastin-Immunreaktivität verantwort-

liche Region von ATXN2 in dieser Arbeit bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass die LSm/LSmAD-Domäne bei diesem Phänomen die entscheidende Rolle spielte (siehe Abbildungen 32 und 33). Dies ist insofern interessant, als dass die Überexpression dieser Domäne von ATXN2 ebenfalls für die Reduktion der P-body-Strukturen in Säugerzellen verantwortlich ist.

Eine weitere interessante Beobachtung zeigte sich zusätzlich unter Stress-Bedingungen, da T-Plastin als weitere SG-Komponente bestätigt werden konnte. L-Plastin hingegen wurde in seiner zellulären Lokalisation nicht beeinträchtigt, sondern es wurde auch unter Stress-Bedingungen zytoplasmatisch verteilt detektiert (Abbildung 34). Die Lokalisation von T-Plastin in SGs könnte eventuell über die Interaktion mit ATXN2 zustande kommen. Dass nicht beide Plastin-Isoformen durch eine ATXN2-Überexpression oder Stress beeinflusst werden, weist auf funktionelle Differenzen dieser Proteine hin. Tatsächlich konnten Untersuchungen über diese beiden Isoformen in Fibroblast-ähnlichen Zellen CV1 zeigen, dass Unterschiede im Protein-Verhalten der Isoformen bestehen [204]. Wurden die Zellen mit anionischen Agenzien vor der Fixierung für Immunfluoreszenz-Aufnahmen behandelt, konnte eine Kollokalisierung von L-Plastin mit einem Polygonalen Netzwerk aus "stress fibres" beobachtet werden. T-Plastin hingegen war unter diesen Bedingungen nicht mehr mit diesem Netzwerk assoziiert. In der polarisierten Epithelzelllinie LLC-PK1 konnte ein gegenteiliges Verhalten beobachtet werden. Hier assoziierte T-Plastin, auch nach Behandlung mit anionischen Agenzien, mit hoch organisierten Aktin-Bündeln der Mikrovilli, während L-Plastin diese Lokalisation nicht zeigte. Dies weist darauf hin, dass die unterschiedlichen Plastin-Isoformen unterschiedliche funktionelle Eigenschaften besitzen, die sich jeweils zellspezifisch darstellen.

Wie erwähnt, kann ATXN2 durch die Interaktion von ATXN2 mit L- bzw. T-Plastin, zusätzlich zu seiner Rolle im mRNA-Metabolismus, eine Funktion in der Aktin-Filament-Formation und Organisation zugewiesen werden. Bemerkenswerterweise konnten Satterfield et al. für das *Drosophila melanogaster*-Homolog Datx2 zeigen, dass dieses Protein ebenfalls an der Regulation der Aktin-Filament-Formation beteiligt ist [81].

---

Sowohl eine reduzierte Aktivität als auch eine Überexpression von Datx2 führt in Fliegen zu ausgeprägten Phänotypen, die aus Veränderungen der Aktin-Filament-Organisation und Formation entstehen. Dabei konnte jedoch weder eine Interaktion von Datx2 mit Aktin, noch Veränderungen der endogenen Aktin-Konzentration festgestellt werden. Daher wurde aus diesen Ergebnissen geschlossen, dass Datx2 auf die Translation oder Lokalisation von Transkripten einwirkt, die Mediatoren der Aktin-Polymerisation darstellen. Auf Grund der in dieser Arbeit vorgestellten Daten wäre es von großem Interesse zu untersuchen, welche Auswirkungen ein gesteigerter ATXN2-Level in *Drosophila melanogaster* auf das entsprechende Plastin-Homolog Fim (Fimbrin) hätte.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass T-Plastin die Abbaurate von Aktin-Filamenten vermindert und deren Cofilin-vermittelte Depolymerisation *in vitro* inhibiert [205]. Des Weiteren ist das Protein sowohl an der Kontrolle des Aktin-Umsatzes als auch an der Überwachung von Aktin-Filamenten in verschiedenen Strukturen *in vivo* beteiligt [205]. Man könnte also daraus schließen, dass erhöhte T-Plastin-Konzentrationen, durch abnorme Vernetzungen und gestörte Stabilisierung von Aktin-Filamenten, negative Auswirkungen auf die Aktin-Dynamik ausüben. Dabei könnte dieser Effekt durchaus indirekt, über Interaktionen mit anderen Aktin-Bindeproteinen oder weiteren essentiellen zellulären Proteinen, zustande kommen. Interessanterweise führt die Überexpression von Fimbrin in *Saccharomyces cerevisiae* zu einem ausgeprägten Phänotyp, der eventuell auf eine Hyperstabilisierung und daraus resultierend, auf ein weniger dynamisches Aktin-Zytoskelett zurückzuführen ist [206]. In Spaltheffen scheint das Fimbrin-ähnliche Protein Fim1 eine Rolle in der Stabilisierung von F-Aktin "patches" zu spielen. Fim1 ist dabei eine Komponente dieser Strukturen und auch von F-Aktin-Ringen, und es könnte zusammen mit anderen Proteinen eine Funktion in der Zytokinese ausüben [207]. Auch wurden abweichende T-Plastin-Expressionslevel auch in verschiedenen Karzinomen beobachtet [208, 209, 210]. Weiterhin konnten erhöhte T-Plastin-Konzentrationen in CHO-Zellen festgestellt werden, deren DNA geschädigt wurde [211], und hohe T-Plastin-

Level wurden in sich aktiv teilenden Zellen detektiert [212]. Schwankungen in der T-Plastin-Expression wurden zusätzlich in Placenta-Zellen identifiziert, wobei die Expression wiederum in sich teilenden Zytotrophoblasten höher war, als in ausdifferenzierten Synzytiotrophoblasten [212]. In dieser Hinsicht wäre es von Interesse, die Auswirkungen gesteigerter T-Plastin-Konzentrationen durch einen erhöhten ATXN2-Level auf die Morphologie und das Mobilitätsverhalten von Zellen zu untersuchen.

Auf Grund des Befundes, dass eine Überexpression von ATXN2 zu einem erhöhten T-Plastin-Level führte, sollten im Gegenzug die Auswirkungen einer erhöhten T-Plastin-Konzentration auf ATXN2 untersucht werden. Bemerkenswerterweise konnte bei Überexpression von T-Plastin eine Formation von SGs in ca. 30 - 40 % der transfizierten Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen beobachtet werden (siehe Abbildung 35). Dabei konnte jedoch rein visuell keine gesteigerte Akkumulation des überexprimierten T-Plastin in diesen Strukturen beobachtet werden, obwohl endogenes T-Plastin eine weitere Komponente von SGs darstellt. Dies könnte daran liegen, dass T-Plastin eventuell nur unter Stress-Bedingungen eine Komponente von SGs darstellt, oder dass die Überexpression des Proteins so stark gesteigert war, dass keine vermehrte Akkumulation in der Immunfluoreszenz festzustellen war. Ob diese Ausbildung von SGs jedoch ein generelles Phänomen der T-Plastin-Überexpression darstellt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Interessanterweise gibt es weitere SG-assoziierte Proteine, die bei einer Überexpression die Bildung von SGs auslösen. So konnte gezeigt werden, dass wenn die RasGAP-assoziierte Endoribonuklease G3BP in verschiedenen Zelllinien zur Expression gebracht wird, die Formation von SGs beobachtet wird, in denen das überexprimierte G3BP lokalisiert [213]. Des Weiteren führt auch die Überexpression von CPEB1 zur Bildung von SGs [135].

In dieser Arbeit wurden die Folgen eines erhöhten ATXN2-Niveaus auf verschiedene am mRNA-Metabolismus und der Aktin-Filament-Formation beteiligten Proteine und

---

Strukturen vorgestellt. So führt eine Erhöhung der intrazellulären ATXN2-Konzentration zu Störungen der endogenen PABP-Expression und Veränderungen der zellulären P-body-Formation. Des Weiteren konnte eine Erhöhung des endogenen T-Plastin-Niveaus durch gesteigerte ATXN2-Konzentrationen gezeigt werden. Bemerkenswerterweise wurde kürzlich eine Komponente des Zytoskeletts der Zellen mit P-bodies in Zusammenhang gebracht. Sweet et al. konnten zeigen, dass eine Zerstörung von Mikrotubuli die Formation von P-bodies fördert. Diese vermehrte Assoziation von P-body-Strukturen ist dabei jedoch unabhängig von globalen Veränderungen im mRNA-Metabolismus [214]. Diese aufgeführten Veränderungen könnten im Falle von SCA2 zu weitreichenden zellulären Veränderungen führen und zum Pathomechanismus von SCA2 beitragen.

### **4.3 Störungen im zellulären mRNA-Metabolismus als potentieller Pathomechanismus in neurodegenerativen Erkrankungen**

In eukaryotischen Zellen stellt die Kontrolle der Translation einen fundamentalen Mechanismus dar, und die Deregulation von Proteinen, die an dieser Kontrolle beteiligt sind, trägt zu verschiedenen Krankheiten bei.

Interessanterweise konnten zusätzlich weitere Erkrankungen mit Störungen im mRNA-Metabolismus in Zusammenhang gebracht werden. So ist Ataxin-1, das SCA1 auslösende Protein, in der Lage direkt RNA zu binden. Diese Fähigkeit nimmt jedoch mit einer Verlängerung des Polyglutaminbereichs des Proteins ab. Dies kann zu Störungen des mRNA-Metabolismus beitragen [18]. Weiterhin konnte in einem *Drosophila melanogaster*-Modell gezeigt werden, dass auch stark erhöhte Level des Proteins mit einem normalen Polyglutaminbereich zu weitreichenden Störungen, ähnlich denen der Expression eines ATXN1-Proteins mit verlängertem Polyglutaminbereich, führen [215]. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden weiterhin Gene identifiziert, die als Suppressoren oder Verstärker des *SCA1*-Gens wirken, und die an RNA-Prozessierung, transkriptioneller Regulation und zellulärer Entgiftung beteiligt sind. Diese Ergebnisse könnten ebenfalls

für die Behandlung anderer Polyglutaminerkrankungen relevant sein.

Des Weiteren führt das transkriptionelle "silencing" des "*Fragile X Mental Retardation 1*"-Gens, welches für das "Fragile X Mental Retardation protein" (FMRP) kodiert, zum "Fragile X syndrome" [216]. FMRP werden zwei Rollen im zellulären mRNA-Metabolismus zugesprochen; zum einen scheint es als Transporter von mRNPs zu fungieren, der diese Partikel in Neuronen zu spezifischen Bereichen transportieren kann. Diese Funktion kann beim Fehlen dieses Proteins jedoch wahrscheinlich durch andere Faktoren kompensiert werden. Weiterhin wird FMRP die kritische Rolle eines Translationsrepressors unter spezifischen Bedingungen zugeschrieben. Wird das Protein beim "Fragile X syndrome" nicht exprimiert, kommt es somit wahrscheinlich zur unvollständigen Repression bestimmter mRNAs, welche zur Expression von Proteinen an nicht vorgesehenen Stellen in Neuronen führen könnte.

Interessanterweise konnte ausserdem die autosomal rezessiv vererbte Spinale Muskuläre Atrophie (SMA) mit einer reduzierten SG-Bildung und damit mit dem mRNA-Metabolismus in Zusammenhang gebracht werden [217]. Im Menschen existieren zwei *SMN*-Gene, die für identische Proteine (SMN1 und SMN2) kodieren; eine "loss of function" des "survival motor neuron protein"-1 (SMN1) ist dabei verantwortlich für die Ausbildung der Krankheit, während die Expression von SMN2 diesen Verlust nicht kompensieren kann. SMN2 wird in vornehmlich in einer verkürzten Form exprimiert, der das Exon 7 fehlt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass SMN mit TIA-1 und TIAR interagiert und in Zellkultur-Experimenten bei Überexpression für die Bildung von SGs verantwortlich scheint, da auch dieses Protein zur Selbstaggregation fähig ist. In SMA-Fibroblasten, welche weniger SMN exprimieren, kommt es jedoch zu Störungen in der SG-Formation.

Abschließend ist zu sagen, dass diese Ergebnisse darauf hinweisen, dass die Veränderung von Proteinen (Konzentration, Lokalisation, Mutation), welche direkt oder indirekt am mRNA-Metabolismus beteiligt sind, große Auswirkungen auf Zellen besitzen. In weiterge-

---

henden Versuchen muss nun die genaue Funktion von ATXN2 an diesen zellulären Vorgängen und die weiterreichenden Konsequenzen eines erhöhten ATXN2-Levels analysiert werden. Weiterhin müssen Untersuchungen an geeigneten Modellsystemen zeigen, inwieweit ATXN2 mit einem verlängerten Polyglutaminbereich vielleicht stärkere Auswirkungen auf Interaktionspartner oder mRNA-Metabolismus-Strukturen besitzt. Dabei ist die Frage zu klären, ob die Pathogenität der Proteins tatsächlich mit dem expandierten Polyglutaminbereich korreliert, oder ob vielleicht vielmehr dieser Bereich einen regulären Abbau des Proteins verhindert und so das ATXN2-Protein stabilisiert. Dies würde in einer erhöhten ATXN2-Konzentration in den Gehirnen betroffener Menschen resultieren, und könnte so die die beschriebenen Auswirkungen, auf den mRNA-Metabolismus und der daran beteiligten Proteine und Strukturen, auslösen.